



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Nat: 07-028053- -00000-0000

FE: 2007-03-21 17:07:25 Dep. 2020 NUECREACIONES

IMP. 11 PATENTISTA

EXP. 3/18 FASE NACIONAL

ACT 411 PRESENTACION

FORM 126

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC., sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware de los Estados Unidos de América.

Dirección: 2621 N. Belt Highway, St. Joseph, 64506 Missouri, Estados Unidos de América.

Domicilio: St. Joseph 64506 Missouri, Estados Unidos de América.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

C.E. ☐

NIT ☐

Otro ☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O AP DERADO

Nombre: EMILIO FERRERO

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@camyp.com.

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

C.E. ☐

NIT ☐

Otro ☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. Michael ROOF, 3222 Tupelo Circle, Ames, Iowa 50016, Estados Unidos de América.

2. Eric VAUGHN, 509 Ash Avenue Ames, Iowa 50014-7067, Estados Unidos de América.

3. Wesley JOHNSON, 1210 25th Street, Ames, Iowa 50010, Estados Unidos de America.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/033760

Fecha: Septiembre 21 de 2005

Publicación Internacional No. WO 2006/034319 A2

Fecha: Marzo 30 de 2006

6

Título (54)

AISLADOS DE VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO Y MÉTODOS DE USO

7

Clasificación Internacional (51)

C12Q 1/70

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

Septiembre 21 de 2004

60/611,824

US

Diciembre 23 de 2004

11/022,262

US

Septiembre 20 de 2005

11/230,723

9

Comprobante de pago No.: 07-18,384

Fecha: Marzo 5 de 2007

2

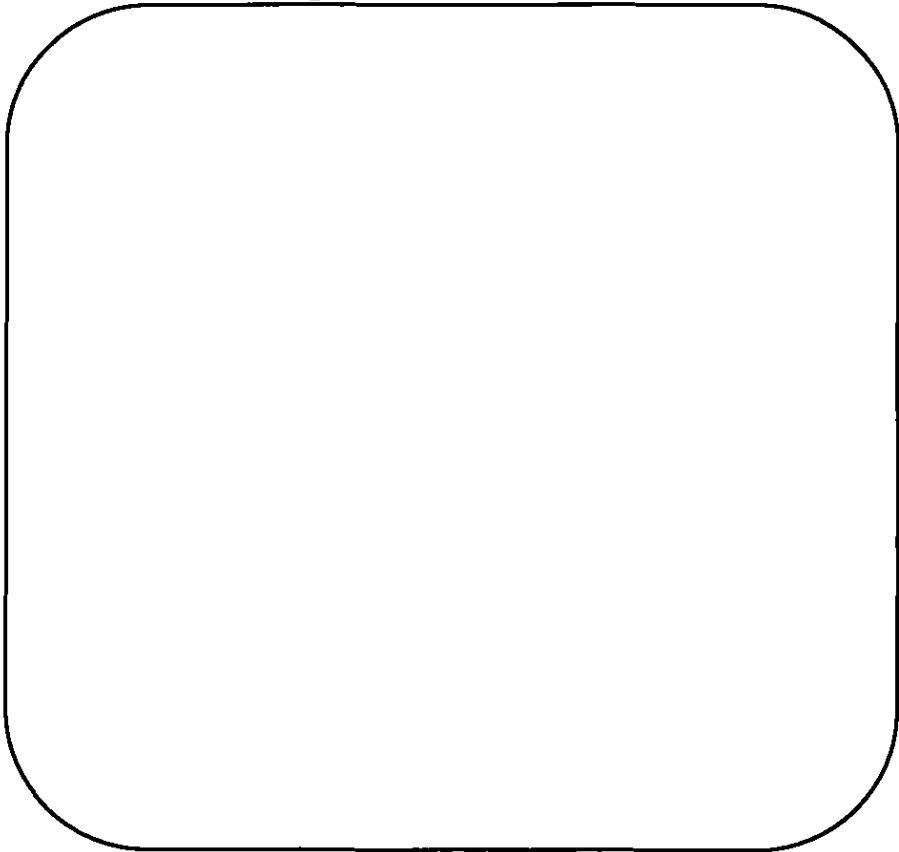
10

Anex s:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 482.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ 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 efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción de los anexos del examen preliminar 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 12x12
- ☐ 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.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

Figura Característica.



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

MGT

D cument s anexos

1. ☒ Publicación Internacional WO 2006/034319 A2
Páginas en el idioma original 41
Páginas en español 35
Reivindicaciones: Número (s) 20
Figuras: Número (s) 10
2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Extracto de publicación.
4. ☒ Carátula de la publicación internacional WO 2006/034319 A3
5. ☒ Copia de la solicitud para adicionar la prioridad No. 11/230,723 del 20 de Septiembre de 2005.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

4

1196

15149
0264

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: The United States of America

THIS PUBLIC DOCUMENT

2. has been signed by JEANNE E. ROGERS

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC

4. in the State of Connecticut for the term of November 26, 2001 to November 30, 2006

CERTIFIED

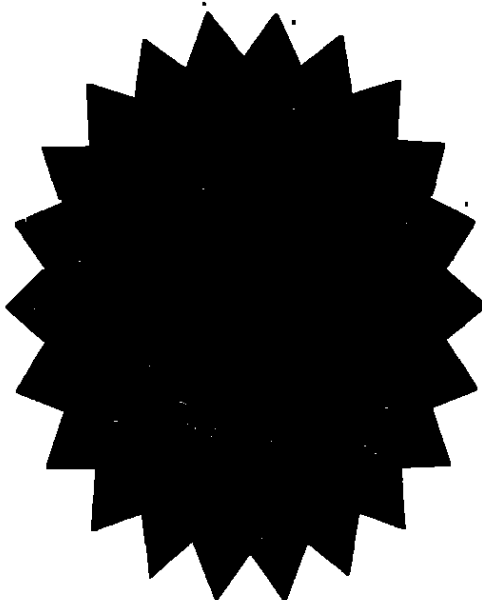
5. at Hartford, Connecticut

6. on March 13, 2006

7. by SUSAN BYSIEWICZ Secretary of the State of Connecticut

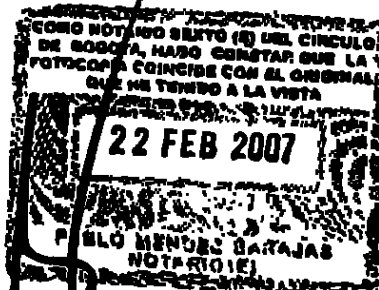
8. Number : 2006-3439

9. Seal :



10. Signature

Secretary of the State



REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

domiciliado (s)
en/of

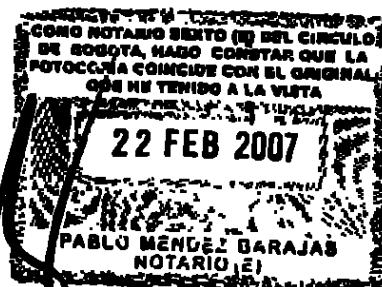
2621 North Belt Highway,

St. Joseph, MO 64506, Estados Unidos de América

hereby ratify the patent appl. No. 06.006.798 filed by Emilio Ferrero on Jan. 25, 2006, and

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

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72. 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.



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

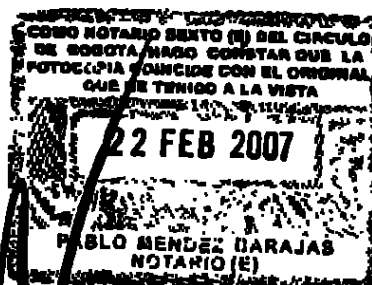
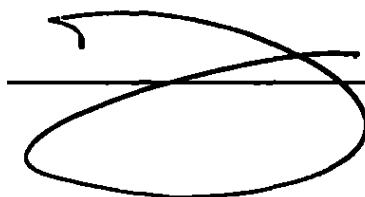
In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 9th Day of March, 2006

en/in Ridgefield, Connecticut USA

por/by Maria S. Persky, Secretary

Firma/Signature



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____
de 200 ____ ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado de

compareció(eron) personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los 9 días del mes de MARZO
de 200 6 compareció(eron) ante mí,

María S. Persky

Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en
representación de la Sociedad/compañía denominada
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

**NOMBRAMIENTO/RESOLUCION DE LA JUNTA
DIRECTIVA EN RIDGEFIELD, CONNECTICUT
FECHADO 2 MAYO 2005**

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que MARLA S. PERSKY ES SECRETARIA
DE BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de
acuerdo con las leyes de] Estado de Delaware

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
2621 North Belt Highway

St. Joseph, Missouri 64506 EUA

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) María S. Persky

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad Ridgefield

Estado Connecticut

Hoy 9 Marzo de 200 6

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

CAVELIER ABOGADOS
WPP0001-181 (MINUTA N° 12.1.1.2.6 USA)

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
200 ____ before me, a Notary Public or Attesting Official of

personally appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed
that foregoing document, and who has(have) legal capacity to
execute it.

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this 9th day of March
2006 ____ appeared before me

Marla S. Persky

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

I certify:

1. That I have seen the following documents:*

**Appoint/Resolution by the Board of Directors in Ridgefield,
Connecticut dated May, 2, 2005.**

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Marla S. Persky is Secretary to
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws The State of Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
2621 North Belt Highway

St. Joseph, Missouri 64506 USA

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of
Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set
forth in the charter of the mentioned corporation.
2.4. That Mr.(Messrs.) Marla S. Persky

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

City Ridgefield

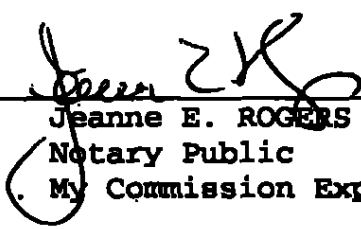
State Connecticut

This 9th day of March 2006

* Documents must be identified with date and origin

JEANNE E. R. GERS
NOTARY PUBLIC
MY COMMISSION EXPIRES MAY 30, 2008

Personally appeared, Marla S. Persky, signer and sealer of the foregoing instrument and acknowledged the same to be her free act and deed before me this 9th day of March, 2006.


Jeanne E. ROGERS

Notary Public

My Commission Expires: 11/30/2006

APOSTILLE

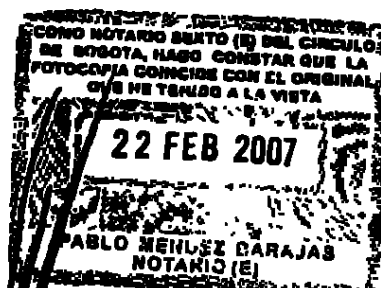
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
This public document
2. has been signed by
3. acting in the capacity of
4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at 6. the
7. by
8. No.
9. Seal/stamp 10. Signature

.....



CAVELIER ABOGADOS

WPP0001-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

9

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 15/05.06 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante resolución 2879 de 1999 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Poder en inglés y español, por el cual **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.**, sociedad domiciliada en 2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 6406, Estados Unidos de América, ratifica la solicitud de patente No. 06.006.798 presentada por Emilio Ferrero el 25 de enero de 2006 y otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMAN CAVELIER**.

Dado y firmado el 9 de marzo de 2006 en Ridgefield, Connecticut, E.U.A.

Por María S. Persky, Secretaria

Firma: (firma ilegible)

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.**, y a la capacidad legal de María S. Persky para otorgar poder.

Dado y firmado en la ciudad de Ridgefield

Estado de Connecticut

El 9 de marzo de 2006

(Firma), JEANNE E. ROGERS, Notario Público, Mi comisión expira el 30 de noviembre de 2006.

Al dorso:

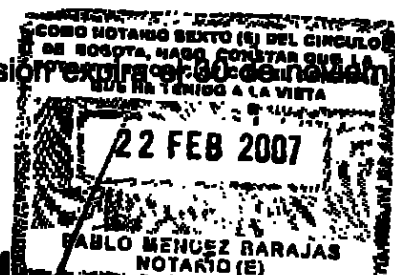
Compareció personalmente María S. Persky, quien firmó y selló el instrumento anterior y reconoció a éste como un acto libre ante mí hoy 9 de marzo de 2006.

(Firmado)

JEANNE E. ROGERS

Notario Público

Mi comisión expira el 30 de noviembre de 2006



APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América

ESTE DOCUMENTO PÚBLICO2. ha sido firmado por **JEANNE E. ROGERS**3. actuando en su capacidad de **NOTARIO PÚBLICO**

4. del estado de Connecticut por el término 26 de noviembre de 2001 a 30 de noviembre de 2006

CERTIFICADO

5. en Hartford, Connecticut

6. el 13 de marzo de 2006

7. por **SUSAN BYSIEWICZ**, Secretario de Estado de Connecticut8. Número: **2006-3439**

9. Sello: sello del Estado de Connecticut

10. Firma: (firmado), Susan Bysiewicz, Secretario de Estado

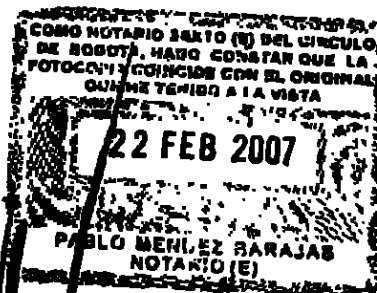
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 15149-841-001-9

WPC 15149 - ID 12

MAR 31/06

Maria E. Martelo
TRADUCCION No. 15105.06
MARIA ELVIRA MARTELO
 Traductora e Interprete Oficial
 Inglés - Español - Inglés
 Res. No. 2879 Min. Justicia



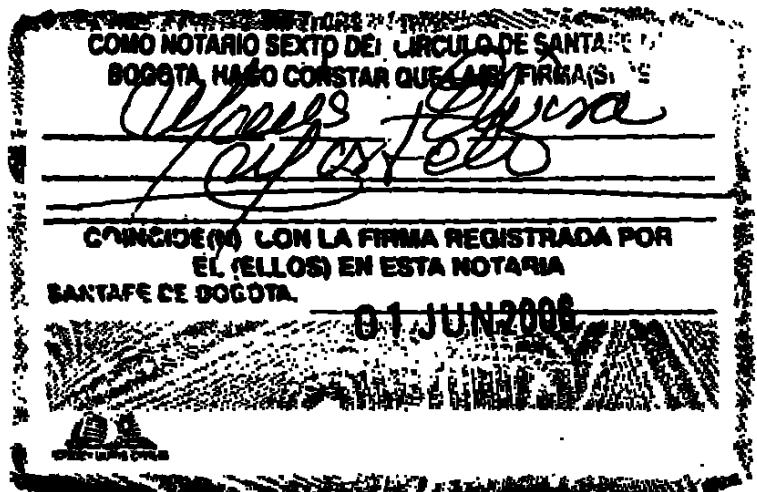
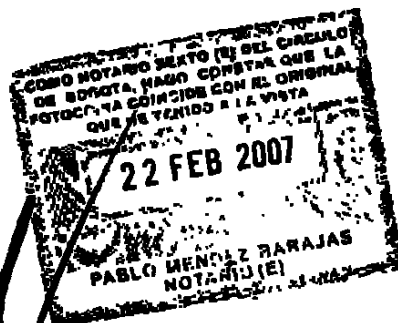
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

451535
Marta Martelo
CUBA FIRMADA ADELANTE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 JUN -1 A 11:56

Uso
REC DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 March 2006 (30.03.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/034319 A2

(51) International Patent Classification:
C12Q 1/70 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(74) Agent: TRUITT, Tracey, S.; Hovey, Williams LLP, 2405
Grand Boulevard, Suite 400, Kansas City, MO 64108 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2005/033760

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AB, 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,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
21 September 2005 (21.09.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/611,824 21 September 2004 (21.09.2004) US
11/022,262 23 December 2004 (23.12.2004) US

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KI, 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, IS, IT, LT, LU, LV, 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) Applicant (for all designated States except US):
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
[US/US]; 2621 N. Belt Highway, St. Joseph, MO 64506
(US).

Published:

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

(72) Inventors; and

(75) Inventor/Applicants (for US only): ROOF, Michael
[US/US]; 3222 Tupelo Circle, Ames, IA 50016 (US).
VAUGHN, Eric [US/US]; 509 Ash Avenue, Ames, IA
50014-7067 (US). JOHNSON, Wesley [US/US]; 1210
25th Street, Ames, IA 50010 (US).

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

(54) Title: PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME ISOLATES AND METHODS OF USE

(57) Abstract: A method of predicting the virulence of a new or uncharacterized PRRS virus isolate is provided wherein the isolate is injected into swine and allowed to replicate for a period of from about 3-15 days. During this period, the rate of virus growth and/or the magnitude of viremia is determined, and this data is compared with a corresponding growth rate and/or viremia magnitude of a PRRS virus isolate of known virulence, as a measure of the virulence of the new or uncharacterized isolate. Additionally, a method of selecting an isolate for inclusion in an immunogenic composition based on the predicted virulence is also provided, together with compositions incorporating attenuated forms of viruses predicted to be virulent.

WO 2006/034319 A2

**PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME ISOLATES AND
METHODS OF USE**

RELATED APPLICATIONS

5 The present application is a continuation-in-part of Application Serial No. 11/022,262, filed on December 23, 2004, which claimed the benefit of provisional application Serial No. 60/611,824, which was filed on September 21, 2004. The teachings and content of each of these prior applications is incorporated by reference herein.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

10 The present invention is concerned with new isolated wild-type PRRS virus isolates and corresponding improved attenuated PRRS viruses, the uses of such attenuated viruses in vaccines and immunological compositions, as well as methods of measuring the magnitude of viremia,
15 rate of growth, antibody response, and combinations thereof in such isolates and viruses. More particularly, the present invention provides methods for predicting the virulence of new or previously uncharacterized PRRS isolates, and the attenuation and use of such isolates in vaccines and immunological compositions.

20 **Description of the Prior Art**

 Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is an enveloped single stranded RNA virus classified in the family Arteriviridae (Cavanaugh, 1997). It causes a widespread disease of swine that was first described as 'mystery swine disease' in the USA in 1987 (Hill, 1990). The disease manifests as respiratory illness in all age groups of swine leading
25 to death in some younger pigs and severe reproductive problems in breeding age females.

13

The dynamic nature of PRRSV allows for constant change in the disease and provides ample opportunity for the appearance of new isolates (Andreyev et al., 1997; Murtaugh et al. 1998; Meng, 2000). The fact that PRRSV changes so readily, coupled with its ability to cause devastating problems for swine producers, makes it an important subject for research (Mengeling et al., 1998; Pejsak et al., 1997) and for the development of vaccines and other methods of reducing the effects of infection. Variation in levels of isolate virulence were demonstrated in lung lesions, and death in swine (Halbur et al., 1996), but efforts to link biological and immunological differences to specific genetic differences has been largely unsuccessful (Albina et al., 1998; Key et al., 2001; Yuan et al., 2001; Murtaugh et al., 2002; Grebennikova et al., 2004). Studies examining the safety and efficacy of PRRS vaccines include the work of Labarque et al., (2003), Mengeling et al., (2003a), and Nodelijk et al. (2001). These studies show that under experimental conditions, modified live PRRS vaccines reduce the amount and duration of viremia as well as fever and lung lesions after virulent challenge.

Opriessing et al. (2002) showed that isolates with high amino acid sequence homology in open reading frame 5 (ORF5) caused significantly different levels of pneumonia in pigs. Variation in swine responses to PRRSV also are affected by host variation (Mengeling et al., 2003b). Virulence has been examined in relation to replication rates and distribution of PRRSV in pigs (Haynes et al., 1997), to macrophage copper clearing capabilities (Thanawongnuwech et al., 1998), and the anemia levels of the host animal (Halbur et al, 2002). However, these methods have been deficient in providing effective methods for predicting the virulence of new or previously uncharacterized PRRS isolates.

Accordingly, what is needed in the art is a method of predicting the virulence of PRRS isolates. What is further needed in the art is a method of predicting the virulence of PRRS isolates based on the rate of *in vivo* PRRS viral growth and/or viremia magnitude in a swine after

50 administration or exposure of the isolate to a previously PRRS-free swine.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention overcomes the problems outlined above and provides new isolated wild-type PRRS virus isolates, attenuated versions of such viruses, and corresponding vaccines comprising the attenuated PRRS viruses in pharmaceutical compositions. In more detail, the wild-type viruses of the invention are denominated SDSU 73, 17198-6 and MN 184, and mixtures thereof. Attenuated versions of these virus isolates, and complete vaccines comprising the attenuated isolates are capable of conferring *in vivo* immunity against PRRS in swine, without generation of significant PRRSV clinical signs.

60 Another feature of the attenuated PRRS isolates of the invention is that they retain a substantial proportion of the viremia found in the wild, unattenuated viruses. Thus, the attenuated viruses exhibit at least about 50%, and more preferably at least about 75%, of the viremia exhibited by the wild unattenuated viruses. In this way, the attenuated viruses are capable of conferring a more rapid and complete PRRS immunity in swine.

65 The wild viruses can be attenuated by a variety of methods, such as repeated serial passage in cell culture, gene insertion, gene switching, gene deletion, base-pair substitution, and temperature-sensitive mutation. Such attenuated viruses may then be used in a variety of immunological compositions including vaccines using methods that are well known in the art. In some forms, these attenuated viruses may further be killed or inactivated using methods that are well known in the art, prior to incorporation or inclusion in an immunogenic composition according to the present invention. Examples of immunogenic compositions useful for preventing PRRS infection or reducing the severity of clinical signs of PRRS infection include vaccines made with Abst-1 or JA-142.

70

It has also been discovered that the vaccines of the invention may be stored in a frozen
75 condition until ready for use, without detracting from the desirable characteristics of the vaccines.
This addresses a continuing problem in the art, inasmuch as prior PRRS vaccines have not been
suitable for frozen storage.

The present invention further provides methods for predicting the degree of virulence of
a new or uncharacterized PRRS virus isolate. Such methods generally involve assessing a new
80 or previously uncharacterized isolate of PRRS for at least one of the following parameters: rate
of viral growth; magnitude of viremia; antibody response; or combinations thereof. The results
of such an assessment are then used to predict the degree of virulence of the new or previously
uncharacterized isolate. The methods generally involve administering or exposing a PRRS-free
swine to a quantity of the new or uncharacterized PRRS isolate and allowing the virus to
85 replicate for a period of up to about 15 days, more preferably from about 2-12 days, still more
preferably from about 3-10 days and still more preferably from about 3-7 days. The mode of
administration can be accomplished using any conventional manner, including oral, intranasal,
intramuscular, intra-lymph node, intradermal, intraperitoneal, subcutaneous, and combinations
thereof, but most preferably through intranasal administration. The amount of the dose for
90 intranasal administration is preferably up to about 5 ml, still more preferably between about 0.5
ml to about 4 ml, still more preferably between about 1 ml and about 3 ml, and still more
preferably about 2 ml. The concentration of virus in each dose should be up to about 5.0 Log₁₀
TCID₅₀/ml, more preferably between about 1.0 to about 4.0 Log₁₀ TCID₅₀/ml, and still more
preferably about 2.5 to 3.5 Log₁₀ TCID₅₀/ml, and most preferably about 3.0 Log₁₀ TCID₅₀/ml. At
95 a selected time or times during this replication period, biological samples are taken from the
swine and measurements of the rate of growth of the administered virus, viremia magnitude,
antibody response, and/or combinations thereof are taken. Data gathered from these

measurements is then compared with the rate of growth, viremia magnitude, antibody and/or combinations thereof for a known and characterized isolate, as a measure of predicted virulence of the new or unknown isolate.

Using the methods of the present invention, the rate of PRRS viral growth, viremia magnitude, antibody response, and/or combinations of these characteristics were measured in swine which had one of eight different PRRSV isolates administered thereto. Each of these isolates had a known level of virulence and clinical disease manifestations. These same characteristics were also measured in swine which had a combination of all eight isolates administered thereto.

More specifically, one hundred (100) healthy two-three week old pigs were divided randomly by weight into ten groups with each group having ten pigs. All pigs were tested for PRRS infection using HerdChek ® PRRS ELISA 2XR (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME). Eight of the groups received an administration of one of the eight isolates, one group received an administration consisting of a combination of all eight isolates, and the last group received an administration Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) to act as a control group. A sample of each viral inoculation was retitrated for titer confirmation. Preferably the titer of the administered virus is designed to mimic a natural exposure level of virus. Biological samples in the form of blood were collected at various times throughout the experiment. Each sample was analyzed by virus isolation, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), HerdChek ® PRRS ELISA 2XR, and PRRSV protein-specific ELISA.

Virus isolation was performed on CL2621 (an MA 104 cell line) cells by serially diluting serum and combining it with EMEM, gentamicin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and Fungizone (Invitrogen Corp., Grand Island, NY). The dilutions were then incubated and examined for cytopathic effect (CPE). The Reed-Muench calculation was used to determine

titers.

RT-PCR was performed using the QIAamp Viral RNA Mini-Kit ® (Qiagen, Inc., Valencia, CA) and PRRSV was detected using a single-tube assay by Tetracore, Inc. (Gaithersburg, MD). To determine virus quantitation, a standard curve was developed and concentrations of the unknown samples were determined by linear extrapolation of the cycle threshold values plotted against the known concentration of the 3' UTR transcript product.

Antibody measurement using ELISA S/P ratios were generated using HerdChek ® PRRS ELISA 2XR using the manufacturer's instructions. PRRSV protein-specific ELISA was performed using recombinant isolate VR2332 nucleocapsid (N) and non-structural protein 4 (nsP4) expressed in BL21 (DE3)-RP cells (Stratagene, La Jolla, CA).

All pigs were weighed at the beginning and at the end of the study. Additionally, on every day of the study, each pig was evaluated and scored by a veterinarian for clinical signs of PRRS disease. All resulting data was analyzed statistically and compared on a group-by-group basis.

Nine of the ten groups were subsequently challenged a second time with a virus isolate of high virulence to allow further evaluation of levels of homologous protection and vaccine versus wild type heterologous protection (live virus exposure concept). Following this challenge, the animals were evaluated and necropsied for analysis using virus isolation and immunohistochemistry.

The present invention therefore also provides an immunogenic composition comprising an attenuated PRRS virus isolate. In preferred forms, the composition can also include a pharmacologically compatible carrier and/or an adjuvant. One example of such a composition would include Abst-1 and/or an attenuated form of a PRRS virus that is predicted to be virulent by the methods described above.

The present invention also provides an improved method of selecting a PRRS virus isolate for attenuation and inclusion in an immunogenic composition. The method generally includes the steps of a) obtaining a PRRS isolate of unknown virulence; b) administering a quantity of said PRRS virus isolate into a PRRS-free swine; c) allowing said isolate to replicate
 150 in the swine for a period of from about 3-15 days; d) measuring the rate of virus growth and/or the magnitude of viremia during said period; e) comparing said rate of growth or viremia magnitude with the rate of growth and/or viremia magnitude of a PRRS virus isolate of known virulence; and f) selecting an isolate for attenuation and inclusion into an immunogenic composition based on its rate of growth and/or its viremia magnitude in comparison to isolates
 155 of known virulence. It would be preferred to select an isolate that was predicted to be highly virulent for inclusion in an immunogenic composition although isolates predicted to be of lessor virulence including those predicted to be avirulent could be used. This is because the isolates predicted to be of higher virulence had higher growth rates and/or magnitudes of viremia, which generally induce a more vigorous and protective immune response. By using the methods of the
 160 present invention, the selection of which isolates to use for inclusion in immunogenic compositions will be simplified and the likelihood of having a useful vaccine that protects against the virulent PRRS isolates will be increased.

As used herein, "rate of growth" refers to the measurement of virus replication over time in swine. Preferred examples of this measurement are provided in Example 1. "Viremia
 165 magnitudes" as used herein, refers to the concentration of virus circulating in the blood of swine. Preferred examples of this measurement are also provided in Example 1.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a graph of mean serum virus titer versus time expressed as $\log_{10}$ TCID₅₀/ml

170 for the swine test of Example 1;

Fig. 2 is a graph of mean PRRSV virus concentration in serum in the swine test of Example 1, as measured by real time RT-PCR;

Fig. 3 is a graph of mean S/P ratios versus time using a commercial ELISA assay;

175 Fig. 4 is a graph illustrating repeated measures analysis for the commercial ELISA assay and the $\log_{10}$ TCID₅₀/ml data of Example 1, wherein the group average under the ELISA S/P ratio curve was plotted against the group average area under the $\log_{10}$ TCID₅₀/ml;

Fig. 5 is a graph illustrating repeated measures analysis for the commercial ELISA assay an RT-PCR concentration data of Example 1, wherein the group average area under the ELISA ratio curve was plotted against the group average area under the RT-PCR concentration curve;

180 Fig. 6a is a graph of absorbance versus time for Example 1;

Fig. 6b is a graph of absorbance vs. time, illustrating the effect of PRRSV isolate on nsp-4 IgG response, wherein the data are the mean values of 10 animals, except where animals died;

Fig. 7 is a graph illustrating repeated measures analysis using the nsp-4 and $\log_{10}$ TCID₅₀/ml data of Example 1, wherein the group average area under the nsp-4 curve was plotted
185 against the group average area under the $\log_{10}$ TCID₅₀/ml curve;

Fig. 8 is a graph of repeated measures analysis using the clinical scores and $\log_{10}$ TCID₅₀/ml data of Example 1, wherein the group average under the clinical scores curve was plotted against the group average area under the $\log_{10}$ TCID₅₀/ml curve; and

Fig. 9 is a graph of the IHC scores for each isolate in this application.

190

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The following examples set forth preferred isolates and procedures in accordance with the present invention. It is to be understood, however, that these examples are provided by way

of illustration only, and nothing therein should be deemed a limitation upon the overall scope of
195 the invention.

EXAMPLE 1

Materials and Methods:

One hundred healthy 2-3 week-old pigs were obtained from a PRRS-free commercial
200 herd and were maintained at Veterinary Resources, Inc., Ames, Iowa, under the supervision of
a veterinarian. Animals received food and water *ad libitum*. All of the animal care and
laboratory personnel involved with the study were blinded to the treatments given to the various
groups of animals. Pigs were tested by HerdChek® PRRS ELISA 2XR (IDEXX Laboratories
Inc. Westbrook, ME) to determine if any pigs were infected with PRRSV. All of the pigs for this
205 example tested negative. The pigs were then randomly divided by weight into 10 groups with
10 pigs per group.

A total of eight PRRSV isolates were used in this example. These isolates have been
designated VR-2332, Ingelvac® PRRS MLV, JA 142, Ingelvac® PRRS ATP, SDSU 73, Abst-1,
MN 184, and 17198-6. These eight isolates span the history of PRRS disease, exhibit a wide
210 range of virulence levels, and represent relevant clinical disease manifestations. All of the virus
isolates grew readily on ATCC cell line CL2621 cells (CL2621 is a proprietary cell line obtained
from NVSL, Ames, IA,) (an MA-104 monkey kidney cell line). Three of the primary field
isolates, VR-2332, JA-142, and SDSU 73, also had attenuated forms, Ingelvac® PRRS MLV
(Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., St. Joseph, MO), Ingelvac® PRRS ATP (Boehringer
215 Ingelheim Vetmedica Inc., St. Joseph, MO), and Abst-1, respectively. These attenuated forms
all exhibit low or undetectable virulence that was derived by *in vitro* passaging to attenuation.
The PRRSV isolate ATCC VR-2332 was isolated in 1991 in Minnesota and was used at cell

21

culture passage three. The attenuated form of this virus is commercially available under the trade-name Ingelvac® PRRS MLV. The PRRSV isolate JA 142 (ATCC No. PTA-6504),
220 provided by William Mengeling, National Animal Disease Center, Ames, Iowa, was isolated in 1997 in Iowa from a severe "abortion-storm" case of reproductive failure and was used at cell culture passage five. The attenuated form of JA 142 is commercially sold under the trade-name Ingelvac® PRRS ATP and has been assigned ATCC No. VR-2638. PRRSV SDSU 73 (ATCC No. PTA-6322) was recovered in Iowa from a severe case of reproductive disease in 1996 and
225 was used at cell culture passage one. The attenuated form of SDSU 73, designated Abst-1 (ATCC No. PTA-6320), was obtained by 52 passages. The PRRSV isolate 17198-6 (ATCC No. PTA-6321) was obtained from Oklahoma in 1997 from a herd experiencing severe reproductive disease and was used at passage level four. The PRRSV MN 184 isolate (ATCC No. PTA-6319) was obtained in 2001 from a swine farm experiencing severe reproductive disease and sow
230 mortality in southern Minnesota and was provided by Kurt Rossow, University of Minnesota, St. Paul. This isolate was used at a cell culture passage of one. Additionally, a pool consisting of a combination of all isolates was produced.

On day 0, each of the eight PRRSV isolates and the PRRSV pool were diluted to approximately $3.0 \text{ Log}_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (JRH Bioscience, Lenexa, KS) containing 4% FBS (JRH Bioscience, Lenexa, KS) and administered
235 intranasally to pigs at a dose of 2 ml (1 ml per nostril). The untreated control group received 2 ml of media. The inocula were titrated on 96-well plates containing three-day-old CL2621 cells for titer confirmation using the Reed-Muench method (Reed et al., 1938). The observed titers administered to pigs, together with a description of the virulence level and isolation information,
240 are shown in Table 1.

27

W/O 2006/03/319

Table 1 Virulence and Inoculation Titer of isolates.

Group	Isolate	Year Isolated	Virulence***	Titer log ₁₀ TCID ₅₀ /ml
1	VR 2332	1991	Moderate	3.43
2	Ingelvac® PRRS MLV*	USDA license 1996	Attenuated VR2332	3.02
3	JA 142	1997	High	3.13
4	Ingelvac® PRRS ATP*	USDA license 1999	Attenuated JA 142	4.14
5	SDSU 73	1996	High	2.75
6	Abst-1*	Attenuated 1999	Attenuated SDSU 73	4.18
7	MN 184	2001	High	4.10
8	17198-6	1997	High	2.81
9	Pool**	N/A	High	3.71
10	Control	N/A	N/A	N/A

* attenuated PRRSV isolates.

** Mixture containing all of the eight isolates

*** Summary of lung lesions reported in Symposium on Emerging Diseases, Rome 2003

PCT/US2005/033760

28

The isolates were then compared to determine their genetic similarity through an analysis of their percent sequence identity. Sequence identity was determined by submitting virus samples to the University of Minnesota Diagnostic Laboratory for sequence analysis. The results of ORF 5-6 were provided and then compared to a PRRS virus consensus sequence. Individual base pair differences were noted and then the % sequence identity was compared between isolates. As those of skill in the art are aware, blast searching can also be done at various websites. For example, the University of Minnesota provides a PRRSV database (ccgb.umn.edu/cgi-bin/common/web_blast.cgi) that lists sequences from isolates from 1989-2003. Another frequently used site is the NCBI BLAST link found at ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.

As shown by the percent sequence identity and the dendrogram in Table 2, the virulent field isolates are quite genetically distinct and represented a diverse group of PRRSV isolates. In contrast, the parental and vaccine PRRSV pairs were nearly genetically identical. The pairwise comparison and dendrogram of Table 2 were generated using the Lasergene software suite of sequence analysis tools (DNASTAR, Inc, (Madison, WI)).

Table 2. Pairwise comparisons of ORF5 nucleotide sequence of virulent and attenuated PRRSV isolates used in the study. Percent similarity is shown in the upper right and percent divergence is shown in the lower left of the table. The dendrogram shows the genetic relatedness of the isolates. The bar indicates 1 nucleotide change per 100 residues. VR2332 is the parent isolate of Ingelvac PRRS MLV, JA 142 is the parent isolate of Ingelvac PRRS ATP and SDSU 73 is the parent isolate of Abst-1.

Percent Identity								
	VR 2332	Ingelvac PRRS MLV	JA-142	Ingelvac PRRS ATP	SDSU 73	Abst-1	MN 184	17198-6
VR 2332		99.7	91.0	90.5	90.0	89.6	86.4	90.4
Ingelvac PRRS MLV	0.3		90.7	90.2	89.7	89.2	86.4	90.0
JA-142	9.7	10.1		99.2	92.7	92.2	87.2	92.2
Ingelvac	10.3	10.7	0.8		91.9	91.4	86.4	91.4

24

	PRRS ATP							
	SDSU 73	10.9	11.3	7.8	8.8	99.5	87.2	91.7
	Abat-1	11.5	11.9	8.4	9.4	0.5	86.7	91.2
	MN 184	15.5	15.5	14.4	15.5	14.4	15.1	86.1
295	17198-6	10.5	10.9	8.8	9.7	9.0	9.6	15.9
	Percent Divergence							

At day 49, 2ml of virulent isolate of PRRS MN 184 was administered intranasally to groups 1-9. The MN 184 isolate was diluted in MEM + 4% FCS, such that the concentration was equal to log 3.0 +/- 0.5 per ml. The diluted challenge virus was titrated on 96-well plates containing three day old CL2621 cells for testing. The animals were evaluated for 14 days and then necropsied.

305 *Evaluation of Viremia*

Blood samples were collected from each pig in each group by vacutainer on days 0, 1, 3, 7, 15, 21, 28, 35, 42, and 49. Serum was separated from clotted whole blood by centrifugation at 6000 RPM for 20 minutes. Serum samples were then divided for analysis by virus isolation, TCID₅₀ Assay, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), HerdChek® PRRS ELISA 2XR, and PRRSV protein-specific ELISA. The serum samples in this study were processed immediately after collection and were chilled on ice within 3 hours of being obtained. The samples were stored for a maximum of 24 hr at 4°C and at -70°C thereafter. Serum tested by RT-PCR was frozen at -70°C the day of collection and stored until the testing could be performed at which time only the number of samples that could be tested within 24 hours were thawed, extracted, and tested.

For the TCID₅₀ assay, 100 µl of serum from each pig was added to a dilution tube containing 900 µl of EMEMm + 2% FBS + 50 µg/ml gentamicin (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) + 2.5 µg/ml Fungizone (Invitrogen Corporation, Grand Island NY). This tube was vortexed and 100 µl was transferred to another dilution tube containing 900 µl of EMEMm + 2% FBS + 50 µg/ml gentamicin + 2.5 µg/ml Fungizone. This process was repeated until a final dilution of 10⁻⁶ was reached. Four replicates for each dilution were plated on 96-well plates, containing the CL2621 (MA 104 cells), 100 µl per well, at 37°C and 4% CO₂ for eight days. Each well then was examined for cytopathic effect (CPE) and the titers were determined using the Reed-Muench calculation. For virus isolations, 100 µl of serum was added to each of the duplicate test wells containing MA 104 cells. The plates were then incubated for one hour at 37°C and 4% CO₂. Next, 500 µl of EMEM + 2% FBS + 50 µg/ml gentamycin + 2.5 µg/ml Fungizone was added to each well. The plates were allowed to incubate at 37°C with 4% CO₂ for eight days and then each well was examined for CPE.

To extract viral RNA from the serum for quantitative RT-PCR, the QIAamp Viral RNA Mini-Kit® (Qiagen Inc. Valencia, CA) was used as described in the kit instructions. For real-time PCR, a commercially available real-time, single-tube, RT-PCR assay for the detection of U.S. PRRSV was provided by Tetracore Inc. (Gaithersburg, MD) and used to detect PRRSV RNA. A minor groove binding (MGB) 5' nuclease probe and primers were designed from the 3' untranslated region (UTR) PRRSV genomic region by alignment of GenBank isolates and based on conserved areas of the 3'UTR primer and probe region. The PRRSV RNA was transcribed in a single tube using a 25 µl reaction volume consisting of Tetracore U.S. PRRSV Master Mix (18.9 µl Master mix, 2 µl Enzyme mix 1, 0.1 µl Enzyme mix 2) and 4 µl of extracted RNA. The reaction tubes were loaded into the Smart Cycler II® block (Cepheid, Sunnyvale, CA) and software settings of fluorescent detection were set for automatic calculation of the baseline with

26

340 the background subtraction on. The thermal cycler program consisted of 52°C for 1800 seconds, 95°C for 900 seconds, and 45 cycles at 94°C for 30 seconds, 61°C for 60 seconds and 72°C for 60 seconds. A PCR reaction was considered positive if the cycle threshold (Ct) level was obtained at ≤ 45 cycles. For quantitation, known amounts of serially diluted *in vitro* transcript RNA product (1×10^{-1} through 1×10^8 copies/ μ l) were used to generate a standard curve.

345 Copy/ml concentrations of the unknown samples were determined by linear extrapolation of the Ct values plotted against the known concentration of the 3'UTR transcript product.

Antibody Measurement

ELISA S/P ratios were generated by performing the HerdChek® PRRS ELISA 2XR (INDEXX Laboratories, Westbrook, MA) according to the manufacturer's instructions. PRRSV protein-specific ELISA for The HerdChek® was performed with recombinant isolate VR2332 nucleocapsid (N) and nonstructural protein 4 (nsp 4) which were expressed in BL21 (DE3)-RP cells (Stratagene) from the plasmid pET 24b as fusion proteins containing an amino terminal myc-tag and a carboxyl terminal 6x histidine tag. Denatured proteins were dialyzed in 0.1 M Tris HCl, pH 8.0, 6 M guanidine-HCl, 2 mM EDTA and adjusted to a concentration of 3 mg/ml.

355 DTT was added to 300 mM and the solution was filtered through a 0.45 μ m membrane. Reduced protein was added into refolding buffer (100 mM Tris HCl, pH 8.0, 0.5 M L-arginine, 8 mM oxidized glutathione, 2 mM EDTA, 10 μ M pepstatin A, 10 μ M leupeptin, and 1 mM PMSF), filtered (0.22 μ m) and stirred overnight. The purified protein was concentrated by tangential flow filtration (Pellicon XL Ultracel PLC 5 kd, Millipore) and dialyzed against 20 mM Tris HCl, pH 8.0. Proteins were analyzed on an Agilent 2100 Bioanalyzer with the Protein LabChip.

360 Purified protein solutions were stored at -80°C .

Protein-specific ELISAs were performed by coating microtiter plates with 100 ng recombinant protein in carbonate buffer, pH 9.6, or with buffer alone. Plates were blocked with

2.5% nonfat dry milk in phosphate-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (PBST). One
365 hundred µl of a 1:2000 dilution of serum was applied to duplicate wells for 2 hours, after which
plates were washed with PBST and antibody binding was detected by incubation with horseradish
peroxidase-conjugated goat-anti swine IgG (heavy + light chains (KPL, Gaithersburg MD)
diluted 1:5000 for 1 hour, followed by washing and color development with 100 µl of TMB
substrate (KPL). Reactions were stopped with 1 M phosphoric acid and plates were read at 450
370 nm.

Body Weights

All pigs were weighed on day 0 (first day of study) and day 49 (end of study). Pigs were
weighed on a portable electronic weigh-bar scale system Weigh-Tronix™ model 615XL,
(Weigh-Tronix Inc., Fairmont, MN). The scale was calibrated using certified test weights prior
375 to and after each use.

Clinical Scores

On every day of the study each pig was scored by a veterinarian for respiratory signs,
behavior, and coughing on a scale of one to four for each clinical sign. A normal animal was
given a score of three, maximum clinical illness was a score nine and a dead animal received a
380 score of 12. Samples from all animals that died in the study were submitted to the Iowa State
University Veterinary Diagnostic Laboratory for pathological examination.

Immunohistological evaluation of lungs

A sample fo lung from each pig was fixed with formalin on the day of necropsy for
testing by immunohistochemistry and microscopic examination for lesions compatible with
385 PRRSV. This testing was performed by the Iowa State University Veterinary Diagnostic Lab.

Statistical Analysis

All data were imported into SAS version 8.02 for data management and analysis. Summary statistics including mean, standard deviation standard error, median and frequency distributions were generated for all out come-variables as appropriate. Weight, RT-PCR, and Log₁₀ TCID₅₀/ml data were analyzed by one way ANOVA for overall differences among the treatment groups with pairwise testing for differences between treatment groups by Least Significant Difference t test. All tests for differences between groups were designed as two-sided tests. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Some changes were made to the data to facilitate correlation analyses. The Log₁₀ TCID₅₀/ml values listed as <2.00 were set to 1.0. Negative RT-PCR values were set to 1.0 and all RT-PCR values were normalized by transformation to log base 10 before analysis. Control group results were not included in the correlation analyses. Results for each pig were converted to an approximate area under the curve using trapezoidal rule. Area under the curve was computed for the entire study period, from the first observation to day 15, and from day 15 to the last observation, although only the entire study period is shown in the figures.

Results

Virus isolation and Log₁₀ TCID₅₀/ml quantification

Before exposure on the day of infection no animals tested positive for PRRSV. At 1 day after intranasal infection, only 13 animals in 5 groups tested positive for virus. However, at 3 days after infection all animals that were infected with field isolates, except for isolate 17198-6, were virus positive with mean log₁₀ TCID₅₀/ml values ranging from 2.1 (SDSU-73) to 3.9 (MN 184). By contrast, animals inoculated with attenuated isolates were uniformly negative by cell culture. These results are provided in Fig. 1. Peak levels of viremia, from 3.6 to 4.6 log₁₀ TCID₅₀/ml were attained on day 7 for four of the five virulent isolates. Isolate 17198-6 peaked

on day 15. Titers remained near or above $2 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ in all virulent virus groups for 21 days except for JA 142-infected pigs which had titers below that level.

The levels of viremia in the pigs inoculated with attenuated PRRSV isolates were lower than in pigs inoculated with virulent field isolates. The group means of the attenuated isolates peaked at titers over a log lower than the peak of the lowest virulent group titer. The Abst-1 isolate, with the exception of day 3 post inoculation, was never re-isolated. Ingelvac® PRRS MLV viremia fluctuated between 0.5 and $1.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ from days 7 to 28, and Ingelvac® PRRS ATP varied between 0.4 and $1.2 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ from days 7 to 28. Attenuated isolate viruses were not recovered from serum after day 28, and virus was recovered from only two of the virulent field isolate groups, the pool-infected and MN 184-infected pigs through day 35 (also shown in Fig. 1). Nearly all pigs were nonviremic by virus isolation at days 42 and 49.

Overall, the more virulent isolates were observed to replicate faster and to higher titers in pigs than were the attenuated isolates. Pigs infected with the MN 184 isolate, in particular, showed a very rapid increase in virus replication beginning before day 3 and reaching a peak of over $4.5 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ on day 7. After peaking, the MN 184 viremia steadily decreased but still maintained a significantly higher titer (t-test, $p \leq 0.05$) than all other isolates on days 28 and 35. A similar trend was observed in all of the remaining virulent groups, namely VR2332, JA 142, SDSU 73, and the pool (see, Fig. 1). Pigs infected with 17198-6 followed the same general trend described for the MN 184 infected group but not as closely.

Groups of pigs administered the attenuated isolates (Ingelvac® PRRS MLV, Ingelvac® PRRS ATP, and Abst-1) followed a different trend. They showed a moderate increase in viral titer beginning after day 3 that reached a peak between days 7 and 15 at a viral titer more than a log less than any of the virulent exposure groups and several orders of magnitude less than the

435 MN 184-infected group. The titers observed in these attenuated exposure groups then declined to zero on or before day 35 (See Fig. 1).

When comparing the group means after the second exposure, there is a very steep increase in the viral titers of the attenuated groups, whereas the virulent groups show a smaller increase or no increase at all. For example, Abst-1 had a titer of 3.76 logs seven days after the second exposure, whereas MN 184 had a titer of zero. The other attenuated groups peaked three days after the second exposure. The highest titer observed in any virulent group after the second exposure was 1.32 logs seen three days after exposure in JA 142.

440

Virus quantification by Real Time RT-PCR

Levels of viremia were also determined by real time RT-PCR since it was possible that growth on CL2621 cells was not the same for all isolates and because RT-PCR might be a more sensitive measure than growth on cells for viremia. As shown in Fig. 2, virulent exposure groups showed a dramatic increase in average concentration on day 1 and all groups peaked above 8 logs/ml between days 7 and 15. The virulent exposure group concentrations then gradually tapered off through the next several weeks, reaching concentrations below 4 logs/ml by day 49.

445

The attenuated isolate exposure groups showed a much less dramatic increase in concentration that also began around day 1 and the average group titer never reached or exceeded 7 logs/ml (Fig. 2). The concentrations observed for the attenuated exposure groups were maintained at fluctuating levels showing a wide range in values in the weeks following the exposure. The fluctuations were primarily due to sporadically high values in a single pig. The three attenuated isolate exposure groups all peaked on different days of the study. The Ingelvac® PRRS MLV group peaked at a concentration of 4.31 logs/ml on day 28, the Ingelvac® PRRS ATP group peaked at 6.58 logs/ml on day 3, and the Abst-1 group peaked at 6.85 logs/ml on day 35, which was the highest titer achieved by an attenuated isolate (Fig. 2). Additionally, the

450

455

average concentration of the virulent isolate groups were observed to be significantly higher (P<0.05) than the average concentration of the attenuated isolate groups on days 3 and 15, but on day 49 the average concentration of the virulent isolate groups was significantly lower (P<0.05) than that of the attenuated isolate groups.

HerdChek® PRRS ELISA 2XR

As shown by Fig. 3, the humoral immune response to PRRSV, as measured by HerdChek® PRRS ELISA 2XR S/P ratios, showed that the virulent isolate exposure group averages rose above the 0.4 cutoff for a positive result on day 15. By contrast, the attenuated isolate exposure group averages were negative and all three groups remained below 0.4 until after day 21. The Ingelvac® PRRS MLV and Ingelvac® PRRS ATP groups showed positive results on day 28, but the Abst-1 group did not show an average S/P ratio over 0.4 until day 42.

In comparing the humoral response of groups infected with virulent isolates or the pool to groups inoculated with attenuated isolates, it was clear that the kinetics and magnitude of the antibody response was associated with the level of viremia, particularly between 14 and 35 days after infection. This observation is further supported by the correlation between viremia levels and humoral antibody responses determined by paired comparisons of HerdChek® PRRS ELISA 2XR S/P ratios to either virus titration or RT-PCR. Figs. 4 and 5 show that the humoral antibody response is closely associated with viral load over the entire study period with a correlation coefficient $r=0.858$ for virus titration and $r=0.794$ for RT-PCR. These associations were highly significant ($p<0.0001$ in each case). Moreover, attenuated isolates show low antibody responses and viral loads, whereas virulent isolates show high responses.

PRRSV Protein-Specific ELISA

To gain additional insight into the relationship between differences in PRRSV inocula and humoral immune responses, the antibody titers against N, the major structural protein, and

nsp 4, an essential but minor nonstructural protease, were determined. Fig. 6a illustrates that the kinetics of the nucleocapsid anti-N IgG response were nearly identical in all groups of pigs, with a peak titer on day 28 followed by a sharp decline in the next 7-14 days, after which the levels were maintained or rose slightly between days 42 and 49.

The magnitude of the response for each isolate was similar to that found in the HerdChek® PRRS ELISA 2XR results, and consistent with the levels of viremia. The lowest peak titers at day 28 were observed in the groups inoculated with attenuated isolates, and the highest titer was attained in pigs infected with the highly virulent MN 184 isolate. By day 49 the anti-N titer was equivalent in all groups except for MN 184 and the pool, suggesting that the humoral response to MN 184 may be qualitatively different. Additionally, only 5 pigs survived to day 49 in each of these two groups, which is reflected in the increased standard error at day 49 in the MN 184 group.

As shown by Fig. 6b, the IgG response to nsp 4 was substantially different than to N. No anti-nsp 4 antibody was detected before day 21, the overall response was much weaker, and no significant response was detected in the groups receiving Ingelvac® PRRS MLV and Abst-1. Moreover, the magnitude of the anti-nsp 4 response was not associated with level of viremia. The responses to VR 2332, JA 142, MN 184, and the pool were all equivalent, with a peak at day 28, followed by a decline at day 35, then rising again at day 42, whereas the magnitude, time course and duration of viremia varied among these four groups. Fig. 7 illustrates that when examining the repeated measures analysis, data for the nsp 4 ELISA compared to the Log₁₀ TCID₅₀/ml data, it can be seen that there is no correlation between level of viremia and nsp 4 humoral antibody response. There was also very little secondary response following the second exposure on day 49 to isolate MN 184.

Body weight

There was no significant difference in the mean weight of any of the groups on day 0 of the experiment (P = 0.099). On day 49 pigs inoculated with the attenuated isolate Abst-1 had the highest mean weight, which was significantly higher than all other groups except for the control group (Table 3). Also, on day 49, the mean weights of all the virulent isolate exposure groups except for the 17198-6 group were significantly lower than the control group (Table 3). The mean weights of the attenuated isolate exposure groups Ingelvac® PRRS MLV and Ingelvac® PRRS ATP and the control group were statistically equivalent (Table 3).

Table 3. Average Body Weights.

<u>Isolate</u>	<u>Day 0</u>	<u>Day 49</u>
VR 2332	6.38 ¹	33.5 ^b
Ingelvac® PRRS MLV	6.56	34.6*
JA 142	6.42	32.7 ^b
Ingelvac® PRRS ATP	6.24	35.0*
SDSU-73	6.59	32.9 ^b
Abst-1	6.69	39.4 ^a
MN 184	6.73	23.7 ^c
17198-6	6.36	34.5*
Pool**	6.51	23.0 ^c
<u>Control</u>	<u>6.48</u>	<u>38.4*</u>

¹ Weights are in kg. There were no significant differences in mean wt at day 0.
* Indicates statistically equivalent weights among these groups on day 49.
** Pool was a mixture containing all eight isolates.
^a Significantly greater than all groups except the Control group (p<0.05).
^b Significantly less than the Control group.
^c Significantly less than all other groups.

Clinical Scores

Increases in average clinical scores were observed in only four of the virulent exposure groups: JA 142, SDSU 73, MN 184, and the Pool. These higher scores were maintained

throughout the study while the remaining groups, both virulent and attenuated exposures, had essentially normal clinical scores for the duration of the study. The only major cause of changes in the average clinical scores observed in this study occurred when one or more animals died in the associated treatment group (Table 4).

Table 4. Mortality of Pigs after Exposure

	<u>Group</u>	<u>Isolate</u>	<u>Mortality</u>	<u>Day(s) of Death(s)</u>
545	1	VR 2332	0/10	N/A
	2	Ingelvac® PRRS MLV	0/10	N/A
	3	JA 142	1/10 = 10%	17
	4	Ingelvac® PRRS ATP	0/10	N/A
	5	SDSU 73	2/10 = 20%	9, 23
550	6	Abst-1	0/10	N/A
	7	MN 184	5/10 = 50%	14, 14, 17, 23, 41
	8	17198-6	0/10	N/A
	9	Pool**	5/10 = 50%	12, 16, 17, 21, 21
	10	<u>Controls</u>	<u>2/10*</u>	<u>41, 48</u>
555		Attenuated PRRSV	0/30 = 0%	
		Virulent PRRSV	13/60 = 22%	

All deaths in treatment groups were attributed to moderate or severe non-suppurative interstitial pneumonia due to PRRSV with secondary bacterial infection.

* Deaths attributed to bacterial pneumonia with no PRRS involvement.
** Pool was a mixture containing all eight isolates.

The severity of clinical disease was highly associated with viral load (p<0.001 for virus titration). As shown in Fig. 8, the clinical scores were highest for the groups infected with MN 184 and the Pool. Fifty percent of the pigs in each group died, and virus titration indicated that the level of infection was substantially higher than for all other groups. The differences in viral load as determined by RT-PCR were less marked (data not shown) and the

correlation of clinical signs with viral load by RT-PCR was less than with virus titration ($r=0.556$ versus $r=0.803$, respectively). The clinical scores in group 10 (Control) increased after the death of two pigs from bacterial pneumonia. Both pigs were shown to be PRRSV negative by immunohistochemical staining of lung tissue, negative virus isolation and real-time PCR analyses, and the complete lack of seroconversion by HerdChek® PRRS ELISA 2XR or protein-specific ELISA. Later findings indicated that various bacterial pathogens were present in animals that died unexpectedly during the study these deaths were likely attributed to secondary bacterial infection (Table 5).

Table 5. Cause of Mortality after Exposure

<u>Pig #</u>	<u>Group</u>	<u>Cause of Death</u>	<u>Day of Death</u>
993	JA 142	PRRS & <i>Streptococcus suis</i>	17
948	Neg Control	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> & <i>Pasteurella multocida</i>	41
983	Neg Control	<i>A. pyogenes</i> & <i>P. multocida</i>	48
922	SDSU 73	PRRS and bacterial pneumonia*	9
918	SDSU 73	PRRS and <i>Escherichia coli</i>	23
973	MN 184	PRRS and <i>Actinobacillus suis</i>	14
992	MN 184	PRRS and <i>A. suis</i>	14
980	MN 184	PRRS and <i>E.coli</i>	17
971	MN 184	PRRS and <i>E.coli</i>	23
958	MN 184	PRRS and <i>E.coli</i>	41
976	Pool	PRRS and <i>A. suis</i>	12
970	Pool	PRRS and <i>V. S. suis</i>	16
972	Pool	PRRS and <i>S. suis</i>	17
995	Pool	PRRS and <i>S. suis</i>	21
969	Pool	PRRS and <i>A. pyogenes</i>	21

* The diagnostic report indicated "bacterial pneumonia" with no specific agent listed.

595 **Immunohistological evaluation of lungs**

 Although the mean IHC scores and PRRSV lesions observed for individual groups were not significantly different, a significant difference was seen when comparing IHC scores according to virulence. For mean IHC scores and PRRSC lesions see Fig. 9 and Table 6.

600 **Table 6: Mean IHC Scores Based on Virulence.**

Variable	AVIR Mean	VIR Mean	ANOVA p Value
IHC	2.36	1.49	<0.0001*

 * = Significant at $p \leq 0.05$

605 **Discussion**

 One objective of this example was to examine various PRRSV isolates with known levels of virulence to determine if there was a relationship with *in vivo* replication that could be used to predict the virulence of PRRSV isolates without the necessity of performing controlled challenge experiments. Additionally, it was of interest to determine the relationship between
610 isolate virulence, levels of viremia, and the humoral antibody response. Finally, it may be of interest to develop vaccines against the PRRSV isolates that are found to be virulent using the methods of the present invention. It would be a goal to have such vaccines provide some degree of protection against other virulent isolates; however, such cross-effectiveness may not be universal for all PRRSV isolates and further testing would be required. However, it is clear that
615 the present invention provides an effective tool for identifying prime candidates for vaccine development.

 In order to test PRRSV isolates under the same conditions it was necessary to use dosages of licensed vaccines that were below the minimum immunizing dose established with the USDA and that were not representative of a commercial dose. Also, the intranasal route of

620 administration of the MLV vaccines used in the study was not in accordance with the USDA
label and was only used to mimic a more natural exposure. The typical commercial dose of the
modified live PRRS vaccines (Ingelvac PRRS and Ingelvac PRRS ATP) is much higher than
what was used in this experimental trial. These experimentally low doses of modified live PRRS
vaccine do not represent the actual product dosage and form used in the field and readily explains
625 the reported serological response. Using a commercial dose of vaccine, serological titers as
measured via the IDEXX assay would be detectable by day 14. In this trial using titers of
approximately 3 logs, this serological response was delayed and lower. This was to be expected,
but was done to insure consistency of titer administration between groups and to facilitate the
analysis and comparison between virulent and attenuated isolates. Although not specifically
630 addressed in this Example, the effect of dose is likely much more significant for an attenuated
or less virulent virus than it is for a virulent field virus that can quickly grow in and be recovered
at over 4 logs/ml in pig serum within 3-7 days of exposure. The higher recommended
intramuscular commercial dose gives HerdChek® PRRS ELISA 2XR S/P ratios above the 0.4
cutoff by 14 days post vaccination which is one-half the amount of time observed for the doses
635 used in this study (Roof et al., 2003). The nominal dose used in this study, 2×10^3 TCID₅₀ per
animal, caused 50% mortality in groups that received isolate MN 184, and anti-nucleocapsid
responses in all groups. Higher doses were not tested since excessive mortality in groups
challenged with highly virulent isolates would have compromised the study objectives. In
addition, previous studies had shown no difference in clinical signs and viremia in young pigs
640 inoculated with PRRSV isolate VR2332 at doses of $10^{1.2}$, $10^{3.2}$ and $10^{4.2}$ TCID₅₀ per animal.

Both the Log₁₀ TCID₅₀/ml and real time RT-PCR results showed that the viremia levels
vary significantly among groups following PRRSV exposure. This indicates that the growth rate
of PRRSV in pigs is a phenotypic characteristic of the virus independent of possible variation

in pig susceptibility to infection. In addition, attenuation of PRRSV by adaptation to growth on
645 CL2621 cells reduced not only its ability to grow in pigs, but altered the kinetics of viral
replication so that peak viremia occurred at later times. A similar observation was also made by
Chang et al. (2002), who showed that even a limited period of cell culture passage of the
moderately virulent PRRSV isolate VR 2332 reduced viral growth in pigs and delayed
significantly the time to peak viremia. However, a delayed time to peak viremia is not diagnostic
650 for *in vitro* cell culture passage or for attenuation, since the highly virulent isolate 17198-6 also
showed a delayed time to peak viremia.

Overall, virulent isolates showed substantially higher viremia levels in serum than did
attenuated isolates at equivalent doses of inoculation. For example, the highest observed virus
titer in any of the attenuated isolate exposure groups was 1.22 logs on day 15 in pigs given
655 Ingelvac® PRRS ATP, whereas the lowest titer of any virulent group on day 15 was 2.40 logs
in the SDSU 73 group. The peak of viremia at days 3-7 and the levels of virus detected (all >3.5
logs/ml) was highly consistent among virulent PRRSV isolates, though MN 184 was significantly
greater in its magnitude and duration, with virus titers still present on days 28 and 35. This
supports the concept that highly virulent PRRSV isolates replicate to a substantially higher titer
660 *in vivo* than do attenuated or lowly virulent isolates, but they do not establish a direct quantitative
relationship between level of virulence and level or rate of *in vivo* growth among wild-type
PRRSV (Haynes et al. 1997). The groups showed a wide variety of protection from the second
exposure with the MN 184 isolate. For example, there was no virus detected in the MN 184 or
pool group, both of which received the MN 184 isolate initially. It can be seen that Abst-1
665 confers very little protection following exposure to MN 184. These observations further solidify
the concept that homologous exposure confers more protection than does heterologous exposure.

The homologous virulent exposure was more protective and the heterologous virulent exposure was less protective, but still more protective than the heterologous attenuated exposure.

The real time RT-PCR results were statistically very similar to the Log₁₀ TCID₅₀/ml results, indicating that both methods measure relative levels of infectious virus among groups. The Pearson correlation coefficient between the RT-PCR and Log₁₀ TCID₅₀/ml day 7 data was 0.89 and for the average real time RT-PCR and Log₁₀ TCID₅₀/ml results was 0.88. The concentration values determined by real time RT-PCR may have been several orders of magnitude higher than log₁₀ TCID₅₀/ml values for several reasons, including differences between the frequency of viral particles containing the target amplicon and particles that are fully infectious on CL2621 cells, and the presence of neutralizing antibodies that could lower infectivity (Dianzani et al., 2002). However, neutralizing antibody is unlikely to account for the difference, because it was observed at all time points, including times before which an anti-PRRSV antibody response had been produced.

The copies/ml values determined by real-time PCR were higher than the infectious titer values measured in cell culture by TCID₅₀/ml. This is because a standard curve based on the copies of genome of the virus is routinely used for quantitative PCR which directly amplifies a genomic sequence of the virus rather than known infectious virions. Biologic assays such as cell culture do measure the presence of infectivity, however, they may not count all of the infectious particles present in a preparation. Factors that could affect the infectious titer such as cell culture conditions and *in vivo* antibodies, which may neutralize virus, have been observed in other studies, underestimating the amount of infectious virus measured in TCID₅₀/ml in sera. Alternatively, some non-infectious or replication-defective virus may be present which would be reflected by higher copy numbers.

40

In general, the ELISA observations support the concept that the magnitude of the humoral immune response is related to the level of viral replication during acute infection. The trend indicated in Figs. 4 and 5 illustrates this relationship. A slower and less intense humoral immune response was triggered by the cell-culture attenuated virus isolates, whereas a faster and more intense humoral immune response was triggered by the virulent isolates. In addition these observations also demonstrate that at least two factors, isolate type and infectious dose, impact relative S/P ratio values in the HerdChek® PRRS ELISA 2XR. Although the ELISA results shown in Fig. 3 indicate a clear positive or negative average group response, it is important to note the variability among individual animals. Some pigs within attenuated virus groups were positive before day 21, and some pigs in the virulent groups remained negative up to day 21.

Analysis of specific antibody responses to N and nsp 4 show that immune responses to PRRSV vary in intensity independently of the inoculating isolate. Antibody responses to the N protein in animals that were inoculated with the highly virulent isolates MN 184 and JA 142 showed a trend similar to that of all the isolates but to a higher magnitude. Pigs inoculated with MN 184 and JA142 also had the highest viral titers, as shown in Figs. 1 and 2. This indicates that the level of humoral immune response may be related to the viral load in acute infection as measured by viral titer. Interestingly, the time course of response was the same in all groups, even though the time to peak titer was delayed for highly virulent isolate 17198-6 and the attenuated isolates. The nsp 4 antibody response, by contrast, was low at all of the time points and for all of the isolates, both attenuated and virulent. The time course of anti-nsp 4 response was equivalent in all of the groups despite differences in the time to peak viral load among groups, as observed for the anti-N antibody response. All pigs had low anti-nsp 4 responses as shown in Fig. 7.

41

These observations indicate that some of the PRRSV proteins elicit a more robust response from the host immune system regardless of exposure isolate virulence. However, the observations also indicate that the magnitude of the immune response to the more immunogenic proteins is likely related to the virulence of the exposure isolate, or the ability of the isolate to replicate *in vivo*. It also is possible that differences in antibody response might be due simply to genetic differences among isolates that result in differences in antigenic reactivity such that antibodies directed against N and nsp 4 of other isolates do not react or react poorly to the recombinant proteins expressed from isolate VR2332 that were used to coat the ELISA plates. However, several lines of evidence suggest that the observed differences in antibody levels reflect immunologically relevant responses. Isolate MN 184 shows the greatest genetic difference from VR2332, as determined by ORF 5 comparisons, yet has the highest anti-N antibody response. Kapur et al. (1996) showed previously that relative differences among PRRSV isolates in one open reading frame are also present in other open reading frames. Additionally, individual proteins contain conserved and nonconserved regions (e.g. Kapur et al., 1996) and extensive immunogenic reactivity may be directed toward the conserved epitopes (Ostrowski et al., 2002). Nevertheless, ELISA results based on antibody reactions with purified PRRSV proteins may be affected by genetic and antigenic variation, and these effects must be considered. Refolding of recombinant proteins was performed, but no differences were observed between ELISA plates coated with nonrefolded or refolded proteins.

It was noted that at approximately 4 to 5 weeks after inoculation, a relatively large decrease in the antibody response to both the N and nsp 4 proteins occurred. A similar peak of 1 to 2 weeks followed by a decline of antibody reactivity was previously noted by Foss et al. (2002) for GP5, the major envelope glycoprotein. Taken together, these observations suggest that the response to individual viral proteins likely does not represent the full picture of the pig's

immune response to PRRSV since the humoral immune response as measured by the HerdChek® PRRS ELISA 2XR does not show a similar transient peak of antibody reactivity.

Reduced growth and mortality were the key correlates of virulence and viral *in vivo* growth rate. The lower mean weight observed in the virulent isolate exposure groups most likely reflected a difference in the ability of a PRRSV isolate to replicate *in vivo* and induce a more severe illness in the pig. These observations are consistent with previously reported data that PRRSV infection may cause anorexia with a 25 to 40 percent reduction in daily weight gain (Thacker, 2003). The clinical scores of animals exposed to the virulent isolates showed rapid increases shortly after the inoculation, whereas there was virtually no change in the scores of the attenuated virus exposure animals. This increase in clinical signs was reflected in the observed death rates of 50%, 20%, and 10% in the virulent exposure groups receiving PRRS isolates MN 184, SDSU 73, and JA 142, respectively. In contrast, the attenuated exposure groups incurred no deaths. The relationship between rapid viral growth and viral pathogenesis under the same conditions of viral exposure were most evident in comparing the groups exposed to MN 184 and Abst-1. The inoculation titers were virtually the same, 4.10 logs/ml and 4.18 logs/ml, respectively, and yet, as indicated in Fig. 8, there were remarkable differences in the way the two isolates affected pigs. The Abst-1 isolate was nearly inert, it hardly replicated *in vivo* and caused no clinical signs. By contrast, the MN 184 isolate replicated to extremely high titers *in vivo* and caused severe clinical signs, resulting in the death of 50% of exposed animals. Also notable, the group of pigs exposed to the pool of all virus isolates showed about the same virological, clinical, and immunological responses as pigs exposed to MN 184. This finding indicates that the most rapidly replicating virus in a mixed infection is likely to outcompete other isolates so that the net result is essentially the same as an infection with the single isolate having the highest growth potential.

The notable *in vivo* differences between virulent and attenuated PRRSV isolates shed light on the relationship between the virulence of an isolate and its *in vivo* growth and replication. When administered at equivalent doses in pigs, the more virulent isolates show Log₁₀ TCID₅₀/ml titers and RT-PCR concentrations that are exponentially higher than the attenuated isolates. The virulent isolates induce a more rapid and intense humoral immune response. The virulent isolates negatively affect weight gain and induce higher death rates and more severe clinical signs as compared to the attenuated isolates.

In conclusion, the example and tests in the present application indicate that attenuated and virulent PRRSV isolates induce remarkably different clinical signs, as well as immune responses that differ in intensity. These differences are attributed to the ability of the virus to replicate *in vivo*, a phenotypic characteristic that can be measured quantitatively in serum samples and may be developed for predicting the virulence of PRRSV isolates.

EXAMPLE 2

This example provides several methods of attenuating PRRS isolates as well as their inclusion in immunogenic compositions.

Materials and Methods:

A vaccine preparation is formulated incorporating a modified or attenuated live virus for the immunization of swine from infection by PRRS. The PRRSV virus for the vaccine preparation is propagated in the MA-104 continuous cell line, preferably ATCC No. CL2621. The cell line is grown in flasks containing MEM, to which is added 10% fetal calf serum. The pH of the media is adjusted to approximately 7.2, and incubated at approximately 37° C. The cells are then inoculated with the virus by adding about 1 ml of a frozen inoculum to the fluid media. The

785 virus is allowed to absorb onto the cells for 24 hours. At this time, the growth media is changed
to a maintenance media consisting of MEM to which has been added 4% fetal calf serum, pH 7.6.
The environment is preferably between 35°-37° C. The virus is allowed to grow until 50% of the
MA-104 cell sheet is destroyed by the virus. The sample is then frozen down, and prepared for
passage onto another flask of MA-104 cells. This process is continued through 25 passages of
790 the virus in the cell line. The virus is then propagated another 12 times at about 31° C. as
opposed to 35°-37° C., using the same techniques as described above. The 12th passage is frozen
down in small aliquots and designated as the Master Seed Virus.

The following sets forth the details of the preferred method.

I. Media:

- 795 a. Eagles Minimum Essential Medium (MEM) from JRH Biosciences, #200-2041
- b. Fetal calf serum (FCS) from JRH biosciences
- c. Growth media for cell planting-MEM+10% Fetal Calf Serum
- d. Maintenance media-MEM 4% Fetal Calf Serum
- e. Trypsin-Versene DX
- 800 f. Sodium Bicarbonate 5% or saturated

II. Tissue Culture:

Cell line used: MA-104 (African Green Monkey Kidney cells kept within 20 passage
levels (passage 58-78)

805 III. Equipment:

75cm tissue culture flasks

Incubator set at 35°-37° C.

Incubator set at 3° C.

Centrifuge

- 810 IV. Method Used to Attenuate PRRSV Virus Grown at 25°-37° C.
- A. Preparation of Tissue Culture Stock:
- 5 to 7 day old MA-104 75cm² stock bottles are split 1:4 in the following manner:
- a. Pour off all media (50ml per bottle).
 - b. Remove the cell sheet using 10ml of Trypsin-Versene by incubation at 37° C.
815 for 5-10 minutes.
 - c. Remove cells from bottle and centrifuge 270xg for 5-10 minutes.
 - d. Decant supernatant and resuspend the cells in 5-10ml of growth media (MEM
10% FCS).
 - e. Put all cells into 200ml of MEM 10% FCS which is then dispensed into four
820 75cm bottles, 50ml per bottle for a 1:4 split. Bottles are then kept at 35°-37° C. until needed (can
be done also without CO₂).
 - f. 3 or 4 day old bottles which have formed a full cell sheet are now ready for use.
 - g. Adjust pH of 50ml of media in flask to 7.2 pH and then add 1ml of virus into
media and put flask at 35°-37° C. (can be done also without CO₂).
 - 825 h. After 24 hours, media is discarded and flask is refed with 50ml of MEM 4%
FCS 7.6 pH and put back at 35°-37° C.
 - i. 24 hours after this fluid change, CPE should be showing and, when 50-60%
holes are present in cell sheet, freeze down.
 - j. Thaw out above bottle and take 1ml of this fluid and pass into new 75cm bottle
830 as listed above to make next passage of virus.

This above procedure is carried out for a total of 25 times, grown at 35°-37° C.

Method Used to Attenuate PRRSV Virus Grown at 31° C. Virus passed 25 times at 35°-37°

C. is used to make passage 1 for virus grown at 31° C.

A. Preparation of Tissue Culture Stock:

835 5 to 7 days old MA-104 75cm² stock bottles are split 1:4 in the following manner:

a. Pour off all media (50ml per bottle).

b. Remove the cell sheet using 10ml of Trypsin-Versene by incubation at 37° C.
for 5-10 minutes.

c. Remove cells from bottle and centrifuge 270xg for 5-10 minutes.

840 d. Decant supernatant and resuspend the cells in 5-10ml of growth media (MEM
10% FCS).

e. Put all cells into 200ml of MEM 10% FCS which is then dispensed into four
75cm bottles, 50ml per bottle for 1:4 split. Bottles are then kept at 35°-37° C. until needed (can
be done also without CO₂).

845 f. 3 or 4 day old bottles which have formed a full cell sheet are now ready for use.

g. Adjust pH of 50ml of media in flask to 7.2 pH and then add 1ml of virus into
media and put flask at 31° C. (can be done also without CO₂).

h. After 24 hours, media is discarded and flask is refed with 50ml of MEM 4%
FCS 7.6 pH and put back at 31° C.

850 i. 24 hours after this fluid change, CPE should be showing and, when 50-60%
holes are present in cell sheets, freeze down.

j. Thaw out above bottle and take 1ml of this fluid to make next passage of SIRS
VR-2332 virus.

This above procedure is carried out for a total of 12 times at 31° C. The 12th passage of 31°

855 C. grown virus is designated Master Seed Virus for vaccine production.

Attenuation of PRRS virus by Gene Deletion

One skilled in the art may attenuate PRRSV through the conventional method of gene deletion. Generally, this method involves the deletion of a gene which codes for the virulent phenotypes of the virus. Such a method may be adapted from of such references as Elbers et al. (U.S. Pat. App. No. 20020012670) or Schall et al (U.S. Pat. No. 6,740,324), the teachings and content of which are incorporated by reference herein.

Attenuation of PRRS virus by Temperature-Sensitive Mutation

One skilled in the art may also attenuate PRRSV through the conventional method of temperature sensitive mutation. Generally, this method involves causing a mutation that limits the temperature range in which the virus is active. For example, the method of Skiadopoulos et al., "Identification of Mutations Contributing to the Temperature-Sensitive, Cold-Adapted, and Attenuation Phenotypes of the Live-Attenuated Cold-Passage 45 (cp45) Human Parainfluenza Virus 3 Candidate Vaccine", 73 No. 2 *Journal of Virology* 1374, (February 1999) may be adapted for use with PRRSV. The teachings and content of Skiadopoulos et al. are incorporated by reference herein.

Attenuation of PRRS virus by Generation of an Infectious Clone

One skilled in the art may also attenuate PRRSV through the conventional method of generating an infectious clone. This method generally involves the creation of a full-length cDNA clone of the desired viral genotype, said clone also being virulent in the target animals. For example, the method of Nielson et al., "Generation of an Infections Clone of VR-2332, a Highly Virulent North American-Type Isolate of Procine Reproductive and Respiratory

880 Syndrome Virus", 77 *Journal of Virology* 3702 (Mar. 2003), may be adapted for an attenuated version of PRRSV. The teachings and content of Nielson et al. are incorporated by reference herein.

Attenuation of PRRS virus by Gene Insertion

885 One skilled in the art may also attenuate PRRSV through the conventional method of gene insertion. This method generally involves the insertion of a gene within the virus which inhibits the pathogenic phenotypes of said virus. For example, the method of Schall et al. (U.S. Pat. No. 6,740,324) may be adapted for such an attenuated version of PRRSV. The teachings and content of Schall et al. are incorporated by reference herein.

890

Attenuation of PRRS virus by Substitution

One skilled in the art may also attenuate PRRSV through the conventional methods of codon and base-pair substitution. Generally, codon or base-pair substitution involves substituting a codon or base-pair with a different codon or base-pair such that the viral gene now codes for a protein which limits the pathogenicity of the virus. For example, the method of codon substitution of McAuliffe et al., "Codon Substitution Mutations at Two Positions in the L Polymerase Protein of Human Parainfluenza Virus Type 1 Yield Viruses with a Spectrum of Attenuation In Vivo and Increased Phenotypic Stability In Vitro", 78 *Journal of Virology* 2029 (February 2004) may be adapted to create a gene substitution method for attenuating PRRSV.

895

900 Also, Hurrelbrink and McMinn, "Attenuation of Murray Valley Encephalitis Virus by Site-Directed Mutagenesis of the Hinge and Putative Receptor-Binding Regions of the Envelope Protein", 75 *Journal of Virology* 7692 (August 2001) and Elbers et al. (US Pat. App. No. 20020012670) provide methods of base-pair substitution that may be adapted to create an

attenuated PRRSV isolate. The teachings and content of McAuliffe et al., Hurrelbrink and
 905 McMinn, and Elbers et al. are incorporated by reference herein.

Attenuation of PRRS virus by Use of Chimeric PRRS Constructs

One skilled in the art may also attenuate PRRSV through the conventional method of
 chimeric constructs. Generally, a chimeric construct is one that contains genes from different
 910 species in order to induce an antigenic response in a host cell. For example, such a construct may
 be created by adapting the method of Harris et al. (U.S. Pat. App. No. 20040157307) to create
 a chimeric construct with PRRS genes.

Incorporation of attenuated PRRS isolates into immunogenic compositions:

915 After new isolates are attenuated, preferably by one of the methods noted above, the
 attenuated isolates can be incorporated into compositions effective at providing an immune
 response against virulent isolates of PRRS. In preferred forms, such compositions will provide
 an animal receiving an effective amount of the composition, protective immunity against PRRS
 infection. Such protective immunity will reduce the severity of clinical signs of PRRS infection
 920 in vaccinated animals that are subsequently exposed to or infected by a virulent PRRS isolate.
 Preferably, such clinical signs will be prevented by the administration of an effective amount of
 the immunogenic composition or vaccine. In some forms, the attenuated PRRS isolates will be
 used to produce a modified live virus vaccine, in which the attenuated isolates are used in their
 live state in the immunogenic compositions. In other forms, the attenuated isolates will be killed
 925 or inactivated prior to their incorporation into immunogenic compositions.

References

The teachings and content of each of the following references are incorporated by reference herein.

930

Albina, E., Piriou, L., Hutet, E., Cariolet, R., L'Hospitalier, R., 1998. Immune Responses in Pigs Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 61, 49-66.

935

Andreyev, V. G., Wesley, R. D., Mengeling, W. L., Vorwald, A. C., Lager, K. M., 1997. Genetic Variation and Phylogenetic Relationships of 22 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Field Strains Based on Sequence Analysis of Open Reading Frame 5. *Arch. Virol.* 142, 993-1001.

Cavanagh, D., 1997. Nidovirales: a New Order Comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* 142, 629-633.

940

Chang, C. C., Yoon, K. J., Zimmerman, J. J., Harmon, K. M., Dixon, P. M., Dvorak C. M. T., Murtaugh, M. P., 2002. Evolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus During Sequential Passages in Pigs. *J. Virology.* 76, 4750-4763.

945

Grebennikova, T. V., Clouser, D. F., Vorwald, A. C., Musienko, M. I., Mengeling, W. L., Lager, K. M., Wesley, R. D., Biketov, S. F., Zaberezhny, A. D., Aliper, T. I., Nepoklonov, E. A., 2004. Genomic Characterization of Virulent, Attenuated, and Revertant Passages of North American Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain. *Virology.* 321, 383-390.

950

Dianzani F., G. Anelli, E. Riva, O. Turtiziani, L. Antonelli, S. Tying, D. Carrasco, H. Lee, D. Nguyen, J. Pan, J. Poast, M. Cloyd, S. Baron. 2002. Is Human Immunodeficiency Virus Rna Load Composed Of Neutralized Immune Complexes? *Journal of Infectious Diseases:* 185:1051-1054.

Foss, D.L., Zilliox, M.J., Meier, W., Zuckermann, F., Murtaugh, M.P. 2002. Danger Signals Increase the Immune Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Virus Res.* 15, 557-566.

955

Halbur, P. G., Pallares, F. J., Rathje, J. A., Evans, R., Hagemoser, W. A., Paul, P. S., Meng, X. J., 2002. Effects of Different Us Isolates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) on Blood and Bone Marrow Parameters of Experimentally Infected Pigs. *Vet. Rec.* 21, 344-348.

960

Halbur, P. G., Paul, P. S., Meng, X. J., Lum, M. A., Andrews, J. J., Rathje, J. A., 1996. Comparative Pathogenicity of Nine Us Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Isolates in a Five-week-old Cesarean-derived, Colostrums-deprived Pig Model. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 11-20.

965

Haynes, J. S., Halbur, P. G., Sirinarumitr, T., Paul, P. S., Meng, X. J., Huffman, E. L., 1997. Temporal and Morphologic Characterization of the Distribution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) by in Situ Hybridization in Pigs Infected with Isolates of PRRSV That Differ in Virulence. *Vet. Pathol.* 34, 39-43.

Hill, H., 1990. Overview And History Of Mystery Swine Disease (Swine Infertility And Respiratory Syndrome). In *Mystery Swine Disease Communication Meeting. Denver, CO*, pp. 29-31.

970

Kapur, V., Elam, M.R., Pawlovich, T.M. Murtaugh, M.P. 1996. Genetic Variation In PRRS Virus Isolates In The Midwestern United States. *J. Gen. Virol.* 77, 1271-1276.

Key, K. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Swenson, S. L., Toth, T. E., Meng, X. J., 2001. Genetic Variation And Phylogenetic Analyses Of The Orf5 Gene Of Acute Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Isolates. *Vet. Micro.* 83, 249-263.

- 975 Labarque, G., Van Gucht, S., Van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M., 2003. Respiratory Tract Protection Upon Challenge Of Pigs Vaccinated With Attenuated Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Vaccines. *Vet. Micro.* 95, 187-197.
- Meng, X. J., 2000. Heterogeneity of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Implications for Current Vaccine Efficacy and Future Vaccine Development. *Vet. Micro.* 74, 309-329.
- 980 Mengeling, W. L., Lager, K. M., Vorwald, A. C., Clouser, D. F., 2003a. Comparative Safety and Efficacy of Attenuated Single-strain and Multi-strain Vaccines for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet. Micro.* 93, 25-38.
- Mengeling, W. L., Lager, K. M., Vorwald, A. C., Koehler, K. J., 2003b. Strain Specificity of the Immune Response of Pigs Following Vaccination with Various Strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet. Micro.* 93, 13-24
- 985 Mengeling, W. L., Lager, K. M., Vorwald, A. C., 1998. Clinical Effects of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus on Pigs During the Early Postnatal Interval. *Amer. J. Vet Res.* 59, 52-55.
- Murtaugh, M.P., K.S. Faaberg, J. Laber, M. Elam, and V. Kapur. 1998. Genetic Variation In The PRRS Virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 787-794.
- 990 Murtaugh, M. P., Xiao, Z., Zuckermann, F., 2002. Immunological Responses Of Swine To Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Infection. *Viral Immunology.* 15, 533-547.
- Nodelijk, G., de Jong, M. C. M., van Leengoed, L. A. M. G., Wensvoort, G., Pol, J. M. A., Steverink, P. J. G. M., Verheijden, J. H. M., 2001. A Quantitative Assessment Of The Effectiveness Of PRRSV Vaccination In Pigs Under Experimental Conditions. *Vaccine* 19, 3636-3644.
- 995 Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J. 2002. Identification Of Neutralizing And Nonneutralizing Epitopes In The Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Gp5 Ectodomain. *J. Virol.* 76, 4241-4250.
- 1000 Oprea, T., Halbur, P. G., Yoon, K. J., Pogranichniy, R. M., Harmon, K. M., Evans, R., Key, K. F., Pallares, F. J., Thomas, P., Meng, X. J., 2002. Comparison Of Molecular And Biological Characteristics Of A Modified Live Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Vaccine (Ingelvac PRRS Mlv), The Parent Strain Of The Vaccine (Atcc Vr2332), Atcc Vr2385, And Two Recent Field Isolates Of PRRSV. *J. Virol.* 76, 11837-11844.
- 005 Pejsek, Z., Stadejek, T., Markowska-Daniel, I., 1997. Clinical Signs And Economic Losses Caused By Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus In A Large Breeding Farm. *Vet. Micro.* 55, 317-322.
- Reed, L., Muench, H., 1938. A Simple Method For Estimating Fifty Percent Endpoints. *Am J Hyg.* 27, 493-497.
- 1010 Roof, M.B., Vaughn, E.M., Burkhardt, K.M., Faaberg, K.S. 2003. Efficacy Of Modified Live Virus Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Vaccines Against Heterologous Respiratory Challenge. *Proc. 4th Inter. Symp. Emerging Re-emerging Pig Diseases.* pp. 117-118.
- Thacker, B., 2003. Clinical Manifestations Of PRRS Virus. In: Zimmerman, J., Yoon, K. J. (Eds.), 2003 PRRS Compendium Second Edition. National Pork Board, Des Moines IA USA, pp. 7-12.
- 1015 Thanawongnuwech, R., Halbur, P. G., Ackermann, M. R., Thacker, E. L., Royer, R. L., 1998. Effects Of Low (Modified-live Virus Vaccine) And High (Vr-2385)-virulence Strains Of Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus On Pulmonary Clearance Of Copper Particles In Pigs. *Vet. Pathol.* 35, 398-406.
- 1020

52

Yuan, S., Mickelson, D., Murtaugh, M. P., Faaberg, K. S., 2001. Erratum To "Complete Genome Comparison Of Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Parental And Attenuated Strains". *Virus Research*. 79, 189-200.

We Claim:

1. A method of predicting the virulence of a PRRS virus isolate of unknown virulence, comprising the steps of administering a quantity of said PRRS virus isolate into PRRS-free swine, allowing the virus to replicate in said swine for a period of from about 3-15 days, measuring the rate of virus growth and/or the magnitude of viremia during said period, and comparing said rate of growth or viremia magnitude with the rate of growth and/or viremia magnitude of a PRRS virus isolate of known virulence as a predictor of virulence of the PRRS isolate of unknown virulence.
1030
2. The method of claim 1, said period being between from about 3 to 7 days.
3. The method of claim 1, including the step of measuring the magnitude of viremia during said period, and comparing such magnitude with the viremia magnitude of said known PRRS virus isolate.
1035
4. The method of claim 1, said quantity of administered virus being similar to the amount an animal would receive by natural exposure.
5. The method of claim 1, said PRRS virus being administered by a method selected from the group consisting of oral, intranasal, intramuscular, intra-lymph node, intradermal, intraperitoneal, subcutaneous, and combinations thereof.
1040
6. The method of claim 1, said rate of growth or viremia magnitude being measured in a biological sample from said swine.
7. The method of claim 1, said viremia being measured by Log_{10} TCID₅₀/ml, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, PRRS specific ELISA, PRRS protein-specific ELISA, and combinations thereof.
1045
8. The method of claim 1, further including the step of observing said swine for clinical signs of PRRS infection after administration of said PRRS isolate.

54

1050 9. The method of claim 8, said clinical signs including respiratory signs, behavior, coughing, and combinations thereof.

 10. The method of claim 1, further including the step of predicting that the PRRS isolate will be of high virulence when its rate of growth or viremia magnitude are similar to that of a isolate with high virulence.

1055 11. The method of claim 1, further including the step of predicting that the PRRS isolate will be of low virulence when its rate of growth or viremia magnitude are similar to that of a isolate of low virulence.

 12. The method of claim 1, said administered amount of PRRS virus being up to about 5 ml of inocula having a viral concentration of up to 5.0 Log₁₀ TCID₅₀/ml.

1060 13. An immunogenic composition comprising an attenuated PRRS virus isolate and a pharmacologically compatible carrier, said attenuated isolate being selected from the group consisting of Abst-1, and attenuated forms of a PRRS virus predicted to be virulent by the method of claim 1.

 14. The composition of claim 13, said attenuated isolate being Abst-1.

1065 15. The composition of claim 13, said PRRS virus predicted to be virulent by the method of claim 1 being selected from the group consisting of ATCC VR-2332, ATCC PTA-6504, ATCC PTA-6319, ATCC PTA-6321, and ATCC PTA-6322.

1070 16. A method of selecting a PRRS virus isolate for attenuation and inclusion in an immunogenic composition comprising the steps of:

- a) obtaining a PRRS isolate of unknown virulence;
- b) administering a quantity of said PRRS virus isolate into a PRRS-free swine;

55

- 1075
- c) allowing said isolate to replicate in the swine for a period of from about 3-15 days;
 - d) measuring the rate of virus growth and/or the magnitude of viremia during said period;
 - e) comparing said rate of growth or viremia magnitude with the rate of growth and/or viremia magnitude of a PRRS virus isolate of known virulence; and
 - 1080 f) selecting an isolate for attenuation and inclusion into an immunogenic composition based on its rate of growth and/or its viremia magnitude in comparison to isolates of known virulence.

1085 17. The method of claim 16, step (f) further including the step of selecting an isolate having a similar rate of growth and/or viremia magnitude to a highly virulent isolate.

18. The method of claim 16, further including the step of attenuating the selected virus.

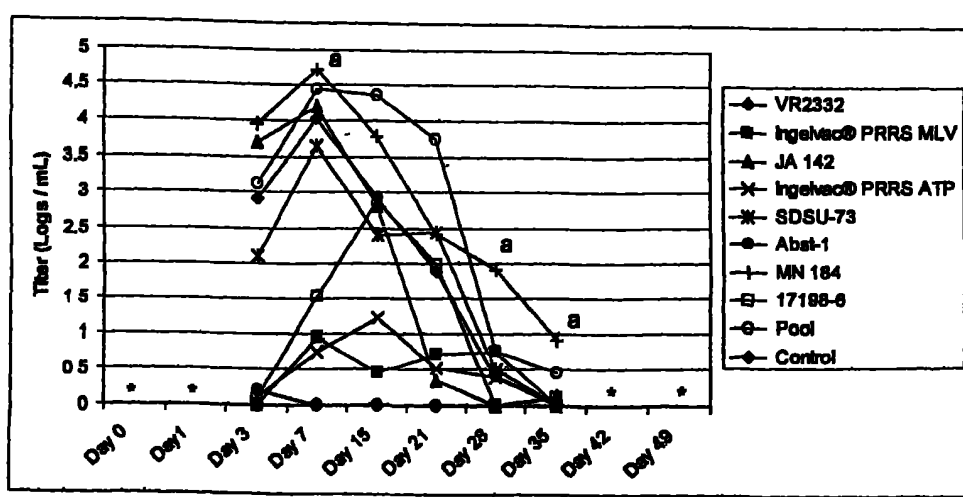
1090 19. The method of claim 18, said virus being attenuated by a method selected from the group consisting of repeated serial passage in cell culture, gene insertion, gene switching, gene deletion, base-pair substitution, and temperature-sensitive mutation.

1095 20. The method of claim 18, further including the step of incorporating said selected virus in an immunogenic composition.

8

W/O 2006/044319

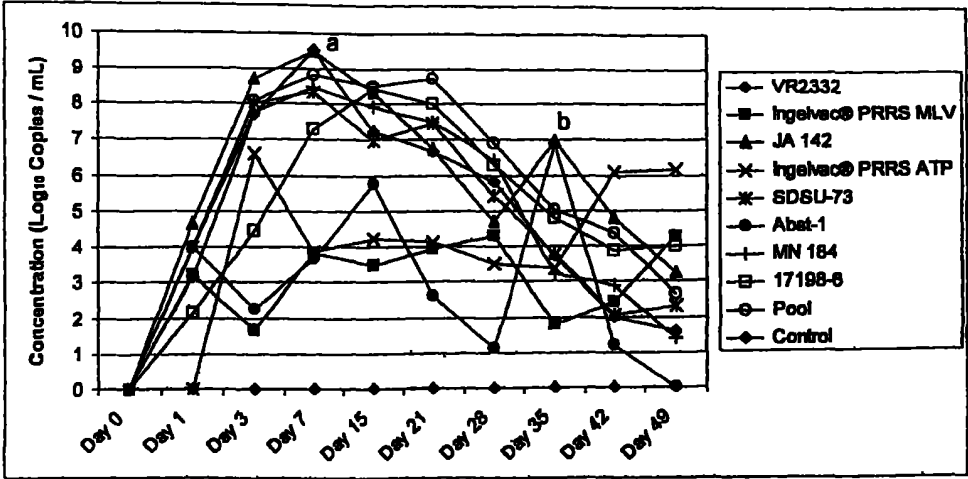
Fig. 1



PCT/US2006/033760

8

Fig. 2

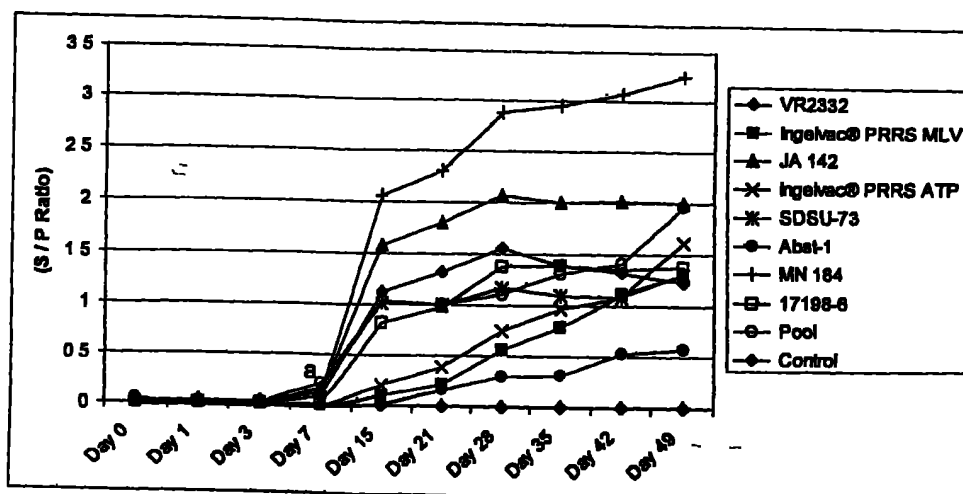


57

Sp

W/O 2006/03/31/19

Fig. 3



PCT/US2005/033760

Sp

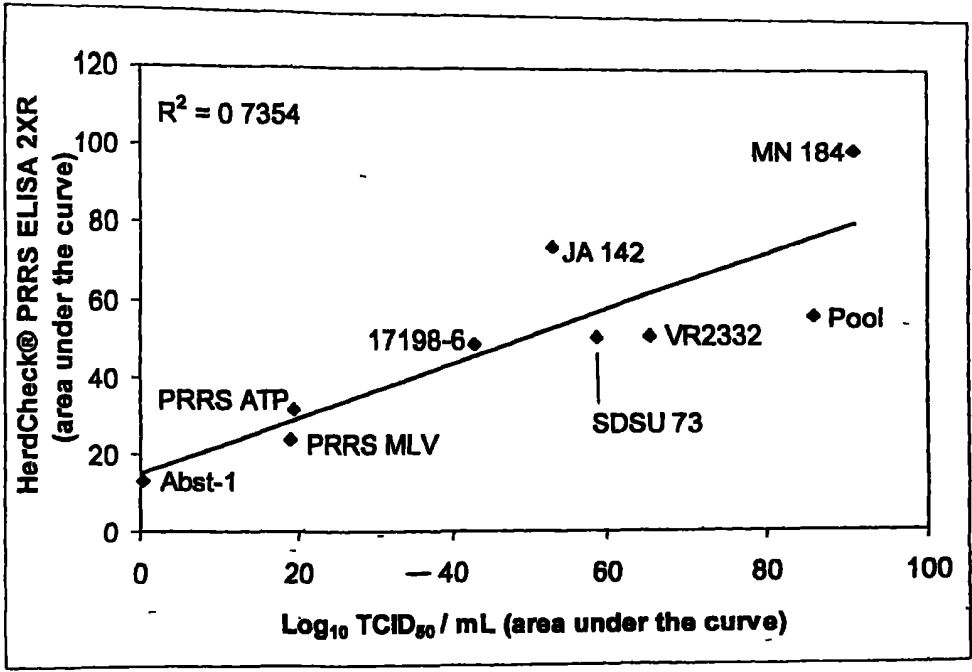
59

Fig. 4

W/O 2006/034319

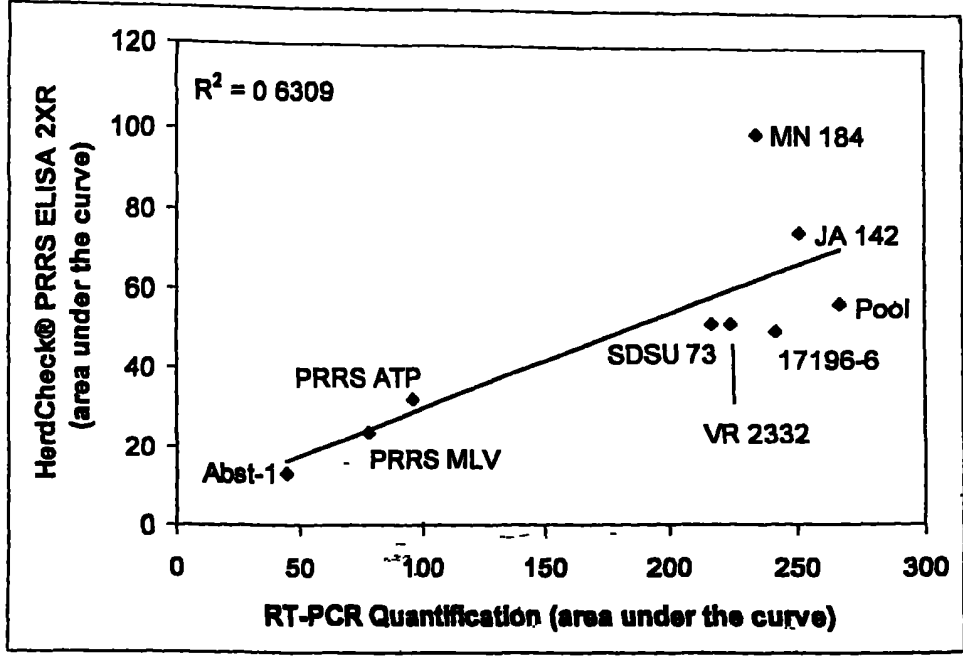
PCT/US2005/033760

4/10



59

Fig. 5



WFO 2006034319

PCT/US2005/033760

5/15

160

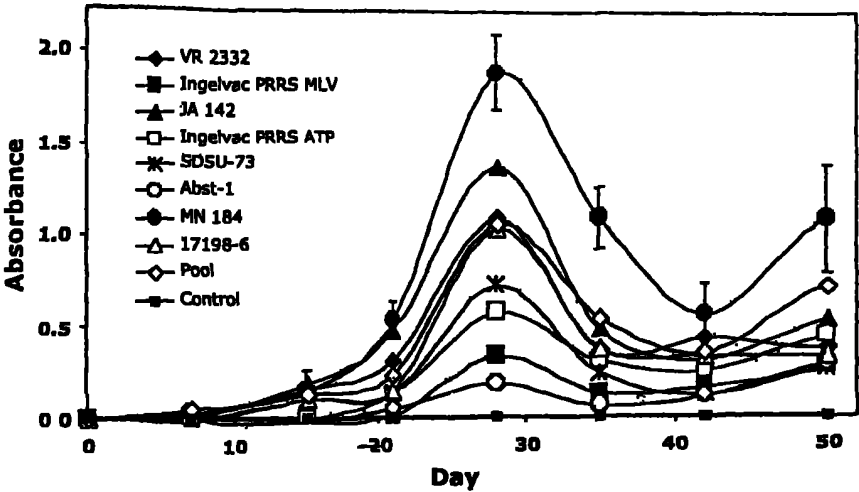
67

Fig 6 a

WO 2006/034319

PCT/US2005/033760

01/9



67

62

Fig. 6 b

W/O 2006/034319

PCT/US2005/033760

62

7/10

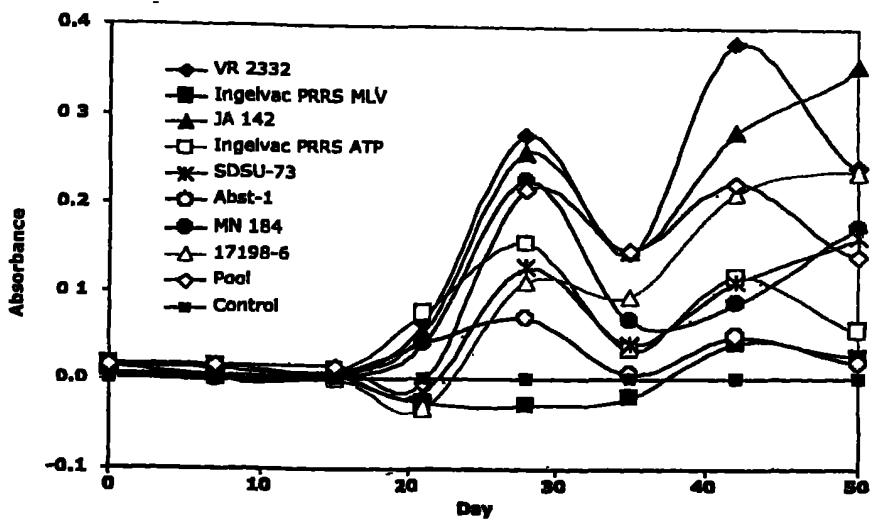
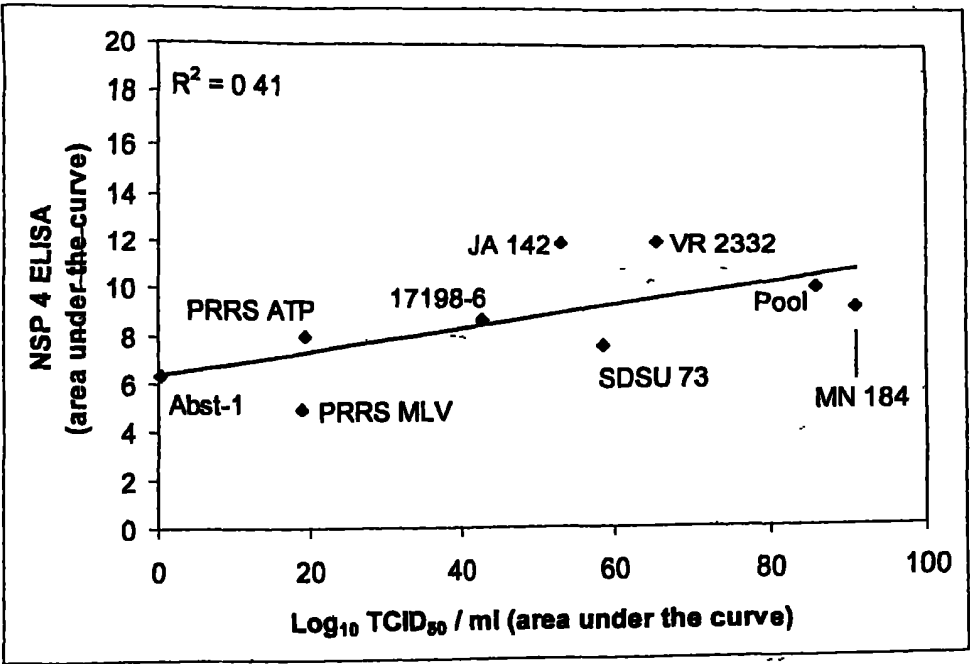


Fig. 7



8/18

W/O 2006/03/319

PCT/US2005/033760

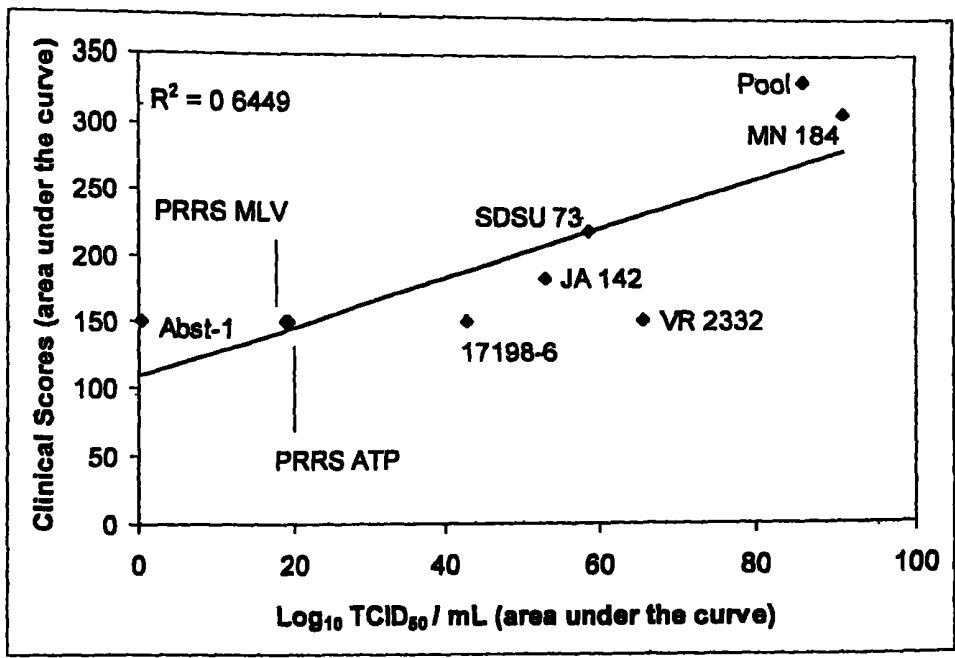
18

69

Fig. 8

W/O 2006/034319

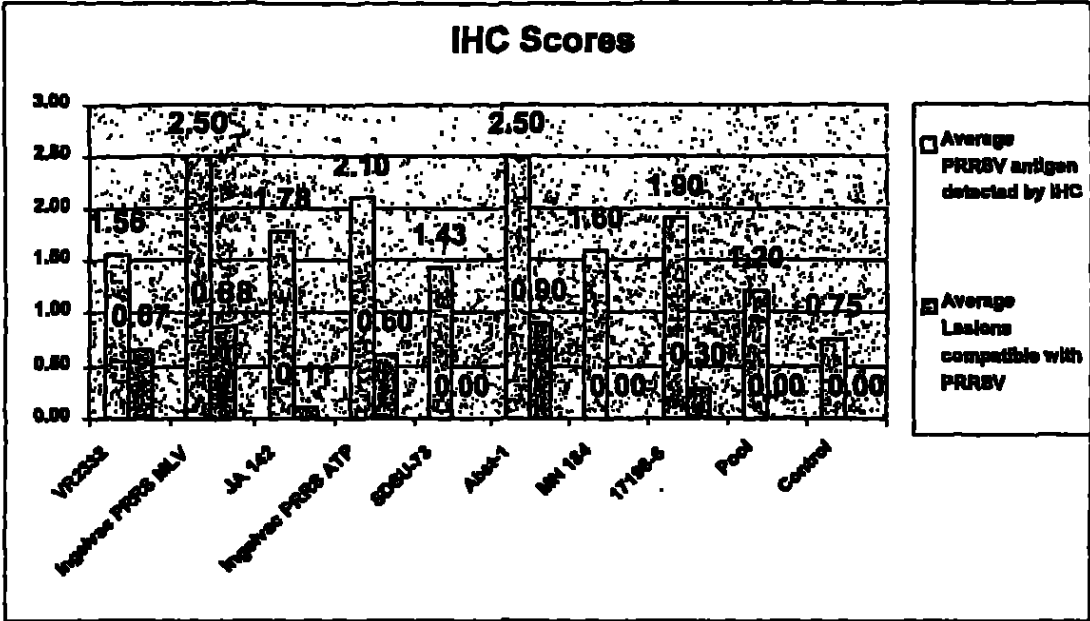
PCT/US2005/033760



9/10

9

Figure 9: Average IHC Scores



**AI SLAD S DE VIRUS DEL SÍNDR ME REPR DUCTIV Y RESPIRATORI
PORCINO Y MÉTODOS DE USO
SOLICITUDES RELACIONADAS**

La presente solicitud es una continuación en parte de la solicitud de número de serie 11/022.262, presentada el 23 de diciembre, 2004, la cual reivindica el beneficio de la solicitud provisional de número de serie 60/611.824, que se presentó el 21 de septiembre, 2004. Las enseñanzas y contenido de cada una de estas solicitudes anteriores se incorporan por referencia en esta memoria.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos aislados de virus del SRRP de tipo salvaje aislados y a los correspondientes virus del SRRP atenuados mejorados, a los usos de dichos virus atenuados en vacunas y composiciones inmunológicas, así como a métodos para medir la magnitud de la viremia, tasa de crecimiento, respuesta de anticuerpos, y a sus combinaciones en dichos aislados y virus. Más particularmente, la presente invención proporciona métodos para predecir la virulencia de aislados de virus del SRRP nuevos o previamente no caracterizados, y la atenuación y el uso de dichos aislados en vacunas y composiciones inmunológicas.

Descripción de la Técnica Anterior

20 El virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (VSRRP) es un virus de ARN monocatenario con envuelta clasificado en la familia de Arteriviridae (Cavanaugh, 1997). Causa una enfermedad del cerdo muy extendida que se describió por primera vez como la "enfermedad misteriosa del cerdo" en EE.UU. en 1987 (Hill, 1990). La enfermedad se manifiesta como una enfermedad respiratoria en todos los **25** grupos de edad del cerdo, que conduce a la muerte en algunos cerdos más jóvenes y a problemas reproductivos graves en hembras en edad de reproducción.

La naturaleza dinámica del VSRRP permite un cambio constante de la enfermedad y proporciona una amplia oportunidad para la aparición de nuevos aislados (Andreyev et al., 1997; Murtaugh et al. 1998; Meng, 2000). El hecho de que el VSRRP cambie tan fácilmente, junto con su capacidad para producir problemas devastadores para los productores de cerdos, hace que este virus sea un objetivo importante para la investigación (Mengeling et al., 1998; Pejsak et al., 1997) y para el desarrollo de vacunas y otros métodos para reducir los efectos de la infección. La variación en los niveles de virulencia de los aislados se demostró en lesiones pulmonares y muerte de cerdos (Halbur et al., 1996), pero los esfuerzos para ligar las **35** diferencias biológicas e inmunológicas a diferencias genéticas específicas no han

tenido éxito en gran medida (Albina et al., 1998; Key et al., 2001; Yuan et al., 2001; Murtaugh et al., 2002; Grebennikova et al., 2004). Los estudios para examinar la seguridad y la eficacia de las vacunas del SRRP incluyen el trabajo de Labarque et al., (2003), Mengeling et al., (2003a), y Nodelijk et al. (2001). Estos estudios muestran
5 que en condiciones experimentales, las vacunas de SRRP vivas modificadas reducen la cantidad y duración de la viremia, así como la fiebre y lesiones pulmonares después de una exposición virulenta.

Opriessing et al. (2002) mostraron que los aislados con una secuencia de aminoácidos con alta homología en el marco de lectura abierto 5 (ORF5) producían
10 niveles significativamente diferentes de neumonía en cerdos. A la variación de las respuestas del cerdo al VSRRP también le afecta la variación de hospedante (Mengeling et al., 2003b). La virulencia se ha examinado en relación con las tasas de replicación y distribución del VSRRP en cerdos (Haynes et al., 1997), las capacidades de depuración de cobre de macrófagos (Thanawongnuwech et al., 1998), y los niveles
15 de anemia del animal hospedante (Halbur et al., 2002). Sin embargo, estos métodos no han logrado proporcionar métodos eficaces para predecir la virulencia de aislados de VSRRP nuevos o no caracterizados previamente.

Por consiguiente, lo que se necesita en la técnica es un método para predecir la virulencia de los aislados de VSRRP. Lo que se necesita además en la técnica es un
20 método para predecir la virulencia de aislados de VSRRP basándose en la tasa de crecimiento del virus del SRRP in vivo y/o en la magnitud de la viremia en un cerdo después de administración o exposición del aislado a un cerdo que previamente no tenía SRRP.

SUMARIO DE LA INVENCION

25 La presente invención supera los problemas resumidos antes y proporciona nuevos aislados de virus del SRRP de tipo salvaje aislados, versiones atenuadas de dichos virus, y las correspondientes vacunas que comprenden los virus del SRRP atenuados en composiciones farmacéuticas. Con más detalle, los virus de tipo salvaje de la presente invención se denominan SDSU 73, 17198-6 y MN 184, y sus mezclas.
30 Las versiones atenuadas de estos aislados de virus, y las vacunas completas que comprenden los aislados atenuados son capaces de conferir inmunidad in vivo frente al SRRP en el cerdo, sin generar signos clínicos significativos de VSRRP.

Otra característica de los aislados de virus del SRRP atenuados de la invención es que retienen una proporción sustancial de la viremia encontrada en los virus
35 salvajes no atenuados. Así, los virus atenuados presentan al menos aproximadamente 50%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 75% de la viremia que

- 3 -

presentan los virus salvajes no atenuados. De esta forma, los virus atenuados son capaces de conferir una inmunidad frente al SRRP más rápida y completa en el cerdo.

Los virus salvajes se pueden atenuar por una variedad de métodos, tales como el paso en cultivo celular repetido en series, inserción génica, cambio génico, delección génica, sustitución de par de base y mutación sensible a la temperatura. Dichos virus atenuados se pueden usar después en una variedad de composiciones inmunológicas incluidas vacunas, usando métodos que son bien conocidos en la técnica. En algunas formas, estos virus atenuados se pueden además matar o inactivar usando métodos que son bien conocidos en la técnica, antes de la incorporación o inclusión en una composición inmunógena según la presente invención. Los ejemplos de las composiciones inmunógenas útiles para prevenir la infección del SRRP o reducir la gravedad de los signos clínicos de la infección del SRRP incluyen vacunas hechas con Abst-1 o JA-142.

También se ha descubierto que las vacunas de la invención se pueden almacenar en un estado congelado hasta que estén listas para usar, sin quitar valor a las características deseables de las vacunas. Esto aborda un problema continuo en la técnica, puesto que las vacunas del SRRP anteriores no han sido adecuadas para el almacenamiento congeladas.

La presente invención proporciona además métodos para predecir el grado de virulencia de un aislado de virus del SRRP no caracterizado o nuevo. Dichos métodos en general implican evaluar en un aislado de virus del SRRP nuevo o previamente no caracterizado al menos uno de los siguientes parámetros: tasa de crecimiento vírico; magnitud de la viremia; respuesta de anticuerpos; o combinaciones de los mismos. Después los resultados de dicha evaluación se usan para predecir el grado de virulencia del aislado nuevo o previamente no caracterizado. Los métodos en general implican administrar o exponer un cerdo sin SRRP a una cantidad del aislado de SRRP nuevo o no caracterizado y dejar que el virus se replique durante un periodo de hasta aproximadamente 15 días, más preferiblemente de aproximadamente 2-12 días, todavía más preferiblemente de aproximadamente 3-10 días y todavía más preferiblemente de aproximadamente 3-7 días. El modo de administración se puede realizar usando cualquier forma convencional, incluidas la administración oral, intranasal, intramuscular, intra-ganglio linfático, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, y sus combinaciones, pero lo más preferiblemente por administración intranasal. La cantidad de la dosis para administración intranasal preferiblemente es hasta aproximadamente 5 ml, todavía más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 4 ml, todavía más preferiblemente entre aproximadamente 1 ml

y aproximadamente 3 ml, y todavía más preferiblemente aproximadamente 2 ml. La concentración de virus en cada dosis debe ser de hasta aproximadamente 5,0 Log₁₀ DICT₅₀/ml, más preferiblemente entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 4,0 Log₁₀ DICT₅₀/ml, y todavía más preferiblemente aproximadamente de 2,5 a 3,5 Log₁₀ DICT₅₀/ml, y lo más preferiblemente aproximadamente 3,0 Log₁₀ DICT₅₀/ml. En un momento o en momentos de tiempo seleccionados durante este periodo de replicación, se toman muestras biológicas del cerdo y se hacen mediciones de la tasa de crecimiento del virus administrado, magnitud de la viremia, respuesta de anticuerpos, y/o sus combinaciones. Después los datos recogidos en estas mediciones se comparan con la tasa de crecimiento, magnitud de la viremia, respuesta de anticuerpos y/o sus combinaciones para un aislado conocido y caracterizado, como una medida de la virulencia prevista de un aislado nuevo o desconocido.

Usando los métodos de la presente invención, se midieron la tasa de crecimiento del virus del SRRP, la magnitud de la viremia, la respuesta de anticuerpos y/o combinaciones de estas características, en cerdos a los que se les había administrado uno de ocho aislados de VSRRP diferentes. Cada uno de estos aislados tiene un nivel de virulencia y manifestaciones clínicas de la enfermedad conocidos. Estas mismas características también se midieron en cerdos a los que se había administrado una combinación de los ocho aislados.

Más específicamente, cien (100) cerdos de dos-tres semanas de edad sanos se dividieron aleatoriamente por peso en diez grupos, con 10 cerdos en cada grupo. En todos los cerdos se ensayó la infección de SRRP usando el ensayo de HerdChek PRRS ELISA 2XR (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME). Ocho de los grupos recibieron la administración de uno de los ocho aislados, un grupo recibió una administración que consistía en una combinación de los ocho aislados, y el último grupo recibió una administración de medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) para actuar como grupo de control. Se volvió a titular una muestra de cada inoculación vírica para confirmar el título. Preferiblemente el título de virus administrado se modela para mimetizar un nivel de exposición natural del virus. Se recogieron muestras biológicas en forma de sangre a diferentes tiempos a lo largo del experimento. Cada muestra se analizó mediante aislamiento del virus, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR), ensayo de HerdChek ® PRRS ELISA 2XR, y ELISA específico para proteínas del VSRRP.

El aislamiento del virus se realizó en células CL2621 (una línea celular de MA 104) mediante diluciones seriadas y combinándolo con EMEM, gentamicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y Fungizona (Invitrogen Corp., Grand Island, NY).

Después las diluciones se incubaron y se examinó el efecto citopático (ECP). Se usó el cálculo de Reed-Muench para determinar los títulos.

Se llevó a cabo la RT-PCR usando el kit de QIAamp Viral RNA Mini-Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) y el VSRRP se detectó usando un ensayo de un solo tubo de Tetracore, Inc. (Gaithersburg, MD). Para determinar la cuantificación de virus, se desarrolló una curva patrón y se determinaron las concentraciones de las muestras desconocidas por extrapolación lineal de los valores umbral del ciclo representados frente a la concentración conocida del producto de transcripción de 3'UTR.

Las mediciones de anticuerpos usando la relación S/P de ELISA se generaron usando el ensayo de HerdChek ® PRRS ELISA 2XR usando las instrucciones del fabricante. El ELISA específico para proteínas del VSRRP se llevó a cabo usando proteína de nucleocápside (N) y no estructural 4 (nsp 4) de VR2332 aislado recombinante, expresadas en células BL21 (DE3)-RP (Stratagene, La Jolla, CA).

Todos los cerdos se pesaron al inicio y al final del estudio. Además, cada día del estudio un veterinario evaluó y puntuó los signos clínicos de la enfermedad de SRRP de cada cerdo. Todos los datos resultantes se analizaron estadísticamente y se compararon grupo por grupo.

Nueve de los diez grupos posteriormente se expusieron una segunda vez a un aislado de virus de alta virulencia para permitir la evaluación adicional de los niveles de protección homóloga y vacuna frente a la protección heteróloga de tipo salvaje (concepto de exposición de virus vivo). Después de esta exposición, los animales se evaluaron y necropsaron para el análisis usando aislamiento de virus e inmunohistoquímica.

La presente invención por lo tanto también proporciona una composición inmunógena que comprende un aislado de virus del SRRP atenuado. En las formas preferidas, la composición también puede incluir un vehículo y/o un adyuvante farmacológicamente compatible. Un ejemplo de dicha composición incluiría Abst-1 y/o una forma atenuada de un virus del SRRP que se ha predicho que es virulento por los métodos descritos anteriormente.

La presente invención también proporciona un método mejorado para seleccionar un aislado de virus del SRRP para atenuar e incluir en una composición inmunógena. El método en general incluye las etapas de a) obtener un aislado de virus del SRRP de virulencia desconocida; b) administrar una cantidad de dicho aislado de virus del SRRP a un cerdo que no tenga SRRP; c) dejar que dicho aislado se replique en el cerdo durante un periodo de aproximadamente 3-15 días; d) medir la tasa de crecimiento del virus y/o la magnitud de la viremia durante dicho periodo; e) comparar

dicha tasa de crecimiento o magnitud de la viremia con la tasa de crecimiento y/o magnitud de la viremia de un aislado de virus del SRRP de virulencia conocida; y f) seleccionar un aislado para atenuar e incluir en una composición inmunógena basándose en su tasa de crecimiento y/o su magnitud de la viremia comparado con los aislados de virulencia conocida. Sería preferible seleccionar un aislado que se hubiera predicho que era muy virulento para incluir en una composición inmunógena, aunque se podían usar aislados que se ha predicho que son menos virulentos incluidos los que se ha predicho que no son virulentos. Esto se debe a que los aislados que se ha predicho que son más virulentos tienen mayores tasas de crecimiento y/o magnitudes de viremia, lo cual generalmente induce una respuesta inmunitaria más vigorosa y protectora. Usando los métodos de la presente invención, la selección de qué aislados usar para incluir en composiciones inmunógenas se simplificará y aumentará la probabilidad de tener una vacuna útil que proteja frente a aislados de virus del SRRP virulentos.

Como se emplea en esta memoria, "tasa de crecimiento" se refiere a la medición de la replicación vírica frente al tiempo en el cerdo. En el Ejemplo 1 se proporcionan ejemplos preferidos de estas mediciones. "Magnitudes de la viremia" como se emplea en esta memoria, se refiere a la concentración de virus que circula en la sangre del cerdo. En el Ejemplo 1 también se proporcionan ejemplos preferidos de esta medición.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una gráfica de los títulos medios de virus en el suero frente al tiempo expresados como $\log_{10}$ DICT₅₀/ml para el ensayo del cerdo del Ejemplo 1;

La figura 2 es una gráfica de la concentración media de virus del SRRP en el suero en el ensayo de cerdo del ejemplo 1, medido por la RT-PCR en tiempo real;

La figura 3 es una gráfica de las relaciones S/P medias frente al tiempo usando un ensayo comercial de ELISA;

La figura 4 es una gráfica que ilustra el análisis de mediciones repetidas para los datos del ensayo de ELISA comercial y de $\log_{10}$ DICT₅₀/ml del ejemplo 1, en la que se ha representado gráficamente la media del grupo del área bajo la curva de la relación S/P de ELISA frente a la media del grupo del área bajo el $\log_{10}$ DICT₅₀/ml;

La figura 5 es una gráfica que ilustra el análisis de mediciones repetidas para los datos del ensayo de ELISA comercial y de concentración de RT-PCR del ejemplo 1, en la que se ha representado gráficamente la media del grupo del área bajo la curva de ELISA frente a la media del grupo del área bajo la curva de concentración de RT-PCR;

La figura 6a es una gráfica de absorbancia frente a tiempo para el Ejemplo 1;

- 7 -

La figura 6b es una gráfica de absorbancia frente a tiempo, que ilustra el efecto del aislado de VSRRP en la respuesta de la IgG a nsp-4, en la que los datos son valores medios de 10 animales, excepto cuando murieron animales;

La figura 7 es una gráfica que ilustra el análisis de mediciones repetidas de
5 datos de nsp-4 y $\log_{10}$ DICT₅₀/ml del ejemplo 1, en la que se ha representado gráficamente la media del grupo del área bajo la curva de nsp-4 frente a la media del grupo del área bajo la curva de $\log_{10}$ DICT₅₀/ml;

La figura 8 es una gráfica que ilustra el análisis de mediciones repetidas usando los datos de puntuaciones clínicas y $\log_{10}$ DICT₅₀/ml del ejemplo 1, en la que se
10 ha representado gráficamente la media del grupo del área bajo la curva de puntuaciones clínicas frente a la media del grupo del área bajo la curva de $\log_{10}$ DICT₅₀/ml; y

La figura 9 es una gráfica de la puntuación IHC para cada aislado en esta solicitud.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Los siguientes ejemplos exponen aislados preferidos y procedimientos de acuerdo con la presente invención. Ha de entenderse, sin embargo, que estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración solamente, y nada en ellos debe considerarse una limitación tras el alcance global de la invención.

20 Ejemplo 1

Materiales y métodos:

Se obtuvieron 100 cerdos de 2-3 semanas de edad sanos de una piara comercial que no tenía SRRP y se mantuvieron en Veterinary Resources, Inc., Ames, Iowa, bajo la supervisión de un veterinario. Los animales recibieron alimento y agua a
25 voluntad. Todos los cuidadores de animales y personal de laboratorio implicados en el estudio eran ciegos respecto a los tratamientos dados a los diferentes grupos de animales. Los cerdos se ensayaron con HerdChek® PRRS ELISA 2XR (IDEXX Laboratories Inc. Westbrook, ME) para determinar si algún cerdo estaba infectado con el VSRRP. Todos los cerdos para este ejemplo dieron el ensayo negativo. Después
30 los cerdos se dividieron aleatoriamente por peso en 10 grupos con 10 cerdos por grupo.

Se usaron un total de ocho aislados de VSRRP en este ejemplo. Estos aislados se han designado VR-2332, Ingelvac® PRRS MLV, JA 142, Ingelvac® PRRS ATP, SDSU 73, Abst-1, MN 184, y 17198-6. Estos ocho aislados abarcan la historia de la
35 enfermedad del SRRP, presentan un amplio intervalo de niveles de virulencia, y representan manifestaciones importantes de la enfermedad clínica. Todos los aislados

de virus crecieron fácilmente en las células de la línea celular de ATCC CL2621 (CL2621 es una línea celular patentada de NVSL, Ames, IA,) (una línea celular de riñón de mono MA-104). Tres de los aislados de campo principales, VR-2332, JA-142, y SDSU 73, también tenían formas atenuadas, Ingelvac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., St. Joseph, MO), Ingelvac® PRRS ATP (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., St. Joseph, MO) y Abst-1, respectivamente. Todas estas formas atenuadas presentaban una virulencia baja o indetectable que se obtuvo por el pase in vitro para la atenuación. El aislado de VSRRP ATCC VR-2332 se aisló en 1991 en Minnesota y se usó en el pase en cultivo celular tres. La forma atenuada de este virus está disponible en el comercio con la marca registrada Ingelvac® PRRS MLV. El aislado de VSRRP JA 142 (ATCC N° PTA-6504), suministrado por William Mengeling, National Animal Disease Center, Ames, Iowa, se aisló en 1997 en Iowa de un caso de "aborto repentino" grave de fallo reproductivo y se usó en el pase en cultivo celular cinco. La forma atenuada de JA 142 se vende en el comercio con el nombre comercial Ingelvac® PRRS ATP y se ha asignado el ATCC N° VR-2638. El VSRRP SDSU 73 (ATCC N° PTA-6322) se recuperó en Iowa de un caso grave de enfermedad reproductiva en 1996 y se usó en el pase en cultivo celular uno. La forma atenuada de SDSU 73, designada Abst-1 (ATCC N° PTA-6320), se obtuvo por 52 pases. El aislado de VSRRP 17198-6 (ATCC N° PTA-6321) se obtuvo en Oklahoma en 1997 de un rebaño que experimentaba enfermedad reproductiva grave y se usó en el nivel de pase cuatro. El aislado de VSRRP MN 184 (ATCC N° PTA-6319) se obtuvo en 2001 de una granja de cerdos que experimentaba una enfermedad reproductiva grave y mortalidad de cerdos, en Minnesota del sur y fue suministrado por Kurt Rossow, University of Minnesota, St. Paul. Este aislado se usó en un pase en cultivo celular de uno. Adicionalmente, se produjo una mezcla que consistía en una combinación de todos los aislados.

El día 0, cada uno de los ocho aislados de VSRRP y la mezcla de VSRRP se diluyeron a aproximadamente $3,0 \text{ Log}_{10} \text{ DICT}_{50}/\text{ml}$ en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (JRH Bioscience, Lenexa, KS) que contenía FBS al 4% (JRH Bioscience, Lenexa, KS) y se administró por vía intranasal a cerdos con una dosis de 2 ml (1 ml por orificio nasal). El grupo de control sin tratar recibió 2 ml de medio. Los inóculos se titularon en placas de 96 pocillos que contenían células CL2621 de tres días de edad para confirmar la titulación usando el método de Reed-Muench (Reed et al., 1938). Los títulos observados administrados a los cerdos, junto con una descripción del nivel de virulencia e información de aislamiento, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Virulencia y título de inoculación de los aislados

Grupo	Aislado	Año aislado	Virulencia***	Título log ₁₀ DICT ₅₀ /ml
1	VR 2332	1991	moderada	3 43
2	Ingelvac® PRRS MLV*	licencia de USDA 1996	VR2332 atenuado	3,02
3	JA 142	1997	Alta	3 13
4	Ingelvac® PRRS ATP*	licencia de USDA 1999	JA 142 atenuado	4 14
5	SDSU 73	1996	Alta	2,75
6	Abst-1*	Atenuado 1999	SDSU 73 atenuado	4 18
7	MN 184	2001	Alta	4,10
8	17198-6	1997	Alta	2 81
9	Mezcla**	N/E	Alta	3 71
10	Testigo	N/E	N/E	N/E

* aislados de VSRRP atenuados

** Mezcla que contiene los ocho aislados

*** Resumen de lesiones pulmonares descritas en el Symposium on Emerging Diseases, Roma 2003

Después los aislados se compararon para determinar su similitud genética mediante un análisis de su porcentaje de identidad de secuencia. La identidad de secuencia se determinó enviando muestras de los virus al Laboratorio de Diagnóstico de la Universidad de Minesota para el análisis de secuencias. Se proporcionaron los resultados de ORF 5-6 y después se compararon con una secuencia de consenso del virus del SRRP. Se indicaron las diferencias de pares de bases individuales y después se comparó el % de identidad de secuencia entre los aislados. Como son conscientes los expertos en la técnica, también se puede hacer una búsqueda amplia en diferentes sitios web. Por ejemplo, la Universidad de Minesota proporciona una base de datos de VSRP (ccgb.umn.edu/cgi-bin/common/web_blast.cgi) que lista secuencias de aislados de 1989-2003. Otro sitio que se usa con frecuencia es el enlace a NCBI BLAST que se encuentra en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.

Como se muestra por el porcentaje de identidad de secuencia y el dendograma en la Tabla 2, los aislados de campo virulentos son genéticamente bastante distintos y representan un grupo diverso de aislados de VSRP. En contraste, las parejas de VSRP parental y de vacuna eran genéticamente casi idénticas. La comparación por parejas y el dendograma de la Tabla 2 se generaron usando el paquete de software de Lasergene de herramientas de análisis de secuencias (DNASTAR, Inc, (Madison, WI)).

Tabla 2. Comparaciones por parejas de la secuencia de nucleótidos del ORF5 de los aislados de VSRP virulentos y atenuados usados en el estudio. El porcentaje de similitud se muestra en la parte superior derecha y el porcentaje de divergencia se muestra en la parte inferior izquierda de la tabla. El dendograma muestra la relación genética de los aislados. El corte indica 1 cambio de nucleótido por 100 restos. VR2332 es el aislado original de Ingelvac PRRS MLV, JA 142 es el aislado original de Ingelvac PRRS ATP y SDSU 73 es el aislado original de Abst-1.

Porcentaje de Identidad

	Ingelvac PRRS MLV		Ingelvac PRRS ATP					17198- 6
	VR 2332		JA-142		SDSU 73	Abst-1	MN 184	
VR 2332		99,7	91,0	90,5	90,0	89,8	86,4	90,4
Ingelvac PRRS MLV	0,3		90,7	90,2	89,7	89,2	86,4	90,0
JA-142	9,7	10,1		99,2	92,7	92,2	87,2	92,2
Ingelvac PRRS ATP	10,3	10,7	0,8		91,9	91,4	86,4	91,4
SDSU 73	10,9	11,3	7,8	8,8		99,5	87,2	91,7
Abst-1	11,5	11,9	8,4	9,4	0,5		86,7	91,2
MN 184	15,5	15,5	14,4	15,5	14,4	15,1		86,1
17198-6	10,5	10,9	8,8	9,7	9,0	9,8	15,9	

Porcentaje de divergencia

El día 49, se administraron por vía intranasal 2 ml de aislado virulento del virus del SRRP MN 184 a los grupos 1-9. El aislado MN 184 se diluyó en MEM + FCS al 4%, de modo que la concentración era igual a log 3,0 +/- 0,5 por ml. El virus de estimulación se tituló en placas de 96 pocillos que contenían células CL2621 que tenían tres días para ensayo. Los animales se evaluaron durante 14 días y después se necropsaron.

10 Evaluación de la Viremia

Se recogieron muestras de sangre de cada cerdo en cada grupo en tubos Vacutainer los días 0, 1, 3, 7, 15, 21, 28, 35, 42 y 49. El suero se separó de la sangre entera coagulada por centrifugación a 6000 rpm durante 20 minutos. Después las muestras de suero se dividieron para el análisis mediante aislamiento del virus, ensayo de la DICT₅₀, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR), ensayo de HerdChek® PRRS ELISA 2XR, y ELISA específico para proteínas del VSRRP. En este estudio las muestras de suero se procesaron inmediatamente después de recogerlas y se enfriaron en hielo en las 3 horas siguientes a la obtención. Las muestras se almacenaron durante un máximo de 24 h a 4°C y después a -70°C. El suero ensayado por RT-PCR se congeló a -70°C el día en que se recogió y se almacenaba hasta que podía realizarse el ensayo, momento en el que solo la serie de muestras que se podía ensayar en las siguientes 24 horas se

descongelaba, extraía y ensayaba.

Para el ensayo de la DICT₈₀, se añadieron 100 µl de suero de cada cordero en un tubo de dilución que contenía 900 µl de EMEMm + FBS al 2% + gentamicina 50 µg/ml (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) + Fungizona 2,5 µg/ml (Invitrogen Corporation, Grand Island NY). Este tubo se agitó con vórtice y se transfirieron 100 µl a otro tubo de dilución que contenía 900 µl de EMEMm + FBS al 2% + gentamicina 50 µg/ml + Fungizona 2,5 µg/ml. Este procedimiento se repitió hasta que se alcanzó una dilución final de 10⁻⁶. Se cultivaron en placa cuatro replicaciones para cada dilución en placas de 96 pocillos, que contenían las CL2621 (células MA 104), 100 µl por pocillo, a 37°C y CO₂ al 4% durante ocho días. Después en cada pocillo se examinó el efecto citopático (ECP) y los títulos se determinaron usando el cálculo de Reed-Muench. Para el aislamiento de los virus se añadieron 100 µl de suero a cada uno de los pocillos de ensayo que contenían células MA 104 por duplicado. Las placas después se incubaron durante una hora a 37°C y CO₂ al 4%. Después se añadieron 500 µl de EMEM + FBS al 2% + gentamicina 50 µg/ml + Fungizona 2,5 µg/ml a cada pocillo. Después las placas se dejaron incubar a 37°C con CO₂ al 4% durante ocho días, y después se examinó el ECP en cada pocillo.

Para extraer el ARN vírico del suero para la RT-PCR cuantitativa, se usó el kit de QIAamp Viral RNA Mini-Kit® (Qiagen Inc. Valencia, CA) como se describe en las instrucciones del kit. Para la PCR en tiempo real, Tetracore Inc. (Gaithersburg, MD) suministró un ensayo de RT-PCR en un solo tubo, en tiempo real, disponible en el comercio, para detectar el VSRRP de EE.UU. y se usó para detectar el ARN del VSRRP. Se diseñaron una sonda de nucleasa 5' de unión al surco menor (MGB) y cebadores a partir de la región no traducida 3' (UTR) de la región genómica del VSRRP por alineamiento de aislados de GenBank y basándose en áreas conservadas del cebador 3'UTR y la región de sonda. El ARN del VSRRP se transcribió en un tubo individual usando un volumen de reacción de 25 µl que consistía en mezcla original de VSRRP de EE.UU. de Tetracore (18,9 µl de mezcla original, 2 µl de mezcla enzimática 1, 0,1 µl de mezcla enzimática 2) y 4 µl de ARN extraído. Los tubos de reacción se cargaron en el bloque Smart Cycler II® (Cepheid, Sunnyvale, CA) y se establecieron los ajustes del software de detección fluorescente para el cálculo automático de los valores base con la resta de la señal de fondo. El programa del ciclador térmico consistía en 52°C durante 1800 segundos, 95°C durante 900 segundos, y 45 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 61°C durante 60 segundos y 72°C durante 60 segundos. Una reacción de PCR se consideró positiva si el nivel del ciclo umbral (Ct) se obtenía a ≤45 ciclos. Para la cuantificación, se usaron cantidades conocidas de producto de ARN

transcrito in vitro en diluciones seriadas (de 1×10^{-1} a 1×10^5 copias/ μ l) para generar una curva patrón. Las concentraciones de copia/ml de las muestras desconocidas se determinaron por extrapolación lineal de los valores de Ct representados gráficamente frente a las concentraciones conocidas del producto transcrito de 3'UTR.

5 *Medición de anticuerpos*

Las relaciones de S/P de ELISA se generaron realizando el ensayo de HerdChek® PRRS ELISA 2XR (INDEXX Laboratories, Westbrook, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ELISA específico de proteínas del VSRRP para el HerdChek® se llevó a cabo con proteína de nucleocápsida (N) y no estructural 4 (nsp) de aislado de VR2332 recombinante, que se expresaron en células BL21 (DE3)-RP (Stratagene) a partir del plásmido pET 24b como proteínas de fusión que contenían un marcador myc en el amino terminal y un marcador 6xhisitidina en el carboxilo terminal. Las proteínas desnaturalizadas se dializaron en Tris HCl 0,1 M, pH 8, guanidina-HCl 0,6 M, EDTA 2 mM y se ajustaron a una concentración de 3 mg/ml. Se añadió DTT hasta 300 mM y la disolución se filtró a través de una membrana de 0,45 μ m. Se añadió proteína reducida en tampón de replegado (Tris HCl 100 mM, pH 8,0, L-arginina 0,5 M, glutatión oxidado 8 mM, EDTA 2 mM, pepstatina A 10 μ M, leupeptina 10 μ M y PMSF 1 mM), se filtró (0,22 μ m) y se agitó durante una noche. La proteína purificada se concentró por filtración de flujo tangencial (Pellicon XL Ultracel PLC 5 kd, Millipore) y se dializó contra Tris HCl 20 mM, pH 8,0. Las proteínas se analizaron en un bioanalizador Agilent 2100 con el kit de Protein LabChip. Las soluciones de proteínas purificadas se almacenaron a -80°C .

Los ELISA específicos de proteína se llevaron a cabo por revestimiento de placas de microtitulación con 100 ng de proteína recombinante en tampón de carbonato, pH 9,6, o con tampón solo. Las placas se bloquearon con leche deshidratada sin grasa al 2,5% en solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,1% (PBST). Se aplicaron 100 μ l de una dilución 1:2000 de suero a los pocillos por duplicado durante 2 horas, después de lo cual las placas se lavaron con PBST y la unión del anticuerpo se detectó por incubación con IgG anticabra de cerdo conjugada con peroxidasa de rábano picante (cadenas pesada + ligera (KPL, Gaithersburg MD)) diluida 1:5000 durante 1 hora, seguido de lavado y desarrollo de color con 100 μ l de sustrato de TMB (KPL). Las reacciones se pararon con ácido fosfórico 1 M y las placas se leyeron a 450 nm.

Pesos corporales

35 Todos los cerdos se pesaron el día 0 (primer día del estudio) y el día 49 (final del estudio). Los cerdos se pesaron en un sistema de balanza de grúa electrónica

portátil Weigh-Tronix™ modelo 615XL, (Weigh-Tronix Inc., Fairmont, MN). La balanza se calibró usando pesos de prueba certificados antes y después de cada uso.

Puntuaciones clínicas

5 Cada día del estudio, un veterinario puntuó a cada cerdo según los signos respiratorios, de comportamiento y toses en una escala de uno a cuatro para cada signo clínico. Un animal normal tenía una puntuación de tres, la enfermedad clínica máxima se puntuaba nueve y un animal muerto recibía una puntuación de 12. Se enviaron muestras de todos los animales que murieron en el estudio al Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad estatal de Iowa para el examen patológico.

10 *Evaluación inmunohistológica de los pulmones*

Se fijó con formalina una muestra de pulmón de cada cerdo el día de la necropsia para ensayar la inmunohistoquímica y para el examen microscópico de lesiones compatibles con el VSRRP. Este ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad estatal de Iowa.

15 *Análisis estadístico*

Todos los datos se importaron al programa SAS versión 8.02 para la gestión y análisis de los datos. Se generaron los resúmenes estadísticos incluidas la media, desviación típica, error típico, mediana y distribuciones de frecuencia para todas las variables de resultados según fuera adecuado. Los datos de peso, RT-PCR y Log₁₀ DICT₅₀/ml se analizaron por ANOVA de un factor para las diferencias generales entre los grupos de tratamiento con ensayos por parejas para las diferencias entre los grupos de tratamiento por el ensayo t de diferencia significativa mínima. Todos los ensayos para las diferencias entre grupos se diseñaron como ensayos de dos colas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p \leq 0,05$.

25 Se hicieron algunos cambios de los datos para facilitar los análisis de correlación. Los valores de Log₁₀ DICT₅₀/ml listados como <2,00 se ajustaron a 1,0. Los valores de RT-PCR negativos se ajustaron a 1,0 y todos los valores de RT-PCR se normalizaron por transformación a la base logarítmica 10 antes del análisis. Los resultados del grupo de control no se incluyeron en los análisis de correlación. Los resultados de cada cerdo se convirtieron en un área bajo la curva aproximada usando la regla del trapecio. El área bajo la curva se calculó para el periodo de estudio entero, desde la primera observación al día 15, y desde el día 15 a la última observación, aunque en las figuras sólo se muestra el periodo de estudio entero.

Resultados

35 *Aislamiento del virus y cuantificación de Log₁₀ DICT₅₀/ml*

Antes de la exposición el día de la infección, no había animales que dieran positivo el ensayo para el VSRRP. El día 1, después de infección intranasal, sólo 13 animales en 5 grupos dieron positivo el ensayo para el virus. Sin embargo, a los 3 días después de la infección todos los animales que se habían infectado con aislados de campo, excepto para el aislado 17198-6, eran positivos para el virus con valores medios de $\log_{10}$ DICT₅₀/ml en el intervalo de 2,1 (SDSU-73) a 3,9 (MN 184). En contraste, los animales inoculados con aislados atenuados eran uniformemente negativos por cultivo celular. Estos resultados se proporcionan en la figura 1. Los niveles máximos de viremia, de 3,6 a 4,6 $\log_{10}$ DICT₅₀/ml se alcanzaron el día 7 para cuatro de los cinco aislados virulentos. El aislado 17198-6 alcanzó el nivel máximo el día 15. Los títulos permanecieron cercanos o por encima de 2 $\log_{10}$ DICT₅₀/ml en todos los virus virulentos durante 21 días, excepto para los cerdos infectados con JA 142 que tenían títulos por debajo de este nivel.

Los niveles de viremia en los cerdos inoculados con aislados de VSRRP atenuados eran menores que en los cerdos inoculados con aislados de campo virulentos. Las medias de los grupos de los aislados atenuados alcanzaron niveles máximos con títulos por encima de un log menor que el máximo del título del grupo menos virulento. El aislado Abst-1, no se volvió a aislar, con excepción del día 3 después de inoculación. La viremia de Ingelvac® PRRS MLV fluctuaba entre 0,5 y 1,0 $\log_{10}$ DICT₅₀/ml de los días 7 a 28, y Ingelvac® PRRS ATP variaba entre 0,4 y 1,2 $\log_{10}$ DICT₅₀/ml de los días 7 a 28. Los virus aislados atenuados no se recuperaron del suero después del día 28, y se recuperaron los virus de sólo dos de los grupos de aislados de campo virulentos, los cerdos infectados con la mezcla y los infectados con MN 184 el día 35 (también se muestra en la Fig. 1). Casi todos los cerdos eran no virémicos por aislamiento del virus los días 42 y 49.

En conjunto, se observó que los aislados más virulentos se replicaban más rápido y con títulos mayores en los cerdos de lo que lo hacían los aislados atenuados. Los cerdos infectados con el aislado MN 184, mostraron, en particular, un aumento muy rápido de la replicación vírica empezando el día 3 y alcanzando un máximo por encima de 4,5 $\log_{10}$ DICT₅₀/ml el día 7. Después de alcanzar el nivel máximo, la viremia de MN 184 disminuyó de forma constante pero mantenía todavía un título significativamente mayor (ensayo t, $p \leq 0,05$) que todos los demás aislados los días 28 y 35. Se observó una tendencia similar en todos los demás grupos virulentos que quedaban, en concreto VR2332, JA 142, SDSU 73 y la mezcla (véase, Fig. 1). Los cerdos infectados con 17198-6 siguieron la misma tendencia general descrita para el

grupo infectado con MN 184 pero no tan cercana.

Los grupos de cerdos a los que se administraron aislados atenuados (Ingelvac® PRRS MLV, Ingelvac® PRRS ATP, y Abst-1) siguieron una tendencia diferente. Mostraron un aumento moderado del título de virus empezando después del día 3 y que alcanzó un máximo entre los días 7 y 15 con un título de virus mayor que un log menos que cualquiera de los grupos de exposición virulenta y varios órdenes de magnitud menos que el grupo infectado con MN 184. Los títulos observados en estos grupos de exposición atenuada después disminuyeron a cero el día o antes del día 35 (Véase, Fig. 1).

Cuando se comparan las medias de los grupos después de la segunda exposición, hay un aumento grande de los títulos de virus de los grupos atenuados, mientras que los grupos virulentos muestran un aumento menor o no muestran aumento en absoluto. Por ejemplo, Abst-1 tenía un título de 3,76 log siete días después de la segunda exposición, mientras que MN 184 tenía un título de cero. Los otros grupos atenuados alcanzaron el nivel máximo tres días después de la segunda exposición. El título más alto observado en cualquiera de los grupos virulentos después de la segunda exposición fue log 1,32 vista tres días después de la exposición a JA 142.

Cuantificación del virus por RT-PCR en tiempo real

Los niveles de viremia también se determinaron por la RT-PCR en tiempo real, ya que era posible que el crecimiento en células CL2621 no fuera igual para todos los aislados, y porque la RT-PCR puede ser una medición más sensible para la viremia que el crecimiento en células. Como se muestra en la Fig. 2, los grupos de exposición virulenta mostraron un aumento notable de la concentración media el día 1, y todos los grupos alcanzaron un nivel máximo por encima de 8 log/ml entre los días 7 y 15. Las concentraciones del grupo de exposición virulenta después fueron disminuyendo gradualmente durante las siguientes semanas, alcanzando concentraciones inferiores a 4 log/ml el día 49.

Los grupos de exposición a aislados atenuados mostraron un aumento mucho menos espectacular de la concentración, que también empezó alrededor del día 1 y el título medio del grupo nunca alcanzó o superó 7 log/ml (Fig. 2). Las concentraciones observadas para los grupos de exposición atenuada se mantuvieron en niveles que fluctuaban, mostrando un amplio intervalo de valores en las semanas siguientes a la exposición. Las fluctuaciones se debían principalmente a los niveles esporádicamente altos de un solo cerdo. Los tres grupos de exposición a aislados atenuados alcanzaron todos niveles máximos en días diferentes del estudio. El grupo de Ingelvac® PRRS

MLV alcanzó el nivel máximo con una concentración de 4,31 log/ml el día 28, el grupo de Ingelvac® PRRS ATP alcanzó el nivel máximo con 6,58 log/ml el día 3, y el grupo de Abst-1 alcanzó el nivel máximo con 6,85 log/ml el día 35, que era el título más alto alcanzado por un aislado atenuado (Fig. 2). Además, se observó que la concentración media de los grupos de aislados virulentos era significativamente mayor ($P < 0,05$) que la concentración media de los grupos de aislados atenuados los días 3 y 15, pero el día 49 la concentración media de los grupos de aislados virulentos era significativamente menor ($P < 0,05$) que la de los grupos de aislados atenuados.

Ensayo de HerdChek® PRRS ELISA 2XR

Como se muestra en la figura 3, la respuesta inmunitaria humoral al VSRRP, medida por las relación S/P del ensayo de PRRS ELISA HerdChek® 2XR, mostraba que las medias de los grupos de exposición a aislados virulentos subían por encima del punto de corte de 0,4 para un resultado positivo el día 15. En contraste, las medias de los grupos de exposición a aislados atenuados eran negativas y los tres grupos permanecieron por debajo de 0,4 hasta después del día 21. Los grupos de Ingelvac® PRRS MLV y Ingelvac® PRRS ATP mostraron resultados positivos el día 28, pero el grupo de Abst-1 no mostró una relación S/P media por encima de 0,4 hasta el día 42.

Comparando la respuesta humoral de los grupos infectados con aislador virulentos o con la mezcla con los grupos inoculados con aislados atenuados, estaba claro que la cinética y magnitud de la respuesta de anticuerpos estaba asociada con el nivel de viremia, en particular entre los días 14 y 35 después de la infección. Esta observación está además apoyada por la correlación entre los niveles de viremia y respuestas de anticuerpos humorales determinada por comparaciones por parejas de las relaciones S/P del ensayo de HerdChek® PRRS ELISA 2XR respecto a la titulación de virus o la RT-PCR. Las figuras 4 y 5 muestran que la respuesta de anticuerpos humorales está muy asociada con la carga vírica durante todo el periodo de estudio, con un coeficiente de correlación de $r=0,858$ para la titulación vírica y $r=0,794$ para la RT-PCR. Estas asociaciones eran muy significativas ($p < 0,0001$ en cada caso). Además, los aislados atenuados muestran respuestas de anticuerpos y cargas víricas bajas, mientras que los aislados virulentos muestran respuestas altas.

ELISA específico de proteínas del VSRRP

Para comprender algo mejor la relación entre las diferencias en los inoculados de VSRRP y las respuestas inmunitarias humorales, se determinaron los títulos de anticuerpos contra N, la proteína estructural principal, y nsp 4, una proteasa no estructural esencial pero minoritaria. La Fig. 6a ilustra que la cinética de la respuesta de IgG anti-N de la nucleocápside era casi idéntica en todos los grupos de cerdos, con

un título máximo el día 28 seguido de una disminución fuerte en los siguientes días 7-14, después de lo cual los niveles se mantuvieron o aumentaron ligeramente entre los días 42 y 49.

La magnitud de la respuesta para cada aislado era similar a la encontrada en los resultados del ensayo de HerdChek® PRRS ELISA 2XR, y concordantes con los niveles de viremia. Los títulos máximos más bajos el día 28 se observaron en los grupos inoculados con aislados atenuados, y el título más alto se alcanzó en los cerdos infectados con el aislado MN 184 muy virulento. El día 49 la titulación de anti-N era equivalente en todos los grupos excepto para MN 184 y el de mezcla, lo que sugería que la respuesta humoral a MN 184 podía ser cualitativamente diferente. Además, sólo sobrevivieron 5 cerdos al día 49 en cada uno de estos dos grupos, lo cual se reflejaba en el mayor error típico el día 49 en el grupo de MN 184.

Como se muestra en la figura 6b, la respuesta de IgG a nsp 4 era sustancialmente diferente que a N. No se detectó anticuerpo anti-nsp 4 antes del día 21, la respuesta global era mucho más débil, y no se detectó respuesta significativa en los grupos que recibieron Ingelvac® PRRS MLV y Abst-1. Además, la magnitud de la respuesta anti-nsp 4 no estaba asociada con el nivel de viremia. Las respuestas a VR 2332, JA 142, MN 184, y la mezcla, eran todas equivalentes, con un máximo el día 28, seguido de una disminución al día 35, y después aumento otra vez al día 42, mientras que la magnitud transcurso del tiempo y duración de la viremia variaron entre estos cuatro grupos. La figura 7 ilustra que cuando se examinan los análisis de mediciones repetidas, datos para ELISA para nsp 4 comparado con datos de Log₁₀ DICT₅₀/ml, se puede ver que no hay correlación entre el nivel de viremia y la respuesta de anticuerpos humorales a nsp 4. También había una pequeña respuesta secundaria después de la segunda exposición el día 49 al aislado MN 184.

Peso corporal

No había una diferencia significativa en el peso medio de ninguno de los grupos el día 0 del experimento ($P = 0,099$). El día 49 los cerdos inoculados con el aislado atenuado Abst-1 tenían el peso medio más alto, el cual era significativamente mayor que el de todos los demás grupos excepto el grupo de control (Tabla 3). También, el día 49, los pesos medios de todos los grupos de exposición a aislados virulentos, excepto el grupo de 17198-6, eran significativamente menores que el grupo de control (Tabla 3). Los pesos medios de los grupos de exposición a aislados atenuados Ingelvac® PRRS MLV y Ingelvac® PRRS ATP y el grupo de control, eran estadísticamente equivalentes (Tabla 3).

Tabla 3. Pesos corporales medios

	<u>Aislado</u>	<u>Día 0</u>	<u>Día 49</u>
	VR 2332	6,38 ¹	33,5 ^b
	Ingelvac® PRRS MLV	6,56	34,6 ^a
5	JA 142	6,42	32,7 ^b
	Ingelvac® PRRS ATP	6,24	35,0 ^a
	SDSU-73	6,59	32,9 ^b
	Abst-1	6,69	39,4 ^a
	MN 184	6,73	23,7 ^c
10	17198-6	6,36	34,5 ^a
	Mezcla**	6,51	23,0 ^c
	<u>Control</u>	<u>6,48</u>	<u>38,4^a</u>

0. ¹ Los pesos están en kg. No había diferencias significativas en los pesos medios el día 0.
- 15 * Indica pesos estadísticamente equivalentes entre esos grupos el día 49.
 ** Mezcla es una mezcla que contiene los ocho aislados.
 ^a Significativamente mayor que todos los grupos excepto que el grupo de control (p<0,05).
 ^b Significativamente menor que el grupo de control.
- 20 ^c Significativamente menor que todos los demás grupos.

Puntuaciones clínicas

25 Se observaron aumentos de las puntuaciones clínicas medias en sólo cuatro de los grupos de exposición virulenta: JA 142, SDSU 73, MN 184 y la Mezcla. Estas puntuaciones más altas se mantuvieron a lo largo de todo el estudio, mientras que el resto de los grupos, tanto los de exposiciones virulentas como atenuadas, tuvieron puntuaciones clínicas esencialmente normales durante el periodo del estudio. La única causa principal de cambios en las puntuaciones clínicas medias observadas en este estudio se produjeron cuando uno o más animales murieron en el grupo de tratamiento asociado (Tabla 4).

85

Tabla 4. Mortalidad de los cerdos después de la exposición

Grupo	Aislado	Mortalidad	Día(s) de Muerte(s)
1	VR 2332	0/10	N/E
2	Ingelvac® PRRS MLV	0/10	N/E
3	JA 142	1/10 = 10%	17
4	Ingelvac® PRRS ATP	0/10	N/E
5	SDSU 73	2/10 = 20%	9,23
6	Abst-1	0/10	N/E
7	MN 184	5/10 = 50%	14, 14, 17, 23, 41
8	17198-6	0/10	N/E
9	Mezcla**	5/10 = 50%	12, 16, 17, 21, 21
10	Controles	2/10*	41, 48

VSRRP atenuado 0/30 = 0%
VSRRP virulento 13/60 = 22%

- 5 Todas las muertes en los grupos de tratamiento se atribuyeron a neumonía intersticial no supurativa moderada o grave debida al VSRRP con infección bacteriana secundaria.
- * Muertes atribuidas a neumonía bacteriana sin implicación del VSRRP.
- ** Mezcla es una mezcla que contiene los ocho aislados.

- 10 La gravedad de la enfermedad clínica estaba muy asociada con la carga vírica ($p<0,001$ para la titulación de virus). Como se muestra en la figura 8, las puntuaciones clínicas más altas eran para los grupos infectados con MN 184 y la Mezcla. El 50 por ciento de los cerdos de cada grupo murió, y la titulación de virus indicó que el nivel de infección era sustancialmente más alto que para todos los demás grupos. Las diferencias de carga vírica determinadas por RT-PCR eran menos marcadas (no se muestran los datos) y la correlación de los signos clínicos con la carga vírica por RT-
- 15 PCR era menor que con la titulación de virus ($r=0,556$ frente a $r=0,803$, respectivamente). Las puntuaciones clínicas en el grupo 10 (control) aumentaron después de la muerte de dos cerdos por neumonía bacteriana. Se demostró que ambos cerdos eran negativos para el VSRRP por tinción inmunohistoquímica de tejido pulmonar, aislamiento de virus negativo y análisis por PCR en tiempo real, y la falta
- 20 completa de seroconversión por ensayo de HerdChek® PRRS ELISA 2XR o ELISA de proteínas específicas. Resultados posteriores indicaron que había varios patógenos bacterianos en los animales que murieron inesperadamente durante el estudio, y estas muertes se atribuyeron de forma probable a infección bacteriana secundaria (Tabla 5).

86

Tabla 5. Causa de la mortalidad después de la exposición

Cerdo n°	Grupo	Causa de la muerte	Día de la muerte
993	JA 142	SRRP y <i>Streptococcus suis</i>	17
948	Control Neg	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> y <i>Pasteurella multocida</i>	41
5 983	Control Neg	<i>A. pyogenes</i> y <i>P. multocida</i>	48
922	SDSU 73	SRRP y neumonía bacteriana*	9
918	SDSU 73	SRRP y <i>Escherichia coli</i>	23
973	MN 184	SRRP y <i>Actinobacillus suis</i>	14
992	MN 184	SRRP y <i>A. suis</i>	14
10 980	MN 184	SRRP y <i>E.coli</i>	17
971	MN 184	SRRP y <i>E.coli</i>	23
958	MN 184	SRRP y <i>E.coli</i>	41
976	Mezcla	SRRP y <i>A. suis</i>	12
970	Mezcla	SRRP y <i>V. S. suis</i>	16
15 972	Mezcla	SRRP y <i>S. suis</i>	17
995	Mezcla	SRRP y <i>S. suis</i>	21
999	Mezcla	SRRP y <i>A. pyogenes</i>	21

* El informe de diagnóstico indicaba "neumonía bacteriana" sin agente específico listado.

Evaluación inmunohistológica de los pulmones

20 Aunque las puntuaciones IHC medias y las lesiones por VSRRP observadas para los grupos individuales no eran significativamente diferentes, se vio una diferencia significativa comparando las puntuaciones IHC según la virulencia. Para las puntuaciones IHC medias y las lesiones por VSRRP véase la Fig. 9 y la Tabla 6.

Tabla 6: Puntuaciones IHC medias basadas en la virulencia

Variable	Media de no virulentos	Media de virulentos	Valor p de ANOVA
IHC	2,36	1,49	<0,0001*

25 * = Significativo a $p \leq 0,05$

Discusión

30 Un objetivo de estos ejemplos era examinar diferentes aislados de VSRRP con niveles conocidos de virulencia para determinar si había una relación con la replicación in vivo que se pudiera usar para predecir la virulencia de aislados de VSRRP sin necesidad de llevar a cabo experimentos de exposición controlados. Además, tenía interés determinar la relación entre la virulencia del aislado, los niveles de viremia y la respuesta de anticuerpos humorales. Finalmente, puede tener interés desarrollar vacunas contra los aislados de VSRRP que se encuentra que son virulentos usando los métodos de la presente invención. Un objetivo sería tener estas vacunas que

proporcionaran algún grado de protección contra otros aislados virulentos; sin embargo, dicha eficacia cruzada puede no ser universal para todos los aislados de VSRRP y puede ser necesario el ensayo adicional. Sin embargo, está claro que la presente invención proporciona una herramienta eficaz para identificar candidatos principales para el desarrollo de vacunas.

Con el fin de ensayar los aislados de VSRRP en las mismas condiciones, era necesario usar dosificaciones de vacunas autorizadas que estuvieran por debajo de la dosis mínima de inmunización establecida por el USDA y que no fueran representativas de una dosis comercial. Además, la ruta intranasal de la administración de vacunas de MLV usadas en el estudio no estaba de acuerdo con el etiquetado de la USDA y se usó solo para imitar una exposición más natural. La dosis comercial típica de las vacunas de SRRP vivas modificadas (Ingelvac PRRS y Ingelvac PRRS ATP) es mucho mayor que la usada en este ensayo experimental. Estas dosis bajas experimentales de vacuna de SRRP viva modificada no representan la dosificación y forma real del producto usadas en la técnica y explican fácilmente la respuesta serológica descrita. Usando una dosis de vacuna comercial, los títulos serológicos medidos por el ensayo de IDEXX serían detectables sobre el día 14. En este ensayo usando títulos de aproximadamente 3 log, esta respuesta serológica se retrasaba y era menor. Esto era de esperar, pero se hizo para asegurar la uniformidad de la administración de títulos entre los grupos y facilitar el análisis y la comparación entre aislados virulentos y atenuados. Aunque no se aborda específicamente en este ejemplo, es probable que el efecto de la dosis sea mucho más significativo para un virus atenuado o menos virulento que para un virus de campo virulento que puede crecer rápidamente y recuperarse por encima de 4 log/ml en el suero del cerdo en los siguientes 3-7 días de exposición. La dosis comercial intramuscular recomendada más alta da relaciones S/P en el ensayo de HerdChek® PRRS ELISA 2XR mayores que el valor de corte de 0,4 a los 14 días después de la vacunación que es la mitad del tiempo observado para las dosis usadas en este estudio (Roof et al., 2003). La dosis nominal usada en este estudio, 2×10^3 DICT₅₀ por animal, produjo 50% de mortalidad en los grupos que recibieron el aislado MN 184 y respuestas anti-nucleocápside en todos los grupos. No se ensayaron dosis mayores puesto que una mortalidad excesiva en los grupos expuestos a aislados muy virulentos habría comprometido los objetivos de este estudio. Además, estudios previos no habían mostrado diferencias de signos clínicos y viremia en cerdos jóvenes inoculados con aislado VR2332 con dosis de $10^{2.2}$, $10^{3.2}$ y $10^{4.2}$ DICT₅₀ por animal.

Los resultados tanto de Log₁₀ DICT₅₀/ml como los resultados de la RT-PCR en

tiempo real mostraron que los niveles de viremia variaban significativamente entre los grupos después de la exposición al VSRRP. Esto indica que la tasa de crecimiento del VSRRP en los cerdos es una característica fenotípica de los virus independiente de la posible variación de la susceptibilidad de los cerdos a la infección. Además, la
5 atenuación del VSRRP por adaptación al crecimiento en células CL2621 redujo no solo su capacidad de crecimiento en cerdos, sino que también alteró la cinética de la replicación vírica de modo que la viremia máxima se producía más tarde. Chang et al. (2002) hicieron una observación similar y mostraron que incluso un periodo limitado de
10 pase en cultivo celular del aislado de VSRRP moderadamente virulento VR 2332 reducía el crecimiento vírico en los cerdos y retrasaba significativamente el tiempo para alcanzar la viremia máxima. Sin embargo, un retraso de tiempo para alcanzar la viremia máxima no es un diagnóstico para el pase en cultivo celular in vitro o para la atenuación, puesto que el aislado 17198-6 muy virulento también mostró un retraso de tiempo para alcanzar la viremia máxima.

15 En conjunto, los aislados virulentos mostraron niveles de viremia sustancialmente mayores en el suero que los aislados atenuados con dosis equivalentes de inoculación. Por ejemplo, el título de virus más alto observado en cualquier de los grupos de exposición a aislados atenuados fue 1,22 log el día 15 en cerdos a los que se les había dado Ingelvac® PRRS ATP, mientras que el título más
20 bajo de cualquier grupo virulento el día 15 fue 2,40 log en el grupo de SDSU 73. El máximo de viremia los días 3-7 y los niveles de virus detectados (todos >3,5 log/ml) eran bastante uniformes entre los aislados de VSRRP virulentos, aunque para MN 184 eran significativamente mayores en magnitud y duración, con títulos de virus todavía presentes los días 28 y 35. Esto apoya el concepto de que los aislados de VSRRP muy
25 virulentos se replican a un título sustancialmente mayor in vivo de los que lo hacen los aislados atenuados o poco virulentos, pero no establece una relación cuantitativa directa entre el nivel de virulencia y el nivel o la tasa de crecimiento in vivo entre los VSRRP de tipo salvaje (Haynes et al. 1997). Los grupos mostraron una amplia variedad de protección desde la segunda exposición con el aislado MN 184. Por
30 ejemplo, no se detectaron virus en el grupo de MD 184 o de Mezcla, los cuales recibieron ambos el aislado MN 184 inicialmente. Puede verse que Abst-1 confiere muy poca protección después de exposición a MN 184. Estas observaciones confirman más el concepto de que la exposición homóloga confiere más protección que la exposición heteróloga. La exposición virulenta homóloga era más protectora y la
35 exposición virulenta heteróloga era menos protectora, pero todavía más protectora que la exposición atenuada heteróloga.

Los resultados de la RT-PCR en tiempo real eran estadísticamente muy similares a los resultados de Log_{10} $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$, indicando que ambos métodos miden los niveles relativos de virus infeccioso entre los grupos. El coeficiente de correlación de Pearson entre la RT-PCR y Log_{10} $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$ el día 7 era 0,89 y para la RT-PCR en tiempo real y Log_{10} $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$ medios el resultado era 0,88. Los valores de concentración determinados por la RT-PCR en tiempo real pueden haber sido varios órdenes de magnitud mayores que los valores de log_{10} $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$ por varias razones, incluidas las diferencias entre la frecuencia de partículas víricas que contienen el amplicón objetivo y partículas que son totalmente infecciosas en células CL2621, y la presencia de anticuerpos neutralizantes que podía disminuir la infectividad (Dianzani et al., 2002). Sin embargo, no es probable que el anticuerpo neutralizante explique la diferencia, porque se observó en todos los puntos de tiempo, incluidos los tiempos anteriores a los cuales se había producido una respuesta de anticuerpos anti-VSRRP.

Los valores de copias/ml determinados por la PCR en tiempo real eran mayores que los valores de los títulos de agente infeccioso medidos en cultivo celular por la $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$. Esto se debe a que habitualmente se usa una curva patrón basada en las copias de genoma del virus para la PCR cuantitativa que amplifica directamente una secuencia genómica del virus más que viriones infecciosos conocidos. Los ensayos biológicos tales como el cultivo celular miden la presencia de infectividad, sin embargo, pueden no contar todas las partículas infecciosas presentes en una preparación. En otros estudios se han observado factores que podían afectar al título de agente infeccioso tales como las condiciones del cultivo celular y los anticuerpos in vivo, que pueden neutralizar el virus, que calculan demasiado bajo la cantidad de virus infeccioso medido en la $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$ en los sueros. Alternativamente, pueden encontrarse presentes virus no infecciosos o defectuosos en la replicación, lo cual se reflejaría por un número de copias más alto.

En general, las observaciones por ELISA apoyan el concepto de que la magnitud de la respuesta inmunitaria humoral está relacionada con el nivel de replicación vírica durante la infección aguda. La tendencia indicada en las figuras 4 y 5 ilustra esta relación. Los aislados de virus atenuados en cultivo celular provocaron una respuesta inmunitaria humoral más lenta y menos intensa, mientras que los aislados virulentos provocaron una respuesta inmunitaria humoral más rápida y más intensa. Además, estas observaciones también demuestran que al menos dos factores, el tipo de aislado y la dosis infecciosa, afectan a los valores de la relación S/P relativos, en el ensayo de HerdChek® PRRS ELISA 2XR. Aunque los resultados de ELISA mostrados en la figura 3 indican una respuesta media del grupo positiva o negativa clara, es

importante señalar la variabilidad entre los animales individuales. Algunos cerdos en los grupos de virus atenuados eran positivos antes del día 21, y algunos cerdos en los grupos virulentos permanecían negativos hasta el día 21.

Los análisis de las respuestas de anticuerpos específicas para N y nsp 4 muestran que las respuestas inmunitarias al VSRRP varían de intensidad de forma independiente del aislado inoculado. Las respuestas de anticuerpos a la proteína N en los animales que se inocularon con los aislados muy virulentos MN 184 y JA 142 mostraron una tendencia similar a las de todos los aislados, pero de una magnitud mayor. Los cerdos a los que se inoculó MN 184 y JA142 también tenían los títulos de virus más altos, como se muestra en las figuras 1 y 2. Esto indica que el nivel de respuesta inmunitaria humoral puede estar relacionada con la carga vírica en la infección aguda medida por la titulación de virus. Es interesante, que el transcurso del tiempo de la respuesta era el mismo en todos los grupos, incluso cuando el tiempo para alcanzar el título máximo se retrasaba para el aislado muy virulento 17198-6 y los aislados atenuados. En contraste, la respuesta de anticuerpos a nsp 4 era baja en todos los puntos de tiempo y para todos los aislados, tanto atenuados como virulentos. El transcurso del tiempo de la respuesta anti-nsp 4 era equivalente en todos los grupos a pesar de las diferencias en el tiempo para alcanzar la carga vírica máxima entre los grupos, como se observaba para la respuesta de anticuerpos anti-N. Todos los cerdos tenían respuestas anti-nsp 4 bajas como se muestra en la figura 7.

Estas observaciones indican que algunas de las proteínas del VSRRP provocan una respuesta más fuerte en el sistema inmunitario del hospedante independientemente de la virulencia del aislado al que se ha expuesto. Sin embargo, las observaciones también indican que la magnitud de la respuesta inmunitaria a las proteínas más inmunógenas es probable que esté relacionada con la virulencia del aislado al que se expone, o de la capacidad del aislado para replicarse in vivo. También es posible que las diferencias de respuestas de anticuerpos puedan deberse simplemente a diferencias genéticas entre los aislados que dan como resultado diferencias de reactividad antigénica, de modo que los anticuerpos dirigidos contra N y nsp 4 de otros aislados no reaccionan o reaccionan mal a las proteínas recombinantes expresadas por los VR322 aislados que se usaron para revestir las placas de ELISA. Sin embargo, varias series de pruebas sugieren que las diferencias observadas en los niveles de anticuerpos reflejan respuestas inmunológicas importantes. El aislado MN 184 muestra la diferencia genética mayor respecto a VR2332, determinado por comparaciones del ORF 5, así como la respuesta de anticuerpos anti-N más alta. Kapur et al. (1996) mostraron previamente que las diferencias relativas entre los

aislados de VSRRP en un marco de lectura abierto también están presentes en otros marcos de lectura abiertos. Además, las proteínas individuales contienen regiones conservadas y no conservadas (p.ej. Kapur et al., 1996) y se puede dirigir la reactividad inmunógena extensa hacia los epítomos conservados (Ostrowski et al., 2002). No obstante, a los resultados de ELISA basados en las reacciones de los anticuerpos con las proteínas del VSRRP purificadas les pueden afectar la variación genética y antigénica, y estos efectos deben considerarse. Se llevó a cabo el repliegado de las proteínas recombinantes, pero no se observaron diferencias entre las placas de ELISA revestidas con proteínas no replegadas o replegadas.

10 Se observó que aproximadamente a las 4 a 5 semanas después de la inoculación, se producía una disminución relativamente grande de la respuesta de anticuerpos a las proteínas tanto N como nsp 4. Foss et al. (2002) observaron un máximo similar de 1 a 2 semanas seguido de una disminución de la reactividad de los anticuerpos para GP5, la glicoproteína principal de la envuelta. Estas observaciones
15 consideradas juntas sugieren que es probable que la respuesta a proteínas víricas individuales no represente el escenario completo de la respuesta inmunitaria del cerdo al VSRRP, puesto que la respuesta inmunitaria humoral medida por el ensayo de HerdChek® PRRS ELISA 2XR no muestra un máximo transitorio similar de la reactividad de los anticuerpos.

20 El crecimiento y mortalidad menores era lo que correlacionaba la virulencia y la tasa de crecimiento vírico in vivo. El peso medio más bajo observado en los grupos de exposición a aislados virulentos es probable que reflejara una diferencia en la capacidad de un aislado de VSRRP para replicarse in vivo e inducir una enfermedad más grave en el cerdo. Estas observaciones son concordantes con los datos
25 previamente descritos de que la infección por VSRRP puede producir anorexia con una reducción de 25 a 40 por ciento de reducción en la ganancia de peso diaria (Thacker, 2003). Las puntuaciones clínicas de los animales expuestos a los aislados virulentos mostraron aumentos rápidos justo después de la inoculación, mientras que no hubo prácticamente cambio en las puntuaciones de los animales expuestos a virus
30 atenuados. El aumento de los signos clínicos se reflejó en las tasas de muerte observadas de 50%, 20% y 10% en los grupos de exposición virulenta que recibieron los aislados de VSRRP MN 184, SDSU 73 y JA 142, respectivamente. En contraste, los grupos de exposición atenuada no tuvieron muertes. La relación entre el crecimiento vírico rápido y la patogénesis vírica en las mismas condiciones de
35 exposición vírica era la más evidente comparando los grupos expuestos a MN 184 y Abst-1. Los títulos de inoculación eran prácticamente los mismos, 4,10 log/ml y 4,18

log/ml, respectivamente, y además, como se indicaba en la figura 8, no había diferencias notables en la forma en la que los dos aislados afectaban a los cerdos. El aislado Abst-1 era casi inerte, apenas se replicaba in vivo y no producía signos clínicos. En contraste, el aislado MN 184 se replicaba a títulos extremadamente altos in vivo y producía signos clínicos graves, que daban como resultado la muerte de 50% de los animales expuestos. También es de notar que el grupo de cerdos expuesto a la mezcla de todos los aislados de virus mostró aproximadamente las mismas respuestas virológicas, clínicas e inmunológicas que los cerdos expuestos a MN 184. Este resultado indica que los virus que se replican más rápidamente en una infección mixta es probable que compitan con otros aislados de modo que el resultado neto sea esencialmente el mismo que en una infección con el aislado individual que tiene el potencial de crecimiento más alto.

Las diferencias destacadas in vivo entre los aislados de VSRRP virulentos y aislados arroja luz sobre la relación entre la virulencia de un aislado y su crecimiento y replicación in vivo. Cuando se administran a los cerdos dosis equivalentes, los aislados más virulentos muestran títulos de Log_{10} DICT₅₀/ml y concentraciones por RT-PCR que son exponencialmente más altas que las de los aislados atenuados. Los aislados virulentos inducen una respuesta inmunitaria humoral más rápida e intensa. Los aislados virulentos afectan negativamente a la ganancia de peso e inducen tasas de muerte mayores y signos clínicos más graves comparados con los aislados atenuados.

Como conclusión, los ejemplos y ensayos en la presente solicitud indican que los aislados de VSRRP atenuados y virulentos inducen signos clínicos notablemente diferentes, así como respuestas inmunitarias que difieren en intensidad. Estas diferencias se atribuyen a la capacidad de los virus para replicarse in vivo, una característica fenotípica que se puede medir cuantitativamente en las muestras de suero y se puede desarrollar para predecir la virulencia de los aislados de VSRRP.

EJEMPLO 2

Este ejemplo proporciona varios métodos de atenuación de aislados de VSRRP, así como su inclusión en composiciones inmunógenas.

30 *Materiales y métodos:*

Se formula una preparación de vacuna incorporando un virus vivo modificado o atenuado para la inmunización de cerdos frente a la infección por el virus de SRRP. El VSRRP para la preparación de la vacuna se propaga en la línea celular continua MA-104, preferiblemente ATCC n° CL2621. La línea celular se hace crecer en matraces que contienen MEM, a los que se ha añadido suero de ternero fetal al 10%. El pH del medio se ajusta a aproximadamente 7,2 y se incuba a aproximadamente 37°C. Las

células después se inoculan con el virus por adición de aproximadamente 1 ml de un inóculo congelado al medio líquido. Se deja que el virus se absorba en las células durante 24 horas. En este momento, el medio de crecimiento se cambia a un medio de mantenimiento que consiste en MEM al que se le ha añadido suero de ternero fetal al 4%, pH 7.6. El entorno preferiblemente está entre 35-37°C. El virus se deja crecer hasta que el 50% de la lámina de células MA-104 es destruida por el virus. Después la muestra se vuelve a congelar y se prepara para el pase a otro matraz de células MA-104. Este procedimiento se continúa a lo largo de 25 pases del virus en la línea celular. Después el virus se propaga otras 12 veces a aproximadamente 31°C, frente a los 35-37°C, usando la misma técnica descrita antes. El 12º pase se congela en partes alícuotas pequeñas y se designa como el virus semilla original.

A continuación se exponen los detalles del método preferido.

I. Medio:

- a. Medio esencial mínimo de Eagle (MEM) de JRH Biosciences, nº 200-2041
- b. Suero de ternero fetal (FCS) de JRH biosciences
- c. Medio de crecimiento para siembra de células-MEM+suero de ternero fetal al 10%
- d. Medio de mantenimiento-MEM + suero de ternero fetal al 4%
- e. Tripsina-Versene IX
- f. Solución de bicarbonato de sodio al 5% o saturada

II. Cultivo celular

Línea celular usada: MA-104 (Células de riñón de mono verde africano mantenidas con 20 niveles de pases (pases 58-78))

III. Equipamiento

- matraces de cultivo tisular de 75 cm
- Incubador ajustado a 35-37°C.
- Incubador ajustado a 3°C.
- Centrífuga

IV. Método usado para atenuar el virus VSRRP hecho crecer a 25-37°C.

A. Preparación de la cepa en cultivo tisular:

botellas de cepa de 75 cm² de MA-104 que tenían de 5 a 7 días se reparten 1:4 de la siguiente forma:

- a. Se apartan todos los medios (50 ml por botella).
- b. La lámina de células se elimina usando 10 ml de tripsina-Versene

- 29 -

por incubación a 37°C durante 5-10 minutos.

c. Se sacan las células de la botella y se centrifugan a 270xg durante 5-10 minutos.

5 d. Se decanta el líquido sobrenadante y se vuelven a suspender las células en 5-10 ml de medio de crecimiento (MEM FCS al 10%).

e. Se ponen todas las células en 200 ml de MEM FCS al 10% que después se dispensa en cuatro botellas de 75 cm, 50 ml por botella para una reparto 1:4. Después las botellas se mantienen a 35-37°C hasta que sean necesarias (también se puede hacer sin CO₂).

10 f. Las botellas que tenían 3 ó 4 días que habían formando una lámina de células entera ahora están listas para usar.

g. Se ajusta el pH de 50 ml de medio en el matraz a pH 7,2 y después se añade 1 ml de virus al medio y el matraz se pone a 35-37°C. (también se puede hacer sin CO₂).

15 h. Después de 24 horas, se descarta el medio y el matraz se vuelve a alimentar con 50 ml de MEM FCS al 4%, pH 7,6, y se vuelve a poner a 35-37°C.

i. 24 horas después de cambiar este fluido, que se podía mostrar por el ECP, y cuando hay 50-60% de agujeros en la lámina de células, se congela.

20 j. Se descongela la botella anterior y se toma 1 ml de este fluido y se pasa a una botella nueva de 75 cm como se ha listado antes para hacer el siguiente pase de virus.

Este procedimiento anterior se lleva a cabo un total de 25 veces, con el crecimiento a 35-37°C.

25 Método usado para atenuar el virus VSRRP hecho crecer a 31°C. Los virus pasados 25 veces a 35-37°C se usan para hacer el pase 1 para el virus hecho crecer a 31°C.

A. Preparación de la cepa en cultivo tisular:

botellas de cepa de 75 cm² de MA-104 que tenían 5 a 7 días se reparten 1:4 de la siguiente forma:

30 a. Se apartan todos los medios (50 ml por botella).

b. La lámina de células se elimina usando 10 ml de tripsina-Versene por incubación a 37°C durante 5-10 minutos.

c. Se sacan las células de la botella y se centrifugan a 270xg durante 5-10 minutos.

35 d. Se decanta el líquido sobrenadante y se vuelven a suspender las células en 5-10 ml de medio de crecimiento (MEM FCS al 10%).

95

- 30 -

e. Se ponen todas las células en 200 ml de MEM FCS al 10% que después se dispensa en cuatro botellas de 75 cm, 50 ml por botella para una reparto 1:4. Después las botellas se mantienen a 35-37°C hasta que sean necesarias (también se puede hacer sin CO₂).

5 f. Las botellas que tenían 3 ó 4 días que habían formando una lámina de células entera ahora están listas para usar.

g. Se ajusta el pH de 50 ml de medio en el matraz a pH 7,2 y después se añade 1 ml de virus al medio y el matraz se pone a 31°C. (también se puede hacer sin CO₂).

10 h. Después de 24 horas, se descarta el medio y el matraz se vuelve a alimentar con 50 ml de MEM FCS al 4%, pH 7,6, y se vuelve a poner a 31°C.

i. 24 horas después de cambiar este fluido, que se podía mostrar por el ECP, y cuando hay 50-60% de agujeros en las láminas de células, se congelan.

15 j. Se descongela la botella anterior y se coge 1 ml de este fluido para hacer el siguiente pase del virus SIRS VR-2332.

Este procedimiento anterior se lleva a cabo un total de 12 veces, a 31°C. El pase 12º de virus hechos crecer a 31°C se designa como el virus semilla original para la producción de vacuna.

Atenuación del virus del SRRP por delección génica

20 Un experto en la técnica puede atenuar el VSRRP por el método convencional de delección génica. En general, este método implica la delección de un gen que codifica los fenotipos virulentos del virus. Dicho método se puede adaptar de referencias tales como Elbers et al. (solicitud de patente de EE.UU. nº 20020012670) o Schall et al. (patente de EE.UU. nº 6.740.324), cuyas enseñanzas y contenidos se incorporan por
25 referencia en esta memoria.

Atenuación del virus del SRRP por mutación sensible a la temperatura

Un experto en la técnica también puede atenuar el VSRRP por el método convencional de mutación sensible a la temperatura. En general, este método implica producir una mutación que limita el intervalo de temperatura en el que el virus es
30 activo. Por ejemplo, el método de Skiadopoulos et al., "Identification of Mutations Contributing to the Temperature-Sensitive, Cold-Adapted, and Attenuation Phenotypes of the Live-Attenuated Cold-Passage 45 (cp45) Human Parainfluenza Virus 3 Candidate Vaccine", 73 No. 2 *Journal of Virology* 1374, (February 1999) se puede
35 adaptar para usar con el VSRRP. Las enseñanzas y el contenido de Skiadopoulos et al. se incorporan por referencia en esta memoria.

Atenuación del virus del SRRP por generación de un clon infeccioso

Un experto en la técnica puede atenuar el VSRRP por el método convencional de generación de un clon infeccioso. Este método en general implica la creación de un clon de ADNc de longitud completa del genotipo vírico deseado, siendo este clon también virulento en los animales objetivo. Por ejemplo, el método de Nielson et al.,
5 "Generation of an Infections Clone of VR-2332, a Highly Virulent North American-Type Isolate of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus", 77 *Journal of Virology* 3702 (Mar. 2003), se puede adaptar para una versión atenuada del VSRRP. Las enseñanzas y el contenido de Nielson et al. se incorporan por referencia en esta memoria.

10 *Atenuación del virus del SRRP por inserción génica*

Un experto en la técnica también puede atenuar el VSRRP por el método convencional de inserción génica. Este método en general implica la inserción de un gen en el virus, que inhibe los fenotipos patógenos de dicho virus. Por ejemplo, el método de Schall et al. (patente de EE.UU. n° 6.740.324) se puede adaptar para una
15 versión atenuada del VSRRP. Las enseñanzas y el contenido de Schall et al. se incorporan por referencia en esta memoria.

Atenuación del virus del SRRP por sustitución

Un experto en la técnica también puede atenuar el VSRRP por los métodos convencionales de sustitución de codones y pares de bases. En general, la sustitución
20 de codones o pares de bases implica la sustitución de un codón o par de bases por un codón o par de bases diferente, de modo que ahora el nuevo gen vírico codifique una proteína que limite la patogenicidad del virus. Por ejemplo, el método de sustitución de codón de McAuliffe et al., "Codon Substitution Mutations at Two Positions in the L Polymerase Protein of Human Parainfluenza Virus Type 1 Yield Viruses with a
25 Spectrum of Attenuation In Vivo and Increased Phenotypic Stability In Vitro", 78 *Journal of Virology* 2029 (February 2004) se puede adaptar para crear un método de sustitución génica para atenuar el VSRRP. También, Hummelbrink y McMinn, "Attenuation of Murray Valley Encephalitis Virus by Site-Directed Mutagenesis of the Hinge and Putative Receptor-Binding Regions of the Envelope Protein", 75 *Journal of*
30 *Virology* 7692 (August 2001) y Elbers et al. (solicitud de patente de EE.UU. n° 20020012670) proporcionan métodos de sustitución de pares de bases que se pueden adaptar para crear un aislado de VSRRP atenuado. Las enseñanzas y contenidos de McAuliffe et al., Hummelbrink y McMinn, y Elbers et al. se incorporan por referencia en esta memoria.

35 *Atenuación del virus del SRRP mediante el uso de construcciones de SRRP quiméricas*

Un experto en la técnica también puede atenuar el VSRRP por el método convencional de construcciones quiméricas. En general, una construcción quimérica es una que contiene genes de una especie diferente con el fin de inducir una respuesta antigénica en una célula hospedante. Por ejemplo, dicha construcción se puede crear adaptando el método de Harris et al. (solicitud de patente de EE.UU. n° 20040157307) para crear una construcción quimérica con genes de SRRP.

Incorporación de aislados de virus del SRRP atenuados en composiciones inmunógenas:

Después de atenuar los nuevos aislados, preferiblemente por uno de los métodos indicados antes, los aislados atenuados se pueden incorporar en composiciones eficaces para proporcionar una respuesta inmunitaria frente a aislados virulentos del virus del SRRP. En formas preferidas, dichas composiciones proporcionarán a un animal que recibe una cantidad eficaz de la composición, inmunidad protectora contra la infección de SRRP. Dicha inmunidad protectora reducirá la gravedad de los signos clínicos de la infección de SRRP en los animales vacunados que posteriormente se exponen o son infectados por un aislado de virus del SRRP virulento. Preferiblemente, dichos signos clínicos se prevendrán por la administración de una cantidad eficaz de la composición inmunógena o vacuna. En algunas formas, los aislados de virus del SRRP atenuados se usarán para producir una vacuna de virus vivos modificados, en la que se usan aislados atenuados en estado vivo en las composiciones inmunógenas. En otras formas, los aislados atenuados se matarán o inactivarán antes de incorporarlos en las composiciones inmunógenas.

Referencias

Las enseñanzas y contenidos de cada una de las siguientes referencias se incorporan por referencia en esta memoria.

Albina, E., Piriou, L., Hutet, E., Cariolet, R., L'Hospitalier, R., 1998. Immune Responses in Pigs Infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 61, 49-66.

Andreyev, V. G., Wesley, R. D., Mengeling, W. L., Vorwald, A. C., Lager, K. M., 1997. Genetic Variation and Phylogenetic Relationships of 22 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Field Strains Based on Sequence Analysis of Open Reading Frame 5. *Arch. Virol.* 142, 993-1001.

Cavanagh, D., 1997. Nidovirales: a New Order Comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* 142, 629-633.

- Chang, C. C., Yoon, K. J., Zimmerman, J. J., Harmon, K. M., Dixon, P. M., Dvorak C. M. T., Murtaugh, M. P., 2002. Evolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus During Sequential Passages in Pigs. *J. Virology*. **76**, 4750-4763.
- 5 Grebennikova, T. V., Clouser, D. F., Vorwald, A. C., Musienko, M. I., Mengeling, W. L., Lager, K. M., Wesley, R. D., Biketov, S. F., Zaberezhny, A. D., Aliper, T. I., Nepoklonov, E. A., 2004. Genomic Characterization of Virulent, Attenuated, and Revertant Passages of North American Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain. *Virology*. **321**, 383-390.
- 10 Dianzani F., G. Anelli, E. Riva, O. Turiziani, L. Antonelli, S. Tying, D. Carrasco, H. Lee, D. Nguyen, J. Pan, J. Poast, M. Cloyd, S. Baron. 2002. Is Human Immunodeficiency Virus Rna Load Composed Of Neutralized Immune Complexes? *Journal of Infectious Diseases*. **185**:1051-1054.
- 15 Foss, D.L., Zilliox, M.J., Meier, W., Zuckermann, F., Murtaugh, M.P. 2002. Danger Signals Increase the Immune Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Virus Res*. **15**, 557-566.
- 20 Halbur, P. G., Pallares, F. J., Rathje, J. A., Evans, R., Hagemoser, W. A., Paul, P. S., Meng, X. J., 2002. Effects of Different Us Isolates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) on Blood and Bone Marrow Parameters of Experimentally Infected Pigs. *Vet Rec*. **21**, 344-348.
- 25 Halbur, P. G., Paul, P. S., Meng, X. J., Lum, M. A., Andrews, J. J., Rathje, J. A., 1996. Comparative Pathogenicity of Nine Us Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Isolates in a Five-week-old Cesarean-derived, Colostrums-deprived Pig Model. *J. Vet. Diagn. Invest*. **8**, 11-20.
- 30 Haynes, J. S., Halbur, P. G., Sirinarumit, T., Paul, P. S., Meng, X. J., Huffman, E. L., 1997. Temporal and Morphologic Characterization of the Distribution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) by in Situ Hybridization in Pigs Infected with Isolates of PRRSV That Differ in Virulence. *Vet. Pathol*. **34**, 39-43.
- 35 Hill, H., 1990. Overview And History Of Mystery Swine Disease (Swine Infertility And Respiratory Syndrome). In *Mystery Swine Disease Communication Meeting*. Denver, CO, pp. 29-31.
- Kapur, V., Elam, M.R., Pawlovich, T.M. Murtaugh, M.P. 1996. Genetic Variation In PRRS Virus Isolates In The Midwestern United States. *J. Gen. Virol*. **77**, 1271-1276.
- Key, K. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Swenson, S. L., Toth, T. E., Meng, X. J., 2001. Genetic Variation And Phylogenetic Analyses Of The Orf5 Gene Of Acute

Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Isolates. *Vet. Micro.* **83**, 249-263.

- Labarque, G., Van Gucht, S., Van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M., 2003. Respiratory Tract Protection Upon Challenge Of Pigs Vaccinated With Attenuated Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Vaccines. *Vet. Micro.* **95**, 187-197.

Meng, X. J., 2000. Heterogeneity of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Implications for Current Vaccine Efficacy and Future Vaccine Development. *Vet. Micro.* **74**, 309-329.

- 10 Mengeling, W. L., Lager, K. M., Vorwald, A. C., Clouser, D. F., 2003a. Comparative Safety and Efficacy of Attenuated Single-strain and Multi-strain Vaccines for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. *Vet. Micro.* **93**, 25-38.

- Mengeling, W. L., Lager, K. M., Vorwald, A. C., Koehler, K. J., 2003b. Strain Specificity of the Immune Response of Pigs Following Vaccination with Various Strains of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet. Micro.* **93**, 13-24

Mengeling, W. L., Lager, K. M., Vorwald, A. C., 1998. Clinical Effects of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus on Pigs During the Early Postnatal Interval. *Amer. J. Vet Res.* **59**, 52-55.

- 20 Murtaugh, M.P., K.S. Faaberg, J. Laber, M. Elam, and V. Kapur. 1998. Genetic Variation In The PRRS Virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**, 787-794.

Murtaugh, M. P., Xiao, Z., Zuckermann, F., 2002. Immunological Responses Of Swine To Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Infection. *Viral Immunology.* **15**, 533-547.

- 25 Nodelijk, G., de Jong, M. C. M., van Leengoed, L. A. M. G., Wensvoort, G., Pol, J. M. A., Steverink, P. J. G. M., Verheijden, J. H. M., 2001. A Quantitative Assessment Of The Effectiveness Of PRRSV Vaccination In Pigs Under Experimental Conditions. *Vaccine* **19**, 3636-3644.

- Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J. 2002. Identification Of Neutralizing And Nonneutralizing Epitopes In The Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Gp5 Ectodomain. *J. Virol.* **76**, 4241-4250.

- 35 Opriessnig, T., Halbur, P. G., Yoon, K. J., Pogranichniy, R. M., Harmon, K. M., Evans, R., Key, K. F., Pallares, F. J., Thomas, P., Meng, X. J., 2002. Comparison Of Molecular And Biological Characteristics Of A Modified Live Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Vaccine (Ingelvac PRRS Mlv), The Parent Strain

Of The Vaccine (Atcc Vr2332), Atcc Vr2385, And Two Recent Field Isolates Of PRRSV. *J. Virol.* **76**, 11837-11844.

Pejsak, Z., Stadejek, T., Markowska-Daniel, I., 1997. Clinical Signs And Economic Losses Caused By Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus In A Large Breeding Farm. *Vet. Micro.* **55**, 317-322.

Reed, L., Muench, H., 1938. A Simple Method For Estimating Fifty Percent Endpoints. *Am J Hyg.* **27**, 493-497.

Roof, M.B., Vaughn, E.M., Burkhart, K.M., Faaberg, K.S. 2003. Efficacy Of Modified Live Virus Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Vaccines Against Heterologous Respiratory Challenge. *Proc. 4th Inter. Symp. Emerging Re-emerging Pig Diseases*. pp. 117-118.

Thacker, B., 2003. Clinical Manifestations Of PRRS Virus. *En: Zimmerman, J., Yoon, K. J. (Eds.), 2003 PRRS Compendium Second Edition. National Pork Board, Des Moines IA USA*, pp. 7-12.

Thanawongnuwech, R., Halbur, P. G., Ackermann, M. R., Thacker, E. L., Royer, R. L., 1998. Effects Of Low (Modified-live Virus Vaccine) And High (Vr-2385)-virulence Strains Of Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus On Pulmonary Clearance Of Copper Particles In Pigs. *Vet. Pathol.* **35**, 398-406.

Yuan, S., Mickelson, D., Murtaugh, M. P., Faaberg, K. S., 2001. Erratum To "Complete Genome Comparison Of Porcine Reproductive And Respiratory Syndrome Virus Parental And Attenuated Strains". *Virus Research.* **79**, 189-200.

REIVINDICACIONES:

1. Un método para predecir la virulencia de un aislado de virus del SRRP de virulencia desconocida, que comprende las etapas de administrar una cantidad de dicho aislado de virus del SRRP a cerdos sin SRRP, permitiendo que el virus se replique en dichos cerdos durante un periodo de aproximadamente 3-15 días, midiendo la tasa de crecimiento del virus y/o la magnitud de la viremia durante dicho periodo, y comparando dicha tasa de crecimiento o magnitud de la viremia con la tasa de crecimiento y/o magnitud de la viremia de un aislado de virus del SRRP de virulencia conocida como un indicador de la virulencia del aislado de virus del SRRP de virulencia desconocida.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho periodo es de aproximadamente 3 a 7 días.
3. El método de la reivindicación 1, que incluye la etapa de medir la magnitud de la viremia durante dicho periodo, y comparar dicha magnitud con la magnitud de la viremia de dicho aislado de virus del SRRP conocido.
4. El método de la reivindicación 1, en el que dicha cantidad de virus administrada es similar a la cantidad que recibiría un animal por exposición natural.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho virus del SRRP se administra por un método seleccionado del grupo que consiste en administración oral, intranasal, intramuscular, intra-ganglio linfático, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, y sus combinaciones.
6. El método de la reivindicación 1, en el que dicha tasa de crecimiento o magnitud de la viremia se miden en una muestra biológica de dicho cerdo.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicha viremia se mide por el Log10 DICT50/ml, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, ELISA específico para SRRP, ELISA específico para proteínas de SRRP, y sus combinaciones.
8. El método de la reivindicación 1, que además incluye la etapa de

102

observar en dicho cerdo los signos clínicos de infección de SRRP después de administrar dichos aislado de virus del SRRP.

5 9. El método de la reivindicación 8, en el que dichos signos clínicos incluyen signos respiratorios, de comportamiento, toses y sus combinaciones.

10 10. El método de la reivindicación 1, que además incluye la etapa de predecir que el aislado de virus del SRRP será muy virulento cuando su tasa de crecimiento o la magnitud de la viremia son similares a las de un aislado con virulencia alta.

15 11. El método de la reivindicación 1, que además incluye la etapa de predecir que el aislado de virus del SRRP será poco virulento cuando su tasa de crecimiento o la magnitud de la viremia son similares a las de un aislado con virulencia baja.

20 12. El método de la reivindicación 1, en el que dicha cantidad administrada de virus del SRRP es de hasta aproximadamente 5 ml de inóculo que tiene una concentración vírica de hasta 5,0 Log₁₀ DICT₅₀/ml.

25 13. Una composición inmunógena que comprende un aislado de virus del SRRP atenuado y un vehículo farmacológicamente compatible, seleccionándose dicho aislado atenuado del grupo que consiste en Abst-1 y formas atenuadas de un virus del SRRP que se ha predicho que es virulento por el método de la reivindicación 1.

14. La composición de la reivindicación 13, en la que dicho aislado atenuado es Abst-1.

30 15. La composición de la reivindicación 13, en la que dicho virus del SRRP que se ha predicho que es virulento por el método de la reivindicación 1, se selecciona del grupo que consiste en ATCC VR-2332, ATCC PTA-6504, ATCC PTA-6319, ATCC PTA-6321, y ATCC PTA-6322.

35 16. Un método de selección de un aislado de virus del SRRP para atenuar e incluir en una composición inmunógena, que comprende las etapas de:

a) obtener un aislado de virus del SRRP de virulencia desconocida;

- 38 -

b) administrar una cantidad de dicho aislado de virus del SRRP a un cerdo que no tiene SRRP;

c) dejar que dicho aislado se replique en el cerdo durante un periodo de aproximadamente 3-15 días;

5 d) medir la tasa de crecimiento del virus y/o la magnitud de la viremia durante dicho periodo;

e) comparar dicha tasa de crecimiento o magnitud de la viremia con la tasa de crecimiento y/o magnitud de la viremia de un aislado de virus del SRRP de virulencia conocida; y

10 f) seleccionar un aislado para atenuar e incluir en una composición inmunógena basándose en su tasa de crecimiento y/o su magnitud de la viremia comparado con los aislados de virulencia desconocida.

15 17. El método de la reivindicación 16, en el que la etapa (f) además incluye la etapa de seleccionar un aislado que tiene una tasa de crecimiento y/o magnitud de la viremia similar a un aislado muy virulento.

18. El método de la reivindicación 16, que además incluye la etapa de atenuar el virus seleccionado.

20 19. El método de la reivindicación 18, en el que dicho virus se atenúa por un método seleccionado del grupo que consiste en pases seriados repetidos en cultivo celular, inserción génica, cambio génico, delección génica, sustitución de par de bases y mutación sensible a la temperatura.

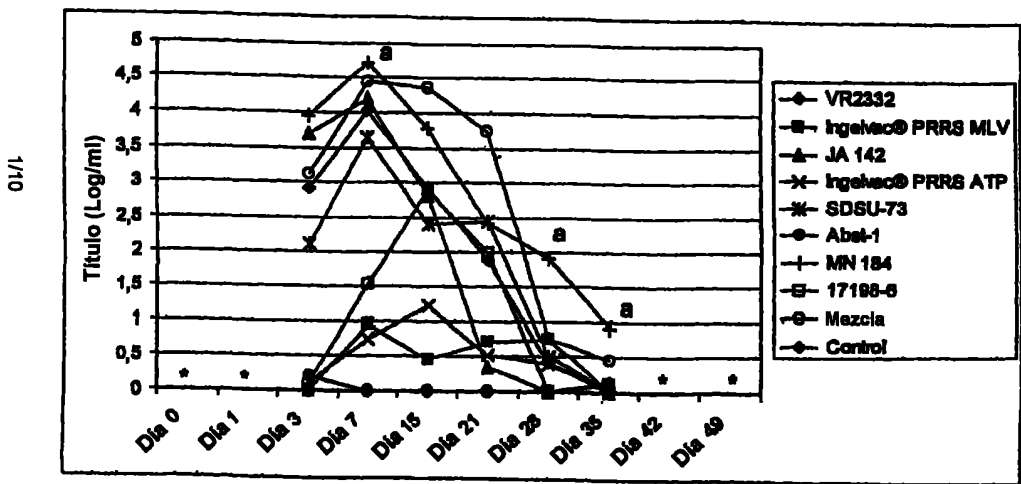
25 20. El método de la reivindicación 18, que además incluye la etapa de incorporar dicho virus seleccionado en una composición inmunógena.

104

RESUMEN

Se proporciona un método para predecir la virulencia de un aislado de virus del SRRP nuevo o sin caracterizar, en el que el aislado se inyecta en un cerdo y se deja replicar durante un periodo de 3-15 días. Durante este periodo, se determinan la tasa de crecimiento del virus y/o la magnitud de la viremia, y estos datos se comparan con la correspondiente tasa de crecimiento y/o magnitud de la viremia de un aislado de virus del SRRP de virulencia conocida, como medida de la virulencia del aislado nuevo o sin caracterizar. Además, también se proporciona un método para seleccionar un aislado para incluir en una composición inmunógena, basado en la virulencia predicha, junto con composiciones que incorporan formas atenuadas de virus que se ha predicho que son virulentos.

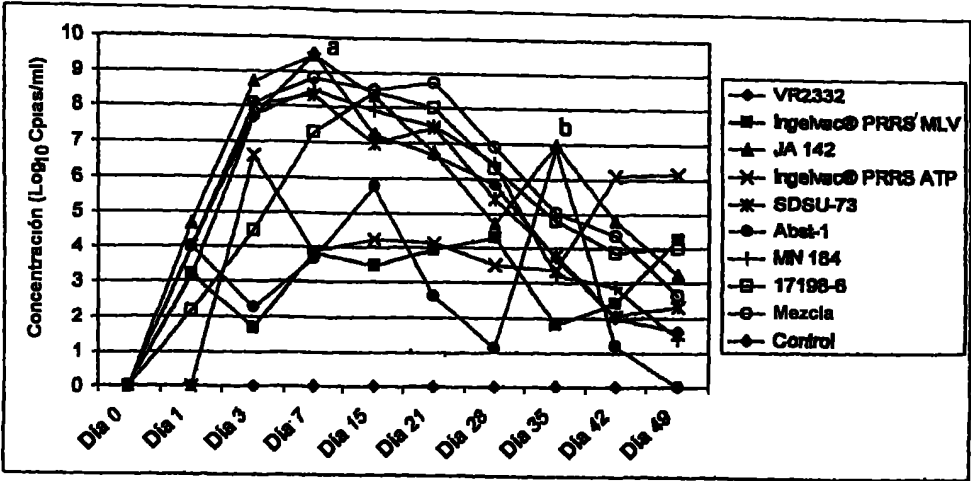
Fig. 1



105

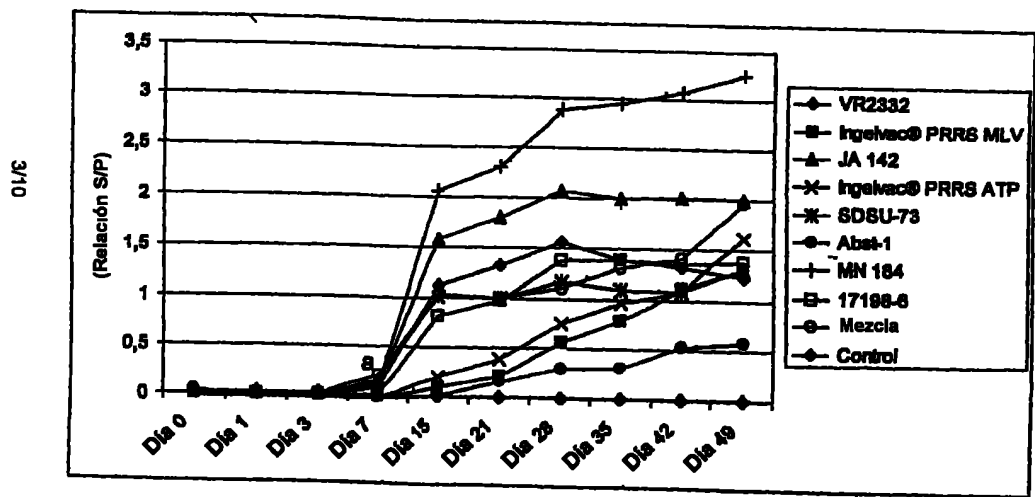
Fig. 2

2/10



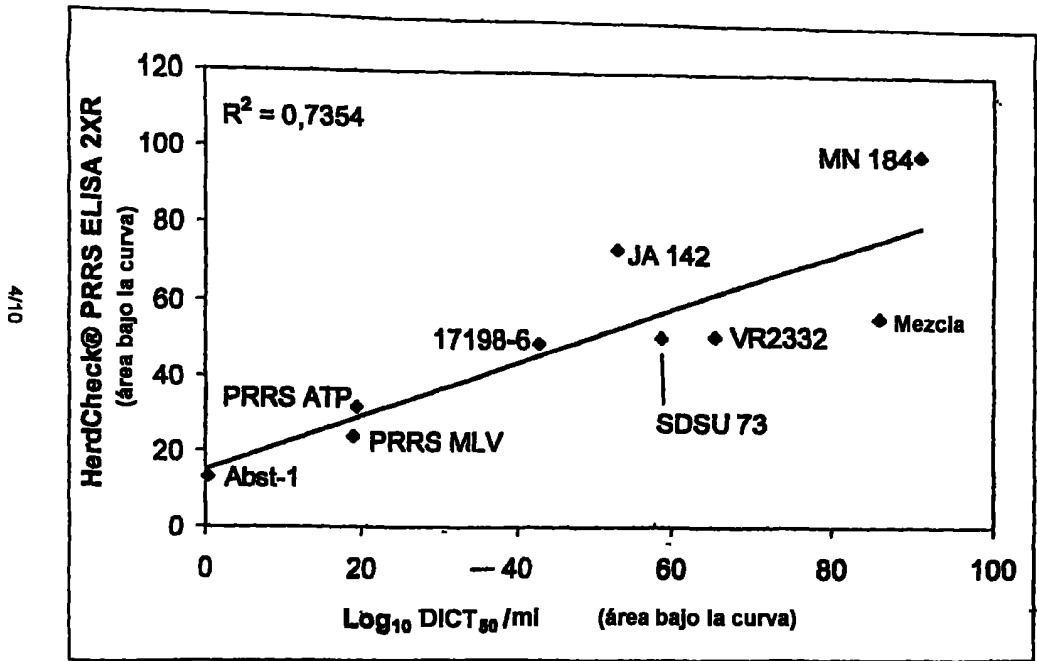
10

Fig. 3



10

Fig. 4



P10-0064-PCT

[Signature]

Fig. 5

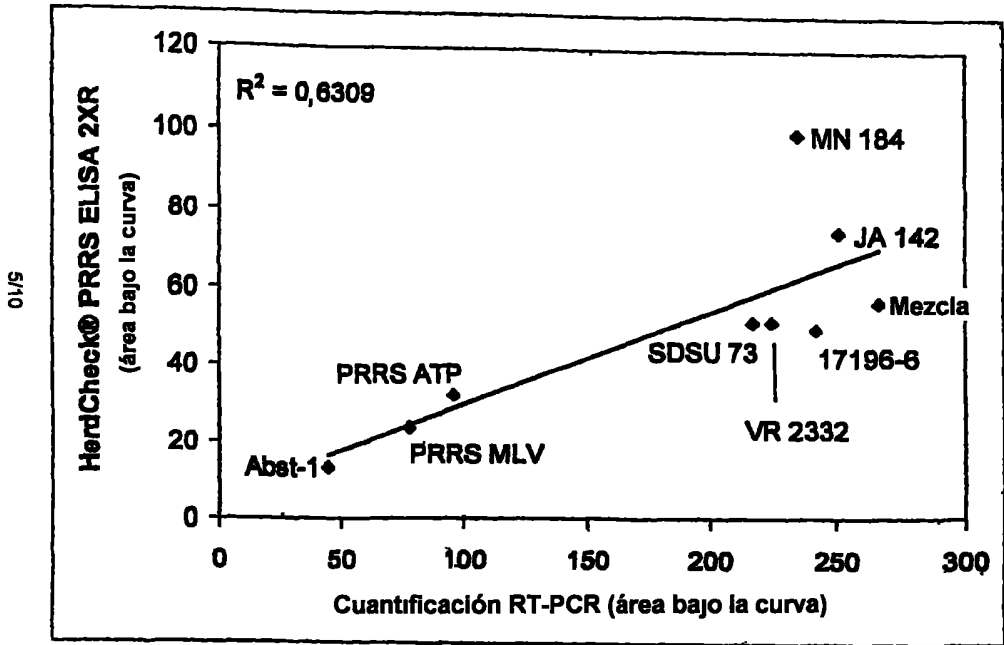
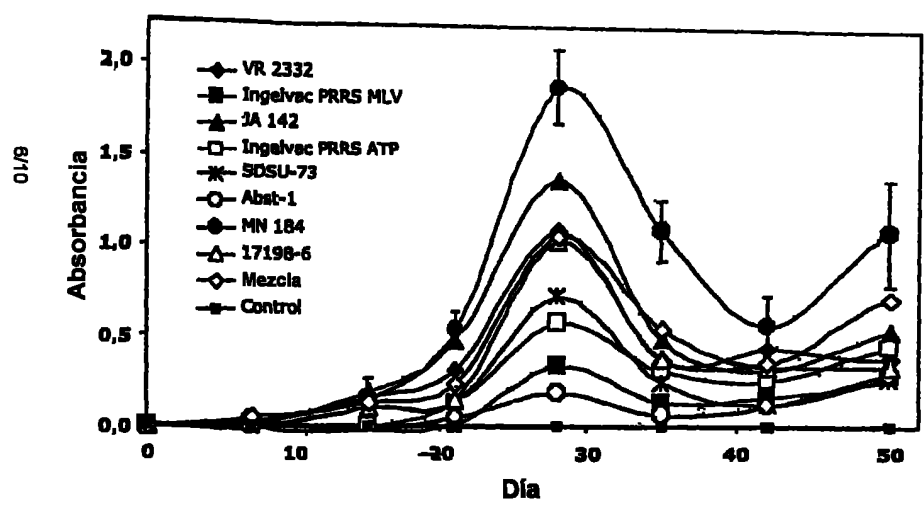


Fig. 6 a

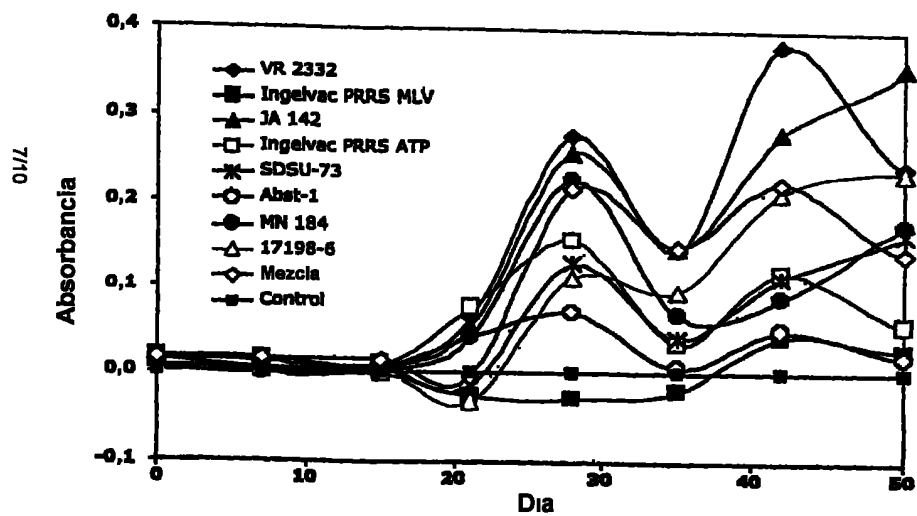


P10-0084-PCT

11

777

Fig. 6 b



P10-0084-PCT

III

Fig. 7

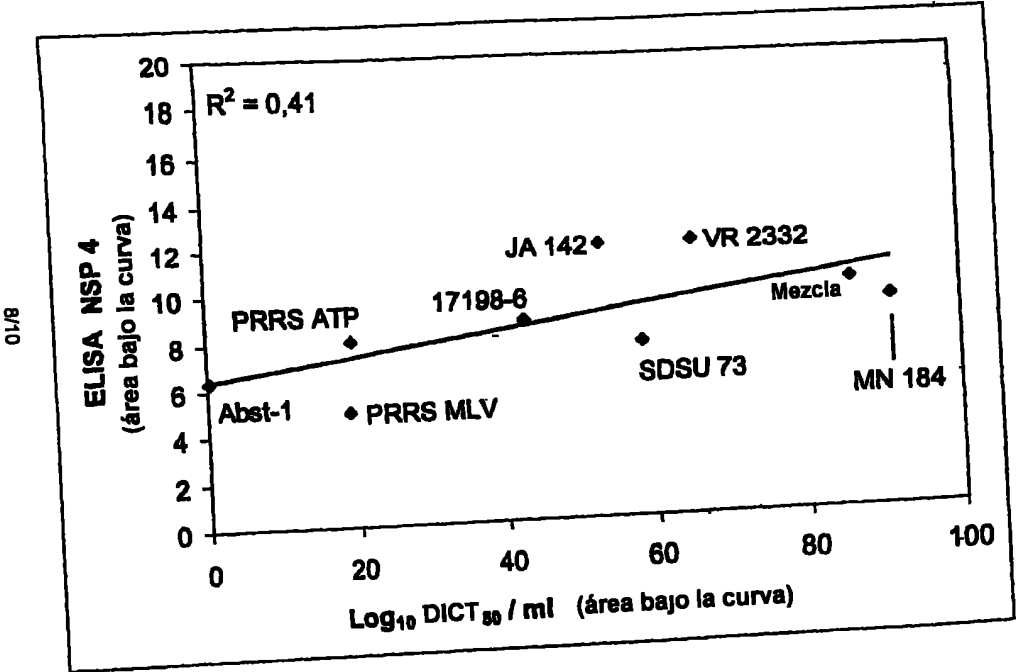
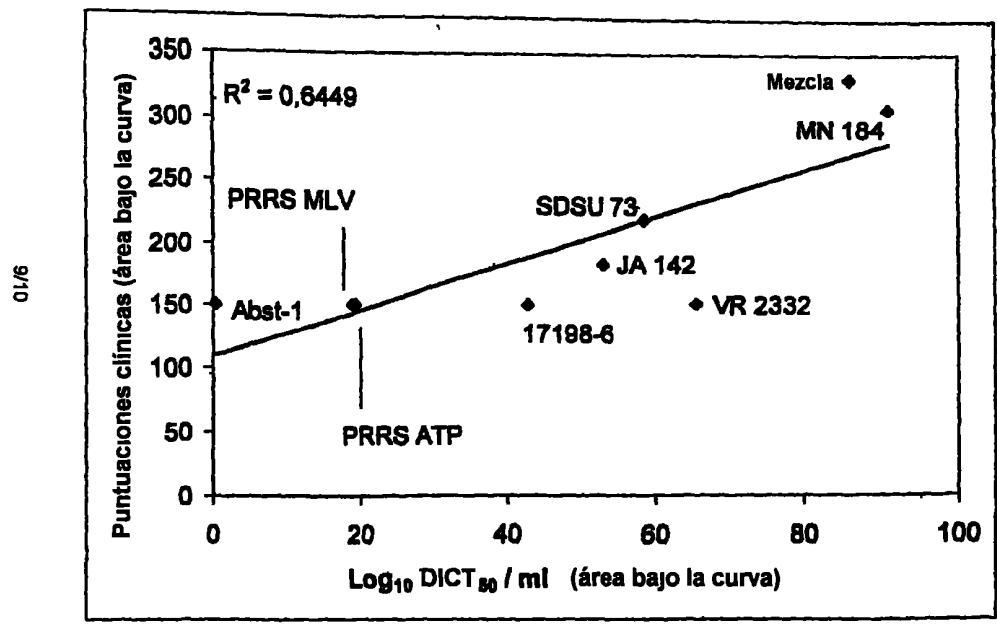


Fig. 8

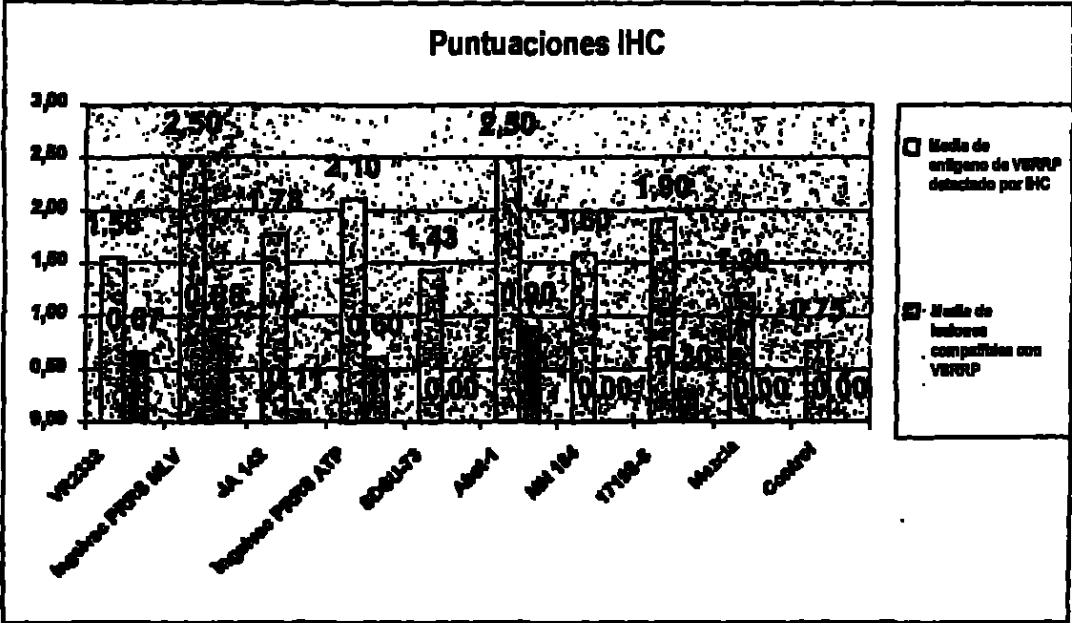


P10-0084-PCT

15

1.04

Figura 9: Media de puntuaciones ICH



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/33760

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER														
IPC: C12Q 1/70(2006.01);C12N 7/00(2006.01), 7/02(2006.01), 7/04(2006.01), 7/08(2006.01)														
USPC: 435/5,320.1,235.1,236,237,239;424/218.1														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED														
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/5,320.1,235.1,236,237,239;424/218.1														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	OPRIESSNIG, T. et al., Comparison of Molecular and Biological Characteristics of a Modified Live Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Vaccine (Ingelvac PRRS MLV), the Parent Strain of the Vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and Two Recent Field Isolates of PRRSV Journal of Virology 2002 VOL. 76, No. 23, pages 11837-11844	1-13, 15-20												
X,P	JOHNSON, W et al., Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection, Veterinary Immunology and Immunopathology, Volume 102, Issue 3, PRRS Immunology and Immunopathology Special Issue, 8 December 2004, Pages 233-247, see Table 1 and Figures 2-4.	1-20												
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.														
<table><tr><td>* Special categories of cited documents:</td><td>-T- later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td></tr><tr><td>"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td><td>-X- document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td></tr><tr><td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td><td>-Y- document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td></tr><tr><td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td><td>-A- document member of the same patent family</td></tr><tr><td>"O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td><td></td></tr><tr><td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td><td></td></tr></table>			* Special categories of cited documents:	-T- later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	-X- document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	-Y- document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	-A- document member of the same patent family	"O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:	-T- later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	-X- document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	-Y- document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	-A- document member of the same patent family													
"O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 17 February 2006 (17.02.2006)		Date of mailing of the international search report 05 APR 2006												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1430 Alexandria, Virginia 22313-1430 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Myron G. Hill Telephone No. 703-308-0196												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/33760

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MENG, XI, Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development, Veterinary Microbiology, Volume 74, Issue 4, , 12 June 2000, Pages 309-329, seeabstract, page 11838 column 2, Table 1 and Figure 2.	1-20

117

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/33760

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-15, drawn to a method of predicting virulence of PRRSV and immunogenic composition .

Group II, claim(s) 16-20, drawn to a method of selecting a virus starting with a virus for attenuation.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The first named product is disclosed in Chladek et al (US 5989563) see claims.

The method of Group II does not require the same technical feature (virus) of Group I.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST STN-MEDLINE

terms- PRRSV, attenuated, pathogenicity, vr-2332, method

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/33760

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703-345-5700 • FAX: 703-345-3745

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3 AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.
Attn: Michael Roof
2501 N. Loop Drive
Suite 1000
Amen, LA 50010

Deposited on Behalf of: Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.

Identification Reference by Depositor:

Patent Deposit Designation

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: PRRS MN184	PTA-6319
Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: PRRS ABST-1	PTA-6320
Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: PRRS 17194-6	PTA-6321
Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: PRRS SDSU 73	PTA-6322

The deposits were accompanied by: a scientific description , a proposed taxonomic description indicated above. The deposits were received November 13, 2004 by the International Depository Authority and have been accepted.

AT YOUR REQUEST: ☒ We will inform you of requests for the strains for 30 years.

The strains will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strains, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strains.

If the cultures should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace them with living cultures of the same.

The strains will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the cultures cited above was tested April 8, 2005. On that date, the cultures were viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:

Maria Kurich
Maria Kurich, Patent Specialist, ATCC Patent Depository

Date: April 25, 2005

cc: Mary-Elise Devlin
Docket or Case No: 10058

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20108-2249 • Telephone: 703-261-2700 • FAX: 703-261-2745

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3 AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Boehringer Ingelheim Vaccines, Inc.
Attn: Michael Roof
2901 N. Loop Drive
Suite 1000
Amen, IA 50010

Deposited on Behalf of: **Boehringer Ingelheim Vaccines, Inc.**

Identification Reference by Depositor:

PRIS JA-143

Patent Deposit Designation

PIA-6304

The deposit was accompanied by: a scientific description a proposed taxonomic description indicated above.

The deposit was received January 11, 2005 by the International Depository Authority and has been accepted.

AT YOUR REQUEST: ☒ We will inform you of requests for the strain for 30 years.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strain.

If the culture should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace it with living culture of the same.

The strain will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the culture cited above was tested August 12, 2005. On that date, the culture was viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108-2249 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:

Maria Harris
Maria Harris, Patent Specialist, ATCC Patent Depository

Date: September 9, 2005

cc: Mary Ellen Devlin
Deposit or Case No: 10/058

JUN 12 '98 14:57 FR BI LEGAL

283 791 6183 TO 918164749837

P.02/02



American Type Culture Collection

12301 Rockville Drive • Rockville, MD 20850 USA • Telephone: (301) 291-5300 Telex: 006-006-ATCCNOR TE • FAX: 301-291-5297

The American Type Culture Collection (ATCC) has received your deposit of a culture in connection with the filing of an application for patent. The following information is provided to fulfill requirements.

Name and Address of Depositor:

Boehringer Ingelheim Corporation
Attention: Mary-Ellen M. Timbers
90 East Ridge
Ridgefield, CT 06877

SEP 03 1991

Deposited on Behalf of:

Dan W. Chladak, Director, Biological Research

PATENT SECTION

Date of Receipt of Culture by the ATCC:

July 18, 1991

Scientific Description

Depositor's Reference

ATCC Designation

SIRS Virus

BIAM-001

VR 2932

The ATCC understands that:

1. The deposit of this culture does not grant to ATCC during the effective term of the patent anticipated a license, either expressed or implied, to infringe the patent, and our release of this culture to others does not grant them a license, either expressed or implied, to infringe the patent.
2. If this culture should die or be destroyed during the effective life of the patent, it shall be your responsibility to replace it with a living culture of the same organism. It is also your responsibility to supply sufficient quantity for distribution for the period of time specified.

The ATCC agrees that in consideration for a one-time service charge, not to distribute this culture or any information relating thereto or to its deposit until such time as a patent has been issued disclosing the above deposit except in accordance with U.S. Patent Office Rule of Practice, Rule 14, or until you authorize us to make this strain available. After a patent is issued and we are so informed, the culture will be made available for distribution to the public. The ATCC agrees to maintain the culture for a period of 30 years from deposit date, or until at least five years after the most recent request for a sample, whichever is longer.

We further agree that the name and address of every requester shall be communicated to the depositor.

The culture was tested and was viable on August 22, 1991.

Partial Payment in the amount of \$880.00 received. Thank you.

American Type Culture Collection

By Bobbie A. Brandon
(Mrs.) Bobbie A. Brandon, Head
ATCC Patent Depository

Date: August 28, 1991

cc: Dan W. Chladak

RECEIVED

SEP 3 1991

M-E. M. TIMBERS

23

LAW OFFICES
HOVEY WILLIAMS LLP
A UNITED LIABILITY PARTNERSHIP OF PROFESSIONAL CORPORATIONS
ESTABLISHED 1899
INTELLECTUAL PROPERTY LAW
U.S. & FOREIGN PATENTS, TRADEMARKS, COPYRIGHTS
AND OTHER INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

722

Therapy R. Truitt
ttr@hoveywilliams.com

December 15, 2005

Amt. Commissioner for Patents
Box PCT
Alexandria, VA 22313-1450

RE: International Application No. PCT/US2005/013760
International Filing Date: 21 September 2005
Title: FORCING REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME ISOLATES AND
METHODS OF USE
Applicant: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
Attorney's Reference No. 35241-CIP1-PCT

REQUEST FOR ADDITION TO PRIORITY CLAIM

Sir:

Pursuant to Rule 26bis / applicant hereby requests that additional priority patent application serial no. 11/230 723 filed on September 20, 2005 be added to the PCT filed September 21 2005

Please find enclosed replacement page 3 of the previously filed PCT Request and the additional priority claim fee of \$20.00. Any additional fee which might be due in connection with this application should be applied against our Deposit Account No. 19-0522.

If you have any questions regarding the above, please feel free to contact the undersigned.

Sincerely,

HOVEY WILLIAMS LLP

By 
Therapy R. Truitt

TST:mse
Enclosure

1400 BRAND BUILDING SUITE 400 SAN ANTONIO TEXAS 78204-2629
T 214.741.0000 F 214.741.0007
www.hoveywilliams.com

Part No. V

DECLARATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.800, the designation of all Contracting States bound by the PCT as the designated filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of each regional and national patent.

However:

☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection

☐ FR Republic of France is not designated for any kind of national protection

☐ HU Hungary is not designated for any kind of national protection

(The checkboxes above may be used to exclude (voluntarily) the designations concerned in order to avoid the creation of the PCT, under the national law provisions, from which priority is claimed. See the Notes to Part No. V as to the consequences of such national law provisions in those and certain other States.)

Part No. VI

PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Union	regional application: regional Office	international application: receiving Office
Item (1) 23 December 2004 (23.12.04)	11022,582	US		
Item (2) 21 September 2004 (21.09.04)	09011,824	US		
Item (3) 20 September 2005 (20.09.05)	11230,753	US		

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Sheet.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) date if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office. If not, please see:

☒ all items

☐ Item (1)

☐ Item (2)

☐ Item (3)

☐ other: see Supplemental Sheet

There is no earlier application in a PCT form, subject to the fact that the priority is claimed in the PCT form. If the priority is claimed in a PCT form, the priority is claimed in the PCT form. If the priority is claimed in a PCT form, the priority is claimed in the PCT form.

Part No. VII

INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Check of International Searching Authority (ISA) (If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the authority chosen, the two-letter code may be used).

ISA/US

Request to use results of earlier search: reference to that search (If an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority).

Date (day/month/year)	Number	Country (or regional Office)
-----------------------	--------	------------------------------

Part No. VIII

DECLARATIONS

The following declarations are contained in Part No. VII (i) to (v) (and the applicable checkboxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

	Number of declarations
☐ Part No. VII (i) Declaration as to the identity of the inventor	
☐ Part No. VII (ii) Declaration as to the applicant's entitlement, as of the international filing date, to apply for and be granted a patent	
☐ Part No. VII (iii) Declaration as to the applicant's entitlement, as of the international filing date, to claim the priority of the earlier application	
☐ Part No. VII (iv) Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	
☐ Part No. VII (v) Declaration as to non-prejudicial disclosure or acceptance to look of novelty	

Form PCT/RO/101 (second sheet) (April 2003)

See Notes to the request form

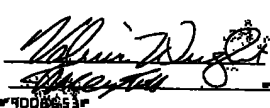
Legislation 2003, Form PCT/RO/101

124

124

BOEHRINGER-INGELHEIM VETMEDICA INC. 15 December 2005
Dkt. No. 35241-CIP1-PCT
Appl. No. PCT/US2006/033760 TST
Filed 21 September 2006
PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME ISOLATES
AND METHODS OF USE
INSTRUMENT: Express Mail # EV 760671047 US
Transmittal and Express Mail certificate Ltr No Request
for Addition to Priority Claim Replacement page 4 of
Request and a Check in the amount of \$20.00
The official date stamp of the United States Patent & Trademark Office herein is
evidence of the fact that subject instrument for the above-identified case has been
received by the United States Patent & Trademark Office

BOEHRINGER-INGELHEIM VETMEDICA INC. 15 December 2005
Dkt. No. 35241-CIP1-PCT
Appl. No. PCT/US2006/033760 TST
Filed 21 September 2006
PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME ISOLATES
AND METHODS OF USE
Express Mail # EV 760671047 US
Transmittal and Express Mail certificate Ltr No Request
for Addition to Priority Claim Replacement page 4 of
Request and a Check in the amount of \$20.00

HOVEY WILLIAMS LLP ONE SPRINGFIELD, SUITE 400 KANSAS CITY MO 64108 FL 0110 00-0000		COUNTRY CLUB BANK, N.A. MEMPHIS, TENNESSEE KANSAS CITY MO 64108 2006-12-15		28884
DATE 12/14/05	CHECK 28884	AMOUNT *****20.00		
*** TWENTY & 00/100 DOLLARS				
BY J THE P. Commissioner of Patents & Trademarks				
				
#029684# 1 10 100 130 5#				

26

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCTd3	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C12Q 1/70	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/611,824	21/09/2004	US
	11/022,282	23/12/2004	US
	11/230,723	20/09/2005	US
		(72) Inventor(es) MICHAEL ROOF Y OTROS	
		(74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85) Fecha limite inicio fase nacional:	21/04/2007		(87) Publicación internacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT			Fecha: 30/03/2006
Fecha de presentación de la solicitud:	21/09/2005		N° publicación: WO 2006/034319 A2
No. de solicitud PCT/US2005/ 033760			
(54) Título: AISLADOS DE VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTIVO Y RESPIRATORIO PORCINO Y MÉTODOS DE USO			

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la virulencia de un aislado de virus del SRRP de virulencia desconocida, que comprende las etapas de administrar una cantidad de replique en dichos cerdos durante un periodo de aproximadamente 3-15 días, midiendo la tasa de crecimiento del virus y/o la magnitud de la viremia durante dicho periodo y comparando dicha tasa de crecimiento o magnitud de la viremia con la tasa de crecimiento y/o magnitud de un aislado de virus del SRRP de virulencia conocida como un indicador de la virulencia del aislado de virus SRRP de virulencia desconocida.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho periodo es de aproximadamente 3 a 7 días.
3. El método de reivindicación 1, que incluye la etapa de medir la magnitud de la viremia durante dicho periodo, y comparar dicha magnitud con la magnitud de la viremia de dicho aislado de virus del SRRP conocido.
4. El método de la reivindicación 1, en el que dicha cantidad de virus administrada es similar a la cantidad que recibiría un animal por exposición natural.

5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho virus del SRRP se administra por un método seleccionado del grupo que consiste en administración oral, Intranasal, intramuscular, Intra-ganglio linfático, Intradérmica, Intraperitoneal, subcutánea, y sus combinaciones.
6. El método de la reivindicación 1, en el que dicha tasa de crecimiento o magnitud de la viremia se miden en una muestra biológica de dicho cerdo.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicha viremia se mide por el Log10 DICT50/ml, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, ELISA específico para SRRP, ELISA específico para proteínas de SRRP, y sus combinaciones.
8. El método de la reivindicación 1, que además incluye la etapa de observar en dicho cerdo los signos clínicos de infección de SRRP después de administrar dichos aislados de virus del SRRP.
9. El método de la reivindicación 8, en el que dichos signos clínicos incluyen signos respiratorios, de comportamiento, toses y sus combinaciones.

126

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-028053-00000-0000
FOL: 2007-03-21 17:07:25 UBO. 2020 NUECREACIONES
108.11 PATENTEYS
EVE. 8/8 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION FOLIO 126

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 18,384
FECHA : MARZO 5 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55767479	05/03/2007	22,261,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SOM: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO 15149 841 004 3



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

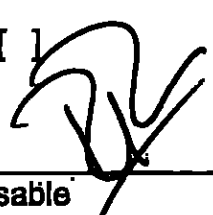
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable 

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Commutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

128

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

REFERENCIA	Radicación No.	7 28053
	Solicitud internacional	pct/us2005/033760
	Fecha inicio fase nacional	21/04/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	5034

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 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.

2. Debe aclarar el número de la prioridad de fecha 20/09/2005 por cuanto difiere de las citadas en la publicación internacional.

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.


ALIX CARMENZA ESPEDEZ DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 04 MAYO 2007
adpall