

OK
B.T.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

07-46274
SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO
PORCINO MUTANTE

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL: A61K39/00

A61K39/12

SOLICITANTE: PFIZER PRODUCTS INC.

C12N15/86

DIRECCIÓN: EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 E.U.A

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 8 de mayo de 2007

P20271000C00

SS

ra 11-06-2007

Publicación



No. 07-046274-00000-0000

Fecha: 2007-05-09 16:32:27

Dep. 2020 NUECREACIONES

Tra. 11 PATENTEIYII

Eva: 379 FASENACIONALII

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 140

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

S LICITANTE
(71)

Nombre: PFIZER PRODUCTS INC

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

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

Lugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

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

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2005/003366

Fecha

Noviembre 2, 2005

Publicación Internacional No. WO 2006/051396

Fecha

Mayo 18, 2006

6

Título (54) VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO PORCINO
MUTANTEClasificación Internacional (51) C12N 15/40; 7/04; A61K 39/00; C07K 14/18; A61K
39/12; C12N 15/86

Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ N ☐	US	Noviembre 11, 2004	60/626.767

9

Comprobante de pago No. 07 - 35.782

Fecha Mayo 8, 2007

0

ANEXOS

☒

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

☐

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

☒

Poderes, si fuere el caso. Ver expediente No. 06-051.744. Adjunto copia simple

☒

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

☐

Declaraciones.

☒

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

☒

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

☒

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

☒

Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

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

☐

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

☐

Arte final 12 x 12.

☐

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

☐

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

☒

Otros. Búsqueda Internacional

1

FIGURA CARACTERÍSTICA:

2

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 75.782.747 Btá T.P. 74.295

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

LISTA DE INVENTORES PCT/IB2005/003366.

1. DONGWAN YOO

111 Moss, Guelph,
Ontario N1G 4V4,
Canadá.
Nacionalidad: Canadiense.

2. CHANGHEE LEE

Unit # - 226,
78 College Avenue West,
Guelph, Ontario N1G 4S7 3,
Canada.
Nacionalidad: Coreana.

3. JAY GREGORY CALVERT

301 Henrietta Street, Kalamazoo,
Michigan 49001,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense.

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-046274-00000-0000

Fecha: 2007-05-09 16:32:27 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 140

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 35,782
: MAYO 8 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBECK	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	52331050	08/05/2007	8,595,000.00

***** C O N C E P T O *****

NT. 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. _____

5

TRADUCCION OFICIAL No. 05-223

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

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

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

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

(Fdo.) Susan Z. Killian


SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. 0138
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCION No 0138 del 11 de febrero de 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

6

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

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

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

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

SERGIO ANDRÉS MUÑOZ IGLESIAS
C. C. N.º 773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
REGISTRO DE LA LEY Nº. 11214 DE FEBRERO 11 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

7

1. País: Estados Unidos de América

2. Fue firmado por: Norman Goodman

3. Que actuó en su calidad de: **Escribano del Condado**

4. Lleva el sello del Condado de Nueva York

Se certificó:

5. En Nueva York, Nueva York

6. El 22 de noviembre de 2005

7. Por parte del Secretario de Estado, (Encargado) del
Estado de Nueva York

8. Bajo el Número NYC-10404952A

9. Aparece Sello del Estado de Nueva York

10. Firmado por: James Bizzarri, Secretario de Estado
Especial Encargado

Es traducción fiel y completa efectuada por:


Sergio Andrés Rueda Iglesias
c.c. 80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRES RUEDA IGLESIAS
 N. E. SO. 1. 1
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 ESPAÑOL - INGLES / INGLÉS - ESPAÑOL
 1. CALIFORNIA NATIONAL UNIVERSITY - 2002
 DEPARTAMENTO DE JUSTICIA Y DEL DELINCHIO

Apostille

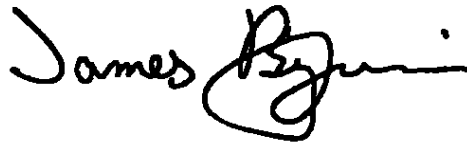
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

8

1. Country: **United States of America**
This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York
6. the 22nd day of November 2005
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10404952A
9. Seal/Stamp
10. Signature



James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

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

Zayde Chahin
Zaava Ravid
Jacqueline Chaparro
Jose Luis Londoño
Camilo Alvarez
Felipe Mendosa
Camilo Rodríguez
Santiago Pardo

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

PFIZER PRODUCTS INC.,

domiciled in

domiciliado en

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

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

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

Signature/Firma:

PFIZER PRODUCTS INC.,

By:

Grover F. Fuller, Jr.

Vice President, Attorney-In- Fact

Date/Fecha:

17 November 2005

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

12

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

Grover F. Fuller, Jr.

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

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

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

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

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

3. That PFIZER PRODUCTS INC, having its principal place of business located in Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

4. Que con sede principal ubicada en

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

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

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

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

NOTARY PUBLIC (Signature):

Susan Z. Killian



SUSAN Z. KILLIAN
Notary Public, State of New York
No. 01K25116521
Qualified in New York County
Commission Expires October 4, 2008

State of New York
County of New York
SWORN to and SUBSCRIBED before me
the 17 day of Nov. 2005
Susan Z. Killian

11

Sébase que Yo, STEPHEN DAVID FINN, de 31 Amersham Hill Drive Hight Wycombe Buckinghamshire Reino Unido un Notario Público debidamente autorizado.

CERTIFICO UNICAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXO AL PRESENTE LLAMADO:

CESION, firmada por Jay Gregory CALVERT

Ha sido presentado ante mi en esta fecha por los Servicios Consulares de Blair en nombre de su cliente PFIZER, y que los mencionados Servicios Consulares de Blair Limitada, han representado ante mi como presentación de dicho cliente ha representado a ellos con base en un documento original con firmas debidamente autenticas.

Firmado y sellado en 31 Amersham Hill Drive según lo dicho anteriormente, el día de hoy 13 de abril de 2007.

[Firmado y sellado]

STEPHEN FINN
Notario Público

Apostilla

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

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. Pais: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. Este documento público ha sido firmado por: Stephen David Finn
3. obrando en su condición de Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

Certificado

5. en Londres
6. el 16 de abril de 2007
7. por: Secretario Principal de Estado de su Majestad para Asuntos Extranjeros
8. No. H355094
9. Sello / Estampilla
[Sellado]
10. Firma: N. Donkor
[Firmado]

13
13

PC32633A

CO-1

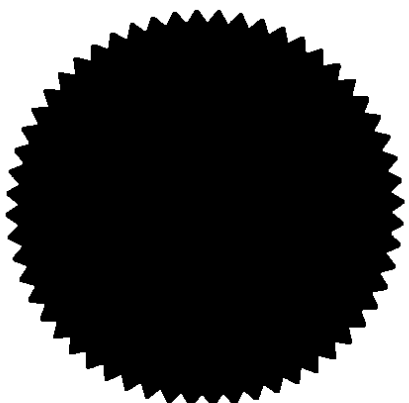
CESIÓN

A cambio de una contraprestación de valor, la cual me (nos) pagó **PFIZER PR DUCTS INC.**, una sociedad de responsabilidad limitada constituida y existente bajo las leyes del Estado de Connecticut, Estados Unidos de América, cuya dirección de correos es Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de América, por el presente le vendo y le cedo (le vendemos y le cedemos) a la citada **PFIZER PRODUCTS INC.**, la totalidad de mis (nuestros) derechos, el título y el interés que tengo (tenemos) en mi (nuestro) invento de una cierta mejora, nueva y útil, del **REPRODUCTOR PORCINO MUTANTE Y EL VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO**, en la medida en que esta cesión concierna a la República de Colombia, tal y como se describe plenamente el mismo en las especificaciones, y yo (nosotros) autorizo (autorizamos) y le solicito (solicitamos) por el presente a la Oficina de Patentes de Colombia que le expida dicha patente a la citada **PFIZER PRODUCTS INC.**, de conformidad con la presente cesión.

En fe de lo cual firmamos el presente el día de hoy.

Kalamazoo, MI, 9 de noviembre de 2005 (Fdo) Jay Gregory CALVERT

Lugar, fecha y firma – Jay Gregory CALVERT



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

CERTIFY only that the document annexed hereto, namely:

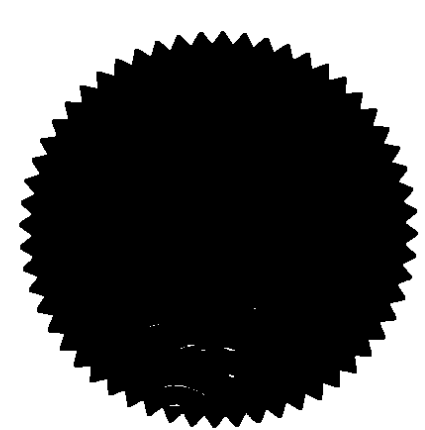
ASSIGNMENT signed by Jay Gregory CALVERT.

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

SIGNED and sealed at 31 Amersham Hill Drive aforesaid on 13th April 2007.



Stephen Finn
Notary Public



APOSTILLE

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

15

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

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

This public document / Le présent acte public

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

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

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

5. at London/à Londres
- Certified/Attesté
6. the/le 16 April 2007
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **H355094**

9. Stamp:
timbre:
10. Signature: **N. Donker**



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

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

15
16

ASSIGNMENT

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

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

Place, date and signature - Dongwan YOO

Place, date and signature - Changhee LEE

Kalamazoo, MI 11/9/05
Place, date and signature - Jay Gregory CALVERT

Jay R Calvert

Sébase que Yo, STEPHEN DAVID FINN, de 31 Amersham Hill Drive Hight Wycombe Buckinghamshire Reino Unido un Notario Público debidamente autorizado.

CERTIFICO UNICAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXO AL PRESENTE LLAMADO:

CESION, firmada por Dongwan YOO y Changhee LEE

Ha sido presentado ante mi en esta fecha por los Servicios Consulares de Blair en nombre de su cliente PFIZER, y que los mencionados Servicios Consulares de Blair Limitada, han representado ante mi como presentación de dicho cliente ha representado a ellos con base en un documento original con firmas debidamente autenticas.

Firmado y sellado en 31 Amersham Hill Drive según lo dicho anteriormente, el día de hoy 13 de abril de 2007.

[Firmado y sellado]

STEPHEN FINN
Notario Público

17
10

Apostilla

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

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. Este documento público ha sido firmado por: Stephen David Finn
3. obrando en su condición de Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

Certificado

5. en Londres
6. el 16 de abril de 2007
7. por: Secretario Principal de Estado de su Majestad para Asuntos Extranjeros
8. No. H355093
9. Sello / Estampilla
[Sellado]
10. Firma: N. Donkor
[Firmado]

CESIÓN

A cambio de una contraprestación de valor, la cual me (nos) pagó **PFIZER PRODUCTS INC.**, una sociedad de responsabilidad limitada constituida y existente bajo las leyes del Estado de Connecticut, Estados Unidos de América, cuya dirección de correos es Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de América, por el presente le vendo y le cedo (le vendemos y le cedemos) a la citada **PFIZER PRODUCTS INC.**, la totalidad de mis (nuestros) derechos, el título y el interés que tengo (tenemos) en mi (nuestro) invento de una cierta mejora, nueva y útil, del **REPRODUCTOR PORCINO MUTANTE Y EL VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO**, en la medida en que esta cesión concierna a la República de Colombia, tal y como se describe plenamente el mismo en las especificaciones, y yo (nosotros) autorizo (autorizamos) y le solicito (solicitamos) por el presente a la Oficina de Patentes de Colombia que le expida dicha patente a la citada **PFIZER PRODUCTS INC.**, de conformidad con la presente cesión.

En fe de lo cual firmamos el presente el día de hoy.

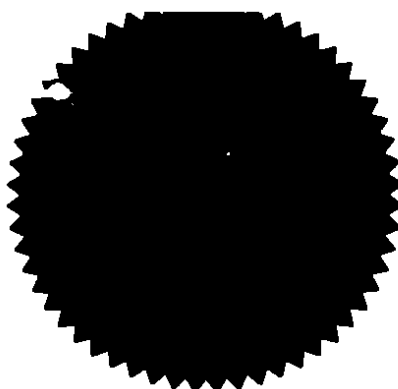
Guelph, Ontario, 18 de noviembre de 2005 (Fdo) Dongwan YOO

Lugar, fecha y firma – Dongwan YOO

Guelph, Canada, 18 de noviembre de 2005 (Fdo) Changhee LEE

Lugar, fecha y firma –Changhee LEE

2019



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

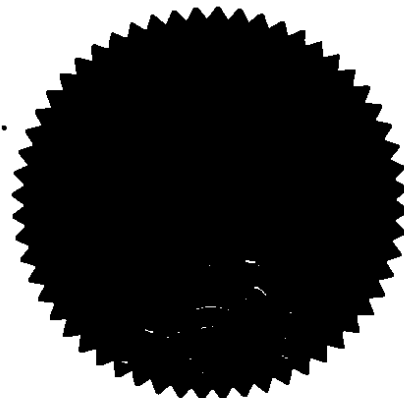
CERTIFY only that the document annexed hereto, namely:

ASSIGNMENT signed by Dongwan YOO and Changhee LEE.

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

SIGNED and sealed at 31 Amersham Hill Drive aforesaid on 13th April 2007.

Stephen Finn
Notary Public



6553.

21

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

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

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

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by Stephen David Flinn
a été signé par
3. Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

5. at London/à Londres

6. the/le 16 April 2007

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

8. Number/sous No **H355093**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: N. Donkor



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

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

20
22

ASSIGNMENT

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

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

Guelph, Ontario Nov 18, 2005 Dongwan Yoo
Place, date and signature - Dongwan YOO

Guelph, Canada Nov. 18/2005 Changhee LEE
Place, date and signature - Changhee LEE

Place, date and signature - Jay Gregory CALVERT

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



PCT

(43) International Publication Date
18 May 2006 (18.05.2006)

(10) International Publication Number
WO 2006/051396 A1

(51) International Patent Classification:

C12N 15/40 (2006.01) C07K 1/418 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2005/003366

(22) International Filing Date:

2 November 2005 (02.11.2005)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/626,767 11 November 2004 (11.11.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PFIZER
PRODUCTS INC. [US/US]; Eastern Point Road, Groton,
CT 06340 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): YOO, Dongwon
[CA/CA]; 111 Moss, Guelph, Ontario N1G 4V4 (CA).
LEE, Changhee [KR/CA]; Unit # 226, 78 College Av-
enue West, Guelph, Ontario N1G 4S7 3 (CA). CALVERT,

Jay, Gregory [US/US]; Pfizer Global Research and De-
velopment, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001
(US).

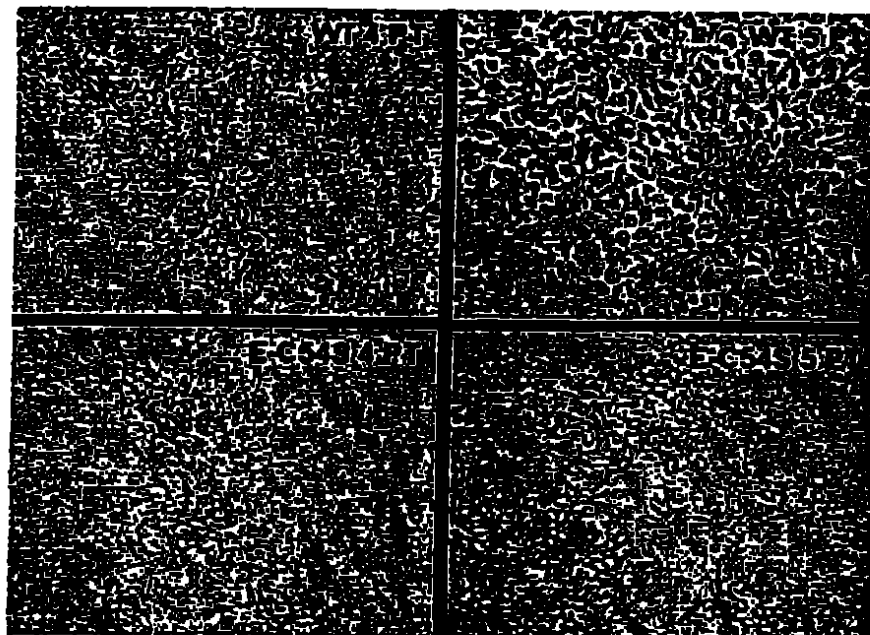
(74) Agents: FULLER, Grover, F., Jr., et al.; Pfizer Inc., 201
Tabor Road, Morris Plains, NJ 07950 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GR, GU, HT, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, 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.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, 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).

[Continued on next page]

(54) Title: MUTANT PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS



(57) Abstract: The present invention provides a genetically modified PRRS virus which has been modified such that the conserved cysteine in the E protein has been deleted or changed to a non-cysteine residue and polynucleotides that encode it. Vaccines comprising the genetically modified virus and polynucleotides are also provided.



22
24

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

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

28
29

MUTANT PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention provides a genetically modified PRRS virus and polynucleotides that encode it. Vaccines comprising the genetically modified virus and polynucleotides are also provided.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is characterized by abortions, stillbirths, and other reproductive problems in sows and gilts, as well as respiratory disease in young pigs. The causative agent is the PRRS virus, a member of the family *Arteriviridae* and the order *Nidovirales*. Two distinct genotypes of the virus emerged nearly simultaneously in North America and in Europe in the late 1980's. PRRS virus is now endemic in nearly all swine producing countries, and is considered one of the most economically important diseases affecting
15 the global pork industry.

Currently, commercial vaccines against PRRS include modified live and killed (inactivated) vaccines. Killed vaccines have been criticized for failing to induce robust immunity against heterologous strains of PRRS virus. Modified live vaccines are attenuated by serial passage in cell culture until virulence is lost. Modified live vaccines elicit broader protection
20 than killed vaccines, but can suffer from a number of safety concerns including residual virulence, spread to non-vaccinated pigs, and genetic reversion to virulence. Because of antigenic changes that take place during the attenuation process, such vaccines can also lose some ability to protect against virulent field strains of PRRS virus. There is a pressing need therefore for new and improved modified live vaccines to protect against PRRS.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

25 Figure 1. Cytopathic Effect (CPE) in MARC-145 cells at 4 days (left) and 5 days (right) post-transfection using parental cDNA clone pCMV-S-P129 (top) or mutant cDNA clone pCMV-S-P129-E-C54S (bottom).

Figure 2. Plaque morphology of parental P129 virus (top) and mutant P129-E-C54S virus
30 (bottom). Monolayers of MARC-145 cells were infected, covered with an agarose overlay, incubated until plaques were apparent, and stained with neutral red to visualize the plaques. The mutant virus plaques are smaller, with more complete CPE in the centers.

Figure 3. Alignment of E protein from North American and European isolates of PRRS virus.

29
26**BRIEF DESCRIPTION OF THE SEQUENCES**

- SEQ ID NO: 1 Shuttle Plasmid PTB-Shuttle-PRRSV-3997 Primer Shuttle Forward
- SEQ ID NO: 2 Shuttle Plasmid PTB-Shuttle-PRRSV-3997 Primer Shuttle Reverse
- SEQ ID NO: 3 Mutagenic Primers2b-C54s-Forward
- 5 SEQ ID NO: 4 Mutagenic Primers2b-C54s-Forward
- SEQ ID NO: 5 E Protein of PRRSV P129
- SEQ ID NO: 6 cDNA for E Protein PRRSV 129
- SEQ ID NO: 7 Mutated ORF2b
- SEQ ID NO: 8 Peptide for Mutated ORF2b
- 10 SEQ ID NO: 9, 11, 15, 19, 23, 27 Various C54s Mutations – Nucleotide sequences
- SEQ ID NO: 10, 12, 16, 20, 24, 28 Various C54s Mutations - Peptides
- SEQ ID NO: 13, 14, 17, 18, 21, 22, 25, 26, 29, 30 Forward (F) and Reverse (R) Mutagenic
Primers for C54s Mutations

SUMMARY OF THE INVENTION

15 The invention provides a genetically modified PRRS virus which has been modified such that the conserved cysteine in the E protein has been deleted or changed to a non-cysteine residue.

The invention further provides a genetically modified PRRS virus which has been modified such that the conserved cysteine in the E protein has been deleted or changed to a non-cysteine residue with the proviso that the non-cysteine residue is not tyrosine.

20 The subject invention further provides an infectious RNA molecule encoding the genetically modified virus recited above

The subject invention further provides an isolated polynucleotide molecule comprising a DNA sequence encoding an infectious RNA molecule recited above.

25 The invention also provides a biologically pure culture (i.e substantially free of other viruses) of the viruses recited.

The subject invention further provides a viral vector comprising a DNA sequence encoding an infectious RNA molecule encoding a genetically modified PRRS virus as recited above.

30 The subject invention further provides a transfected host cell comprising any of the foregoing viruses, infectious RNA molecules, isolated polynucleotides or viral vectors recited above.

The subject invention further provides a vaccine for protecting a porcine animal from infection by a PRRS virus, which vaccine comprises a genetically modified PRRS virus as recited above; an infectious RNA molecule as recited above encoding the genetically modified PRRS

25
27

virus; an isolated polynucleotide molecule recited above, (optionally in the form of a plasmid), encoding the genetically modified PRRS virus; or the above-recited viral vector encoding the genetically modified PRRS virus; in an amount effective to produce immunoprotection against infection by a PRRS virus; and a carrier acceptable for veterinary use.

5 The subject invention further provides a method for protecting a porcine animal from infection by a PRRS virus, which comprises vaccinating the animal with an amount of the above-recited vaccine that is effective to produce immunoprotection against infection by a PRRS virus.

The invention provides a method for making a genetically modified PRRS virus, which method comprises mutating the DNA sequence encoding an infectious RNA molecule which
10 encodes the PRRS virus as described above, and expressing the genetically modified PRRS virus using a suitable expression system.

A PRRS virus, either wild-type or genetically modified, can be expressed from an isolated polynucleotide molecule using suitable expression systems generally known in the art, examples of which are described in this application. For example, the isolated polynucleotide molecule can
15 be in the form of a plasmid capable of expressing the encoded virus in a suitable host cell in vitro, as is described in further detail below.

Other features of the invention will be evident upon review.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

We disclose herein a method of attenuating a virulent PRRS virus by mutating or deleting
20 a specific cysteine residue found in the E (or 2b) protein of the virus, an immunogenic composition comprising said attenuated virus, and a method of protecting swine from PRRS by vaccination with said immunogenic compositions. PRRS viruses that have been attenuated by this method should retain the antigenic characteristics of the virulent field strain and therefore afford more potent protection than vaccines based on cell culture attenuated viruses.

25 Arteriviruses encode a small hydrophobic structural protein provisionally named the envelope (E) protein. (Snijder, E. J., et al. (1999). Identification of a novel structural protein of arteriviruses. Journal of Virology 73(8), 6335-6345).

The function of the E protein is not known, but it is conserved in all arteriviruses. Knockout mutations in equine arteritis virus have shown that the E protein is essential for virus replication
30 in cell culture. Unlike the other structural proteins of the PRRS virus, which are each encoded by a corresponding unique subgenomic RNA, the E protein and the GP2 protein share a single subgenomic RNA. ORF2b (which encodes E) is completely contained within the larger ORF2a (which encodes GP2) and utilizes a different reading frame. Although the ATG initiation codon of ORF2b is located downstream of ORF2a initiation codon, it is in a more favorable context for

28
29

translation initiation and is probably the primary product produced from this subgenomic RNA. (Wu, W. H., et al. (2001). A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. Virology 287(1), 183-191)

North American genotype PRRS viruses generally contain two cysteine residues within the amino acid sequence of their E proteins, at positions 49 and 54. Using an infectious cDNA clone of North American PRRS isolate P129, C49 and C54 were individually mutated to serine. The resulting C49S mutation was viable. Similarly, the C54S mutation was also viable and produced high yields of progeny virus from the infectious clone. The P129-E-C49S and P129-E-C54S virus was readily passaged and titrated on MARC cells. However, the P129-E-C54S virus displayed altered plaque morphology (small, clear plaques) and accelerated cytopathic effect (CPE). This mutation should lead to attenuation in the pig.

European genotype PRRS viruses contain a single cysteine residue at position 51, which corresponds precisely with C54 in North American PRRS virus when the E protein sequences are aligned. We expect that elimination of C51 in European PRRSV E protein (by deletion or substitution) will have an altered phenotype similar to P129-E-C54S in cell culture and will be attenuated in pigs. (As noted below we designate the cysteine residue present in both North American PRRS and European PRRS E proteins as a "conserved cysteine") Viral mutations of this type are valuable, either alone or in combination with other attenuating mutations, for designing novel PRRS vaccines.

DEFINITIONS

CPE is cytopathic effect.

The term PRRSV "E protein" or "ORF2b protein" as used herein is defined as a polypeptide that is encoded by ORF2b of both the European and American isolates of PRRS virus. Unlike the other structural proteins of the PRRS virus, which are each encoded by a corresponding unique subgenomic RNA, the E protein and the GP2 protein share a single subgenomic RNA. ORF2b (which encodes E) is completely contained within the larger ORF2a (which encodes GP2) and utilizes a different reading frame. Although the ATG initiation codon of ORF2b is located downstream of ORF2a initiation codon, it is in a more favorable context for translation initiation and is probably the primary product produced from this subgenomic RNA (Wu et al., 2001).

The term "European PRRS virus" refers to any strain of PRRS virus having the genetic characteristics associated with the PRRS virus that was first isolated in Europe around 1991 (see, e.g., Wensvoort, G., et al. , 1991, Vet. Q. 13:121-130). "European PRRS virus" is also sometimes referred to in the art as "Lelystad virus".

29
29

The term "genetically modified", as used herein and unless otherwise indicated, means genetically mutated by human intervention.

The term "host cell capable of supporting PRRS virus replication" means a cell line that is capable of generating infectious PRRS when either infected or transfected with a virus or polynucleotide of the invention. Such cells include porcine alveolar macrophage cells and derivatives of porcine alveolar macrophage cells, MA-104 cells and derivatives of MA-104 cells, MARC-145 cells and derivatives of MARC-145 cells. Especially preferred for the demonstrating the small plaque phenotype of the invention are MARC-145 cells. The term "host cell capable of supporting PRRS virus replication" may also include cells within a live pig.

The term "immune response" for purposes of this invention means the production of antibodies and/or cells (such as T lymphocytes) that are directed against, or assist in the decomposition or inhibition of, a particular antigenic epitope or particular antigenic epitopes. The phrases "an effective immunoprotective response", "immunoprotection", and like terms, for purposes of the present invention, mean an immune response that is directed against one or more antigenic epitopes of a pathogen so as to protect against infection by the pathogen in a vaccinated animal. For purposes of the present invention, protection against infection by a pathogen includes not only the absolute prevention of infection, but also any detectable reduction in the degree or rate of infection by a pathogen, or any detectable reduction in the severity of the disease or any symptom or condition resulting from infection by the pathogen in the vaccinated animal as compared to an unvaccinated infected animal. An effective immunoprotective response can be induced in animals that have not previously been infected with the pathogen and/or are not infected with the pathogen at the time of vaccination. An effective immunoprotective response can also be induced in an animal already infected with the pathogen at the time of vaccination.

The term "mutated" means the replacement of an amino acid for another or the replacement of the coding nucleotide by another (e.g. C for a T), i.e., a so-called "substitution", preferably in a way that the encoded amino acid is changed, or any other mutation such as "deletion" or "insertion". The mutation is always carried out in the coding nucleotide sequence.

The term "North American PRRS virus" means any PRRS virus having genetic characteristics associated with a North American PRRS virus isolate, such as, but not limited to the PRRS virus that was first isolated in the United States around the early 1990's (see, e.g., Collins, J. E., et al., 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126); North American PRRS virus isolate MN-1b (Kwang, J. et al., 1994, J. Vet. Diagn. Invest. 6:293-296); the Quebec IAF-exp91 strain of PRRS (Mardassi, H. et al., 1995, Arch. Virol. 140:1405-1418); and North American PRRS virus isolate VR 2385 (Meng, X.-J et al., 1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801). Genetic characteristics

78
30

refer to genomic nucleotide sequence similarity and amino acid sequence similarity shared by North American PRRS virus strains.

The term "open reading frame", or "ORF", as used herein, means the minimal nucleotide sequence required to encode a particular PRRS virus protein without an intervening stop codon.

The terms "porcine" and "swine" are used interchangeably herein and refer to any animal that is a member of the family Suidae such as, for example, a pig. The term "PRRS virus", or "PRRSV", as used herein, unless otherwise indicated, means any strain of either the North American or European PRRS viruses.

As used herein, the term "PRRS" encompasses disease symptoms in swine caused by a PRRS virus infection. Examples of such symptoms include, but are not limited to, abortion in pregnant females, and slow growth, respiratory difficulties, loss of appetite, and mortality in young pigs. As used herein, a PRRS virus that is "unable to produce PRRS" refers to a virus that can infect a pig, but which, either does not produce any disease symptoms normally associated with a PRRS infection in the pig, or produces such symptoms, but to a lesser degree, or produces a fewer number of such symptoms, or both, as compared to a wild type virulent infection.

The term "transfected host cell" means practically any host cell such as is described in US Patent 5,600,662, incorporated herein by reference, when transfected with PRRS virus RNA can produce a first round of PRRS virions. If further productive infection is desired a "host cell capable of supporting PRRS virus replication" as defined below would be used.

Polynucleotide molecules can be genetically mutated using recombinant techniques known to those of ordinary skill in the art, including by site-directed mutagenesis, or by random mutagenesis such as by exposure to chemical mutagens or to radiation, as known in the art. Said mutations may be carried out by standard methods known in the art, e. g. site directed mutagenesis (see e.g. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2(nd) ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) of an infectious copy as described (e.g. Meulenberg et al., Adv. Exp. Med. Biol, 1998, 440:199-206).

Accordingly, the subject invention further provides a method for making a genetically modified North American PRRS virus, which method comprises mutating the DNA sequence encoding an infectious RNA molecule which encodes the PRRS virus as described above, and expressing the genetically modified PRRS virus using a suitable expression system. A genetically modified PRRS virus can be expressed from an isolated polynucleotide molecule using suitable expression systems generally known in the art, examples of which are described in this application. For example, the isolated polynucleotide molecule can be in the form of a plasmid

25
31

capable of expressing the encoded virus in a suitable host cell in vitro, as is described in further detail below.

Examples of specific isotypes of E protein which are currently known are the 73 amino acid polypeptide of American PRRS as predicted by the sequence reported in Genbank
5 Accession number U87392 (also known as VR2332) at genome positions 12,078-12,299, and as predicted by the sequence in Genbank Accession number AF494042 (also known as P129) and reported as protein AAM18560.1, and the 70 residue European PRRS E protein as predicted by Genbank Accession number M96262 (also known as the Lelystad isolate) at genome positions 11,801-12,013.

10 The North American PRRSV E protein sequences are highly conserved and the reported sequences have about 93% identity with each other. The North American and European PRRSV E proteins are about 83% identical and share (among many other residues) a conserved cysteine at residue 54 of the VR2332 and P129 E protein isolates and residue 51 of the Lelystad isolate E protein. Figure 3 allows visualization of the cysteine which we have designated as the
15 "conserved cysteine", i.e. the cysteine conserved between European and American PRRS isolates. The numbering of amino acids referenced above is according to the database entries mentioned. In all other PRRS isolates, which might be numbered differently, identification of the proper cysteine is readily achieved by identifying preserved characteristic amino acids in a PRRS strain of interest and aligning it with a reference strain. It is an object of the present invention to
20 modify a PRRS virus or its encoding nucleic acids such that the conservative cysteine is eliminated either by substitution, deletion or insertion such that it results in a small plaque phenotype.

Deletions or substitutions that eliminate the conserved cysteine are introduced by modification of polynucleotides encoding viruses of the invention. In a preferred embodiment a
25 deletion or insertion comprises 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 amino acids that result in the elimination of the conserved cysteine and in which said deletion or substitution results in small plaque phenotype in the resultant virus. A preferred embodiment would be a deletion or insertion of 5 or less amino acids.

Amino acids can be classified according to physical properties and contribution to
30 secondary and tertiary protein structure. A conservative substitution is recognized in the art as a substitution of one amino acid for another amino acid that has similar properties. Exemplary conservative substitutions are set out in Table A (from WO 97/09433, page 10, published March 13, 1997 (PCT/GB96/02197, filed 9/6/96), immediately below.

28
32

TABLE A - CONSERVATIVE SUBSTITUTIONS I
SIDE CHAIN

	CHARACTERISTIC	AMINO ACID
	Aliphatic	
5	Non-polar	G A P I L V
	Polar - uncharged	C S T M N Q
10	Polar - charged	D E K R
	Aromatic	H F W Y
	Other	N Q D E

Alternatively, conservative amino acids can be grouped as described in Lehninger, [Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY:NY (1975), pp.71-77], as set out in Table B, immediately below.

TABLE B - CONSERVATIVE SUBSTITUTIONS II
SIDE CHAIN

	CHARACTERISTIC	AMINO ACID
20	Non-polar (hydrophobic)	
	A. Aliphatic:	A L I V P
	B. Aromatic:	F W
	C. Sulfur-containing:	M
	D. Borderline:	G
25	Uncharged-polar	
	A. Hydroxyl:	S T Y
	B. Amides:	N Q
	C. Sulfhydryl:	C
	D. Borderline:	G
30	Positively Charged (Basic):	K R H
	Negatively Charged (Acidic):	D E

As still another alternative, exemplary conservative substitutions are set out in Table C, immediately below.

TABLE C - CONSERVATIVE SUBSTITUTIONS III

	Original Residue	Exemplary Substitution
	Ala (A)	Val, Leu, Ile
	Arg (R)	Lys, Gln, Asn
5	Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
	Asp (D)	Glu
	Cys (C)	Ser
	Gln (Q)	Asn
	Glu (E)	Asp
10	His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
	Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
	Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
	Lys (K)	Arg, Gln, Asn
	Met (M)	Leu, Phe, Ile
15	Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
	Pro (P)	Gly
	Ser (S)	Thr
	Thr (T)	Ser
	Trp (W)	Tyr
20	Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
	Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

PREPARATION OF GENETICALLY MODIFIED PRRS VIRUS

Recombinant DNA technology comprises extremely varied and powerful molecular biology techniques aimed at modifying nucleic acids at the DNA level and makes it possible to analyze and modify genomes at the molecular level. In this respect viruses such as the PRRS virus, because of the small size of its genome, is particularly amenable to such manipulations. However, recombinant DNA technology is not immediately applicable to nonretroviral RNA viruses because these viruses do not encompass a DNA intermediate step in their replication. For such viruses infectious cDNA clones have to be developed before recombinant DNA technology can be applied to their genome to generate modified virus. Infectious clones can be derived through the construction of full-length (genomic length) cDNA (here used in the broad sense of a DNA copy of RNA and not only in the strict sense of a DNA copy of mRNA) of the virus under study after which an infectious

38
39

transcript is synthesized in vivo in cells transfected with the full-length cDNA. Infectious transcripts can also be obtained by in vitro transcription from full-length or ligated partial-length cDNA fragments that comprise the full viral genome. In all cases, the transcribed RNA carries all the modifications that have been introduced to the cDNA and can be used to further passage the thus modified virus.

The preparation of an infectious clone of a European PRRS virus isolate, Lelystad virus, is described in US Patent No. 6,268,199 Meulenber et al., July 31, 2001, which is hereby fully incorporated by reference. The preparation of an infectious cDNA clone of a North American PRRS virus isolate designated P129 is described in US Patent 6,500,662 Calvert et al., December 31, 2002, which is hereby incorporated fully by reference. The sequence of P129 cDNA is disclosed in Genbank Accession Number AF494042 and in US Patent 6,500,662 Calvert et al., December 31, 2002. Our work below makes use of such an infectious clone which in the context of a plasmid is expressed by the CMV immediate early promoter and has been designated pCMV-S-P129 and is also disclosed within US Patent 6,500,662, Calvert et al., December 31, 2002. As described in US Patent 6,500,662 Calvert et al., December 31, 2002, other plasmids and promoters are also suitable.

It is apparent that given the complete sequence of any open reading frame of interest and the location of an amino acid residue of interest one of ordinary skill need merely consult a codon table to design changes at the particular position desired.

TABLE D

Coding Sequence from E protein of P129 Isolate													
M	G	S	I	Q	S	L	F	D	K	I	G	Q	L
ATG	GGG	TCT	ATA	CAA	AGC	CTC	TTC	GAC	AAA	ATT	GGC	CAG	CTT
F	V	D	A	F	T	E	F	L	V	S	I	V	D
TTT	GTG	GAT	GCT	TTC	ACG	GAA	TTT	TTG	GTG	TCC	ATT	GTT	GAT
I	I	I	F	L	A	I	L	F	G	F	T	I	A
ATC	ATC	ATA	TTT	TTG	GCC	ATT	TTG	TTT	GGC	TTC	ACC	ATC	GCC
G	W	L	V	V	F	C	I	R	L	V	C	S	A
GGT	TGG	CTG	GTG	GTC	TTT	TGC	ATC	AGA	TTG	GTT	TGC	TCC	GCG
V	F	R	A	R	P	A	I	H	P	E	Q	L	Q
GTA	TTC	CGT	GCG	CGC	CCT	GCC	ATT	CAC	CCT	GAG	CAA	TTA	CAG
K	I	L	*										
AAG	ATC	CTA	TGA										

28
35

A table of amino acids and their representative abbreviations, symbols and codons is set forth below in the following Table E.

TABLE E ..

Amino acid	Abbrev.	Symbol	Codon(s)					
Alanine	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cysteine	Cys	C	UGC	UGU				
Aspartic acid	Asp	D	GAC	GAU				
Glutamic acid	Glu	E	GAA	GAG				
Phenylalanine	Phe	F	UUC	UUU				
Glycine	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidine	His	H	CAC	CAU				
Isoleucine	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Lysine	Lys	K	AAA	AAG				
Leucine	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Methionine	Met	M	AUG					
Asparagine	Asn	N	AAC	AAU				
Proline	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamine	Gln	Q	CAA	CAG				
Arginine	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serine	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Threonine	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valine	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Tryptophan	Trp	W	UGG					
Tyrosine	Tyr	Y	UAC	UAU				

5 As is well known in the art, codons constitute triplet sequences of nucleotides in mRNA and their corresponding cDNA molecules. Codons are characterized by the base uracil (U) when present in a mRNA molecule but are characterized by base thymidine (T) when present in DNA. A simple change in a codon for the same amino acid residue within a polynucleotide will not change the sequence or structure of the encoded polypeptide. It is apparent that when a phrase

10 stating that a particular 3 nucleotide sequence "encode(s)" any particular amino acid, the ordinarily skilled artisan would recognize that the table above provides a means of identifying the particular nucleotides at issue. By way of example, if a particular three-nucleotide sequence encodes cysteine the table above discloses that the two possible triplet sequences are UGC (TGC if in DNA) and UGU (TGT if in DNA). Serine is encoded by AGC, AGU (AGT in DNA), UCA

15 (TCA in DNA) and UCC (TCC in DNA), UCG (TCG in DNA) and UCU (TCT in DNA). To

2A
36

change a cysteine to serine residue in an encoded protein one might replace a TGC or TGT triplet with any of AGC, AGT, TCA, TCC, TCG or TCT in the encoding nucleic acid.

The construction of just such a mutant protein E polynucleotide sequence is demonstrated in the following by way of illustrative example.

EXAMPLE 1: CONSTRUCTION OF SHUTTLE PLASMID PTB-SHUTTLE-PRRSV-3997

A shuttle plasmid was constructed in order to facilitate the introduction of specific modifications to a full-length PRRS virus genomic cDNA clone. A 3,997 bp fragment, representing the extreme 3' end of the viral genome (nucleotide positions 11,504 to 15,416, including a 21 residue polyadenosine tail) and 84 bp of downstream vector sequences, was PCR-amplified. The PCR reaction included 5 ng of pCMV-S-P129 plasmid DNA (US 6,500,662 B1), 300 ng of forward primer P-shuttle-Fwd SEQ ID NO: 1 (5'-ACTCAGTCTAAGTGCTGGAAAGTTATG-3': positions 11,504 to 11,530), 300 ng of reverse primer P-shuttle-Rev primers SEQ ID NO: 2 (5'-ATCTTATCATGTCTGGATCCCCGCGGC-3': positions 15,500 to 15,475), 1 mM each of dNTPs, 1× PCR buffer [10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100], and 2.5 U of *Pfu* DNA polymerase (Stratagene) using the GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer). The reaction was heated up for 5 min at 95°C and subjected to 35 cycles of amplification under the following conditions; denaturation at 95°C for 30 sec, primer annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 3 min. The PCR product was cloned into the pTrueBlue vector using the TrueBlue MicroCartridge™ PCR Cloning Kit XL (Genomics One; Buffalo, New York) to create pTB-shuttle-PRRSV-3997.

EXAMPLE 2. - SUBSTITUTION OF CYSTEINE RESIDUE 54 IN PROTEIN E (OR 2B) TO GENERATE P129-E-C54S VIRUS

The E protein of PRRSV P129, which is encoded by ORF 2b, contains two cysteine residues at amino acid positions 49 and 54, see SEQ ID NO: 5 MGSIQSLFDKIGQLFVDAFT EFLVSIVDIIIIFLAILFGFTIAGWL VVFQIRLVCSAVFRARPAIHPEQLQKIL. The cDNA for SEQ ID NO: 5 is SEQ ID NO: 6 ATGGGGTCTATACAAAGCCTCTTCGACAAAATTGGCC AGCTTTTTGTGGATGCTTTCACGGAATTTTGGTGTCCATTGTTGATATCATCATATTT TTGGCCATTTTGTGTTGGCTTCACCATCGCCGGTTGGCTGGTGGTCTTTTGCATCAGAT TGGTTTGCTCCGCGGTATTCCGTGCGCGCCCTGCCATTACCCCTGAGCAATTACAGA AGATCCTATGA

The cysteine residue at position 54 (nucleotide positions 12,221-12,223 in the P129 genome) was replaced with serine using PCR-based site-directed mutagenesis. Shuttle plasmid pTB-shuttle-PRRSV-3997 was used as template, with mutagenic primers 2b-C54S-Fwd SEQ ID NO: 3 (5'-

35
37

GCATCAGATTGGTTAGCTCCGCGGTATTCCG -3': nucleotide positions 12,207 to 12,238) and 2b-C54S-Rev SEQ ID NO: 4 (5'- CGGAATACCGCGGAGCTAACCAATCTGATGC -3': nucleotide positions 12,207 to 12,238). The mutated codon is underlined. PCR amplifications were carried out using 5 ng of pTB-shuttle-PRRSV-3997 plasmid DNA, 300 ng each of the forward and reverse primers; 1 mM concentrations each of dCTP, dGTP, dATP, and dTTP, 1x PCR buffer [10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100]; and 2.5 U of *Pfu* DNA polymerase (Stratagene). The samples were subjected to 16 cycles of amplification under the following conditions: denaturation at 94°C for 30 s, primer annealing at 55°C for 1 min, and primer extension at 68°C for 12 min 30 sec. Following PCR cycling, the PCR-product was digested with 10 U of *DpnI* to remove the methylated plasmid DNA template. *E. coli* XL1-Blue cells were transformed by heat shock with 4 µl of the PCR-*DpnI* digested reaction containing the mutated plasmids and plated on an LB agar plate containing ampicillin. Colonies were randomly picked and cultivated overnight. Plasmid DNA was prepared using a QIAprep spin miniprep kit (Qiagen). The presence of desired mutations from cysteine to serine (C54S) was verified by nucleotide sequencing and the resulting plasmid was named pTB-shuttle-E-C54S. The sequence of the mutated ORF2b is given in SEQ ID NO: 7 ATGGGGTCT ATACAAAGCCTCTTCGACAAAATTGGCCAGCTTTTTGTGGATGCTTTCACGGAATTTT TGGTGTCCATTGTTGATATCATCATATTTTGGCCATTTTGTGTTGGCTTCACCATCGCC GGTGCTGGTGGTCTTTTGCATCAGATTGGTTAGCTCCGCGGTATTCCGTGCGCGCC CTGCCATTACCCCTGAGCAATTACAGAAGATCCTATGA, and the encoded peptide is given in SEQ ID NO: 8 MGSIQSLFDKIGQLFVDAFTEFLVSIVDIII FLAILFGFTIAGWLVVF CIRLVSSAVFRARPAIHPEQLQKIL.

Shuttle plasmid pTB-shuttle-E-C54S and the wild type full-length genomic clone pCMV-S-P129 both contain unique *Eco47 III* and *BsrG I* sites (positions 285 and 1,192, and positions 11,785 and 12,692, respectively). Each plasmid was digested with *Eco47 III* and *BsrG I*. The 908 bp *Eco47 III* -*BsrG I* fragment was gel-purified from pTB-shuttle-E-C54S, and the 17,984 bp *Eco47 III* -*BsrG I* fragment was gel-purified from pCMV-S-P129. The two fragments were ligated using T4 DNA ligase (Invitrogen) to construct a C54S-modified full-length genomic cDNA clone. *E. coli* strain DH5-α was transformed with 10 µl of the ligation reaction. Bacterial colonies were selected from LB plates containing ampicillin and plasmid DNAs were prepared. Based on *Xma I* digestion patterns, full-length clones were selected. The selected clones were sequenced to confirm the presence of C54S modification in the full-length genomic cDNA clone. The resulting plasmid was designated pCMV-S-P129-E-C54S.

25
30

MARC-145 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 8% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (50 µg/ml) at 37°C with 5% CO₂. Cells were seeded in 35 mm-diameter dishes and grown to 70% confluency. The cells were transfected for 24 h with 2 µg of pCMV-S-P129-E-C54S or parental pCMV-S-P129 plasmid DNA using Lipofectin (Invitrogen). The transfected cells were incubated at 37°C in DMEM supplemented with 8% FBS for 5 days. PRRSV-specific cytopathic effect (CPE) was observed from 3 days post-transfection and further spread to neighboring cells was seen by 5 days post-transfection. The specificity of CPE was confirmed by immunofluorescence cell staining using a rabbit antiserum for nonstructural proteins nsp2 and nsp3, and the N-specific MAb SDOW17. The culture supernatants from transfected cells were harvested at 5 days post-transfection and designated 'P129-E-C54S passage 1' (P1). The passage-1 virus was used to inoculate fresh MARC-145 cells and the 5-day harvest was designated 'passage-2' (P2). The 'passage-3' virus was prepared in the same way as P2. Each viral passage was stored in 1 ml aliquots at -80°C until use. Each passage of P129-E-C54S virus was titrated by plaque assay, and the titers were determined to be 1.5×10^4 , 5×10^5 , and 1×10^4 pfu/ml for passages 1, 2, and 3, respectively. Wild type P129 virus was generated from pCMV-S-P129 and titrated in parallel, yielding titers of 1×10^3 , 1×10^4 , and 5×10^5 pfu/ml for passages 1, 2, and 3 respectively.

The P129-E-C54S virus induced a distinct development of cytopathic effect (CPE) showing slow onset of CPE appearance and displayed a small-plaque phenotype relative to the P129 parental virus. Transfection of MARC-145 cells with either parental cDNA clone PCMV-S-P129 or mutant cDNA clone pCMV-S-P129-E-C54S resulted in visible foci of infected cells, and CPE mediated by the P129-E-C54S virus were very similar in size, but slower in appearance to that of the P129 parental virus by about day 4 post-transfection. However, the mutant virus caused rapid and extensive CPE thereafter (by about 5 days post-transfection) with areas of dead or detached cells within the foci, whereas the parental virus simply showed a modest increase in the size of the foci during the same time period. The difference in CPE is illustrated in Figure 1. Viral titers corresponded with this difference in CPE, with the mutant yielding more progeny virus than the parent during the first two virus passages (but less in the third). The difference in plaque morphology is shown in Figure 2. The P129-E-C54S virus produces plaques that are smaller in diameter and different in morphology, relative to parental P129 plaques. The P129-E-C54S plaques were more clear, due to cells in the center of the plaque dying and detaching sooner and more completely than in P129 plaques. Although there can be a number of biological explanations for a small-plaque phenotype, the observation of small plaques is direct evidence that the P129-E-C54S virus is spreading from cell to cell more slowly than its parent. This

37
39

characteristic can be used in the current invention to generate an attenuated (less virulent) live vaccine virus from a virulent parent virus.

Indeed there are numerous examples of viruses that produce small plaque phenotypes and which are themselves attenuated in their natural hosts (Mathew et al., The extracellular domain of vaccinia virus protein B5R affects plaque phenotype, extracellular enveloped virus release, and intracellular actin tail formation. *Journal of Virology*. 72(3):2429-38, (1998); Engelstad et al., The vaccinia virus 42-kDa envelope protein is required for the envelopment and egress of extracellular virus and for virus virulence. *Virology*. 194(2):627-37, (1993); Lewis et al., An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. *Journal of Virology*. 74(3):1275-85, (2000); Lee et al., Common E protein determinants for attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis and West Nile viruses. *Journal of Virology*. 78(15):8271-80 (2004); Frampton et al., Contribution of gene products encoded within the unique short segment of equine herpesvirus 1 to virulence in a murine model. *Virus Research*. 90(1-2):287-301, (2002); Lee, et al., Mechanism of virulence attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis virus and Murray Valley encephalitis virus. *Journal of Virology*. 76(10):4901-11, (2002); Butrapet et al., Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. *Journal of Virology*, 74(7):3011-9, (2000)) The following example, derived from US Patent Publication 2002/0012670, provides clear guidance for the comparison of the virulent character of two different strains of PRRS viruses.

EXAMPLE 3 REVERSION-RESISTANT MUTATIONS OF CYSTEINE RESIDUE 54

The C54S mutation described in example 2 is created by changing a single nucleotide in a single codon, from TGC (cysteine) to AGC (serine). Although adequate for determining the phenotype of the mutation, one would predict that the resulting virus might revert to the parental sequence (and parental phenotype) at a relatively high frequency due to random mutation and natural selection. Preferred embodiments of the invention, especially for vaccine purposes, would contain multiple nucleotide substitutions and/or deletions, designed to minimize the probability of the residue at position 54 reverting to cysteine, and to minimize the probability of other flanking residues (especially residues 51-57) mutating to become cysteines. Examination of the genetic code reveals that cysteine is encoded by only two codons (TGT and TGC). Use of codons that require two or three separate nucleotide mutation events to become cysteine codons are preferred over those that require only one. Examples of such "reversion resistant" mutations

are shown in Table F, and are intended to be representative rather than limiting. Many other examples of reversion resistant mutations may be envisioned by one of ordinary skill in the art.

... Mutation C54S-2 (see Table F) results in the same amino acid change as the C54S mutation, but the choice of serine codon is changed from AGC to TCG. Thus, two independent
5 nucleotide mutations are required to generate a cysteine codon and the probability of phenotypic reversion is reduced relative to C54S. Mutation C54S-3 incorporates the same serine codon at position 54, but also alters the codons for leucine 52 (from TTG to CTG), valine 53 (from GTT to GTA), and serine 55 (from TCC to TCG). As a result, these three codons are less likely to mutate to cysteine codons and therefore less likely to functionally complement the absence of a
10 cysteine residue at position 54. In the CS54-55AA mutation, C54 and S55 are both mutated to encode alanine residues. Like serine, alanine possesses a small, uncharged side chain but lacks cysteine's capacity to form disulfide bonds or to interact with metal ions. Two of the four possible alanine codons (GCG and GCA) are sufficiently different from cysteine codons that all three nucleotide must be mutated in order to generate a cysteine codon. Therefore alanine
15 substitutions are a preferred way to further reduce the possibility of phenotypic reversion. Finally, in the CS54-55delA mutation, the codon for position 54 is deleted. In addition, serine 55 is changed to alanine and the codons for leucine 52 and valine 53 are altered. Phenotypic reversion of such mutant viruses is predicted to be exceedingly rare.

When designing reversion resistant mutations, alternative codons can sometimes be
20 selected in such a way that restriction enzyme recognition sites are created or destroyed. These differences can serve as convenient markers for distinguishing mutated from non-mutated plasmids and viruses. In the case of mutations C54S-3, CS54-55AA, and CS54-55delA (Table F), mutation of the S55 codon TCC to either TCG (serine) or GCG (alanine) results in the destruction of a naturally occurring *SacII* restriction site (CCGCGG).

25 Since ORF2b overlaps ORF2a (which encodes GP2 in a different reading frame), one must be cautious not to introduce termination codons into ORF2a in the process of modifying codons in ORF2b. In some cases, codon changes to ORF2b can alter the amino acid sequence encoded by ORF2a. The effect of such changes on GP2 protein function can be difficult to predict and are best determined empirically.

11/28

TABLE F

Designation	Nucleotide Sequence (genome positions 12,212-12,232 shown). Mutated nucleotides are underlined.	Amino Acid sequence (E protein residues 51-57). Mutated residues are underlined.	Forward (F) and Reverse (R) Mutagenic Primers (genome positions 12,207-12,238 for the first two primer pairs, genome positions 12,203-12,242 for the remaining primer pairs). Mutated nucleotides are underlined.
WT ("wild-type", parental)	SEQ ID NO: 9 AGATTG GTTTGCTCCGCGGTA	SEQ ID NO: 10 RLVCSAV	Not Applicable
C54S	SEQ ID NO: 11 AGATTGGTTAGCTCCG CGGTA	SEQ ID NO: 12 RLVSSAV	SEQ ID NO: 13 F-GCATGAGATTGGTTAGCTCCGCGGT ATTCCG SEQ ID NO: 14 R-CGGAATACCGCGGAGCTAACCAATC TCATGC
C54S-2	SEQ ID NO: 15 AGATTGGTTTCGTCCG CGGTA	SEQ ID NO: 16 RLVSSAV	SEQ ID NO: 17 F-GCATGAGATTGGTTTCGTCCGCGG TATTCCG SEQ ID NO: 18 R-CGGAATACCGCGGACGAAACCAAT CTCATGC
C54S-3	SEQ ID NO: 19 AGACTGGTATCGTCGG CGGTA	SEQ ID NO: 20 RLVSSAV	SEQ ID NO: 21 F-TTTTGCATGAGACTGGTATCGTCG GCGGTATTCCGTGCG SEQ ID NO: 22 R-CGCACGGAATACCGCCGACGATAC CAGTCTCATGCAAAA
CS54-55AA	SEQ ID NO: 23 AGA <u>CT</u> GGTG <u>GCGGCG</u> GCGGTA	SEQ ID NO: 24 RLVAAA V	SEQ ID NO: 25 F-TTTTGCATGAGACTGGTG <u>GCGGCG</u> GCGGTATTCCGTGCG SEQ ID NO: 26 R-CGCACGGAATACCGCCGCGGCCA CCAGTCTCATGCAAAA
CS54-55delA	SEQ ID NO: 27 AGA <u>CT</u> GGTG <u>==</u> <u>GCGGCGGTA</u>	SEQ ID NO: 28 RLV- <u>Δ</u> AV	SEQ ID NO: 29 F-TTTTGCATGAGACTGGTG <u>GCGGCG</u> TATTCCGTGCG SEQ ID NO: 30 R-CGCACGGAATACCGCCGCCACCACT CTCATGCAAAA

42

EXAMPLE 4 ESTABLISHMENT OF ATTENUATION

At least 10 gilts per group are included in each trial, which are derived from a PRRSV-free farm.

Animals are tested free of PRRS virus specific serum antibodies and negative for PRRSV.

- 5 All animals included in the trial are of the same source and breed. The allocation of the animals to the groups is randomized.

Challenge is performed at day 90 of pregnancy with intranasal application of 1 ml PRRSV with 10^5 TCID₅₀ per nostril. There are at least three groups for each test setup: One group for P129 challenge; one test group for challenge with the possibly attenuated virus; and one strict control group.

10

The study is deemed valid when the strict controls stay PRRSV-negative over the time course of the study and at least 25% less live healthy piglets are born in the P129 challenged group compared to the strict controls.

15

Attenuation, in other words less virulence, is defined as the statistical significant change of one or more parameters determining reproductive performance:

Significant reduction in at least one of the following parameters for the test group (possibly attenuated virus) compared to the P129 infected group is preferred:

20

- a.) frequency of stillborns
- b.) abortion at or before day 112 of pregnancy
- c.) number of mummified piglets
- d.) number of less lively and weak piglets
- e.) preweaning mortality

Furthermore a significant increase in one of the following parameters for the test group compared to the P129-infected group is preferred:

- f.) number of piglets weaned per sow
- g.) number of live healthy piglets born per sow

VACCINES

40

An attenuated strain is valuable for the formulation of vaccines. The present vaccine is effective if it protects a pig against infection by a PRRS virus. A vaccine protects a pig against infection by a PRRS virus if, after administration of the vaccine to one or more unaffected pigs, a subsequent challenge with a biologically pure virus isolate (e.g., VR 2385, VR 2386, P129 etc.) results in a lessened severity of any gross or histopathological changes (e.g., lesions in the lung) and/or of symptoms of the disease, as compared to those changes or symptoms typically caused by the isolate in similar pigs which are unprotected (i.e., relative to an appropriate control). More

particularly, the present vaccine may be shown to be effective by administering the vaccine to one or more suitable pigs in need thereof, then after an appropriate length of time (e.g., 4 weeks), challenging with a large sample (10^{5-7} TCID₅₀) of a biologically pure PRRSV isolate. A blood sample is then drawn from the challenged pig after about one week, and an attempt to isolate the virus from the blood sample is then performed (e.g., see the virus isolation procedure exemplified in Experiment VIII below). Isolation of high levels of the virus (similar to unvaccinated, challenged control pigs) is an indication that the vaccine may not be effective. Failure to isolate the virus, or isolation of a reduced amount of virus, is an indication that the vaccine may be effective.

Thus, the effectiveness of the present vaccine may be evaluated quantitatively (i.e., a decrease in the percentage of consolidated lung tissue as compared to an appropriate control group) or qualitatively (e.g., isolation of PRRSV from blood, detection of PRRSV antigen in a lung, tonsil, or lymph node tissue sample by an immunoassay method). The symptoms of the porcine reproductive and respiratory disease may be evaluated quantitatively (e.g., temperature/fever), semi-quantitatively (e.g., severity of respiratory distress [explained in detail below], or qualitatively (e.g., the presence or absence of one or more symptoms or a reduction in severity of one or more symptoms, such as cyanosis, pneumonia, heart and/or brain lesions, etc.).

An unaffected pig is a pig which has either not been exposed to a porcine reproductive and respiratory disease infectious agent, or which has been exposed to a porcine reproductive and respiratory disease infectious agent but is not showing symptoms of the disease. An affected pig is one that shows symptoms of PRRS or from which PRRSV can be isolated.

Vaccines of the present invention can be formulated following accepted convention to include acceptable carriers for animals, including humans (if applicable), such as standard buffers, stabilizers, diluents, preservatives, and/or solubilizers, and can also be formulated to facilitate sustained release. Diluents include water, saline, dextrose, ethanol, glycerol, and the like. Additives for isotonicity include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, and lactose, among others. Stabilizers include albumin, among others. Other suitable vaccine vehicles and additives, including those that are particularly useful in formulating modified live vaccines, are known or will be apparent to those skilled in the art. See, e.g., Remington's Pharmaceutical Science, 18th ed., 1990, Mack Publishing, which is incorporated herein by reference.

Vaccines of the present invention can further comprise one or more additional immunomodulatory components such as, e.g., an adjuvant or cytokine, among others. Non-limiting examples of adjuvants that can be used in the vaccine of the present invention include the RIBI adjuvant system (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), alum, mineral gels such as aluminum

AR
44

hydroxide gel, oil-in-water emulsions, water-in-oil emulsions such as, e. g., Freund's complete and incomplete adjuvants, Block copolymer (CytRx, Atlanta Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), AMPHIGEN[®] adjuvant, saponin, Quil A or other saponin fraction, monophosphoryl lipid A, and Avridine lipid-amine adjuvant.

5 Non-limiting examples of oil-in-water emulsions useful in the vaccine of the invention include modified SEAM62 and SEAM 1/2 formulations. Modified SEAM62 is an oil-in-water emulsion containing 5% (v/v) squalene (Sigma), 1% (v/v) SPAN[®] 85 detergent (ICI Surfactants), 0. 7 (v/v) TWEEN[®] 80 detergent (ICI Surfactants), 2.5% (v/v) ethanol, 200 pg/ml Quil A, 100 [mgr]g/ml cholesterol, and 0.5% (v/v) lecithin. Modified SEAM 1/2 is an oil-in-water emulsion
10 comprising 5% (v/v) squalene, 1% (v/v) SPAN[®] 85 detergent, 0.7% (v/v) Tween 80 detergent, 2.5% (v/v) ethanol, 100 µg/ml Quil A, and 50 µg/ml cholesterol. Other immunomodulatory agents that can be included in the vaccine include, e.g., one or more interleukins, interferons, or other known cytokines.

Vaccines of the present invention can optionally be formulated for sustained release of the
15 virus, infectious RNA molecule, plasmid, or viral vector of the present invention. Examples of such sustained release formulations include virus, infectious RNA molecule, plasmid, or viral vector in combination with composites of biocompatible polymers, such as, e.g., poly(lactic acid), poly(lactic-co-glycolic acid), methylcellulose, hyaluronic acid, collagen and the like. The structure, selection and use of degradable polymers in drug delivery vehicles have been reviewed
20 in several publications, including A. Domb et al., 1992, *Polymers for Advanced Technologies 3*: 279-292, which is incorporated herein by reference. Additional guidance in selecting and using polymers in pharmaceutical formulations can be found in texts known in the art, for example M. Chasin and R. Langer (eds), 1990, "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems" in: *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Vol. 45, M. Dekker, N.Y., which is also incorporated
25 herein by reference. Alternatively, or additionally, the virus, plasmid, or viral vector can be microencapsulated to improve administration and efficacy. Methods for microencapsulating antigens are well known in the art, and include techniques described, e.g., in U.S. Pat. No. 3,137,631; U.S. Pat. No. 3, 959,457; U.S. Pat. No. 4,205,060; U.S. Pat. No. 4,606,940; U.S. Pat. No. 4,744,933; U.S. Pat. No. 5,132,117; and International Patent Publication WO 95/28227, all
30 of which are incorporated herein by reference.

Liposomes can also be used to provide for the sustained release of virus, plasmid, or viral vector. Details concerning how to make and use liposomal formulations can be found in, among other places, U.S. Pat. No. 4,016,100; U.S. Pat. No. 4,452,747; U.S. Pat. No. 4,921,706; U.S. Pat.

23
25

No. 4,927,637; U.S. Pat. No. 4,944,948; U.S. Pat. No. 5,008,050; and U.S. Pat. No. 5,009,956, all of which are incorporated herein by reference.

An effective amount of any of the above-described vaccines can be determined by conventional means, starting with a low dose of virus, plasmid or viral vector, and then
5 increasing the dosage while monitoring the effects. An effective amount may be obtained after a single administration of a vaccine or after multiple administrations of a vaccine. Known factors can be taken into consideration when determining an optimal dose per animal. These include the species, size, age and general condition of the animal, the presence of other drugs in the animal, and the like. The actual dosage is preferably chosen after consideration of the results from other
10 animal studies.

One method of detecting whether an adequate immune response has been achieved is to determine seroconversion and antibody titer in the animal after vaccination. The timing of vaccination and the number of boosters, if any, will preferably be determined by a doctor or veterinarian based on analysis of all relevant factors, some of which are described above.

15 The effective dose amount of virus, infectious RNA molecule, plasmid, or viral vector, of the present invention can be determined using known techniques, taking into account factors that can be determined by one of ordinary skill in the art such as the weight of the animal to be vaccinated. The dose amount of virus of the present invention in a vaccine of the present invention preferably ranges from about 10^1 to about 10^9 pfu (plaque forming units), more
20 preferably from about 10^2 to about 10^8 pfu, and most preferably from about 10^3 to about 10^7 pfu. The dose amount of a plasmid of the present invention in a vaccine of the present invention preferably ranges from about 0.1 μ g to about 100 mg, more preferably from about 1 μ g to about 10 mg, even more preferably from about 10 μ g to about 1 mg. The dose amount of an infectious
25 RNA molecule of the present invention in a vaccine of the present invention preferably ranges from about 0.1 to about 100 mg, more preferably from about 1 μ g to about 10 mg, even more preferably from about 10 μ g to about 1 mg. The dose amount of a viral vector of the present invention in a vaccine of the present invention preferably ranges from about 10^1 pfu to about 10^9 pfu, more preferably from about 10^2 pfu to about 10^8 pfu, and even more preferably from about 10^3 to about 10^7 pfu. A suitable dosage size ranges from about 0.5 ml to about 10 ml, and more
30 preferably from about 1 ml to about 5 ml.

The present invention further provides a method of preparing a vaccine comprising a PRRS virus, infectious RNA molecule, plasmid, or viral vector described herein, which method comprises combining an effective amount of one of the PRRS virus, infectious RNA molecule,

plasmid, or viral vector of the present invention, with a carrier acceptable for pharmaceutical or veterinary use.

In addition the live attenuated vaccine of the present invention can be modified as described in US Patent 6,500,662 to encode a heterologous antigenic epitope which is inserted into the PRRS viral genome using known recombinant techniques. Antigenic epitopes useful as heterologous antigenic epitopes for the present invention include antigenic epitopes from a swine pathogen other than PRRS virus which include, but are not limited to, an antigenic epitope from a swine pathogen selected from the group consisting of porcine parvovirus, porcine circovirus, a porcine rotavirus, swine influenza, pseudorabies virus, transmissible gastroenteritis virus, porcine respiratory coronavirus, classical swine fever virus, African swine fever virus, encephalomyocarditis virus, porcine paramyxovirus, *Actinobacillus pleuropneumoni*, *Bacillus anthraci*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Haemophilus parasuis*, *Leptospira spp.*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus equismilis*, and *Streptococcus suis*. Nucleotide sequences encoding antigenic epitopes from the aforementioned swine pathogens are known in the art and can be obtained from public gene databases such as GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Genbank/index.html>) provided by NCBI.

Additional features and variations of the invention will be apparent to those skilled in the art from the entirety of this application, including the detailed description, and all such features are intended as aspects of the invention. Likewise, features of the invention described herein can be re-combined into additional embodiments that also are intended as aspects of the invention, irrespective of whether the combination of features is specifically mentioned above as an aspect or embodiment of the invention. Also, only such limitations that are described herein as critical to the invention should be viewed as such; variations of the invention which have not been described herein as critically limiting are intended as aspects of the invention. It will be clear that the invention may be practiced otherwise than as particularly described in the foregoing description and examples.

Numerous modifications and variations of the present invention are possible in light of the above teachings and, therefore, are within the scope of the invention.

The entire disclosure of all publications cited herein are hereby incorporated by reference.

45
47**WHAT IS CLAIMED IS:**

1. A composition comprising at least one of the following:

- a) a genetically modified PRRS virus which has been modified such that the conserved cysteine residue in the E protein has been mutated;
- b) an infectious RNA molecule encoding the genetically modified PRRS virus of a.);
- c) an isolated polynucleotide molecule comprising a DNA sequence encoding the infectious RNA molecule of b.).

2. The composition of claim 1 wherein the conserved cysteine is either deleted or replaced with a non-cysteine residue.

3. The composition of claim 2 wherein the cysteine has been replaced with another non-cysteine residue, with the proviso that the residue is not tyrosine,

4. The composition of claim 1 wherein the conserved cysteine has been replaced with serine or conservative substitutions for serine.

5. The composition of claim 1 wherein the conserved cysteine has been replaced with an amino acid residue selected from the group consisting of serine, threonine, methionine and tyrosine.

6. The composition of claim 1 wherein the conserved cysteine has been replaced with an amino acid residue selected from the group consisting of serine, threonine and methionine.

7. The composition of claims 1-6 wherein the conserved cysteine mutation is made reversion-resistant to minimize the probability of the residue at position 54 reverting to cysteine.

8. The composition of claim 1 wherein the PRRS virus is either a North American PRRS virus, or an European PRRS virus.

9. The composition of claim 1 wherein the modification results in a small plaque phenotype virus.

46
48

10. A vaccine for protecting a porcine animal from infection by a PRRS virus comprising the composition of any of claims 1-9 in an amount effective to produce immunoprotection against infection by a PRRS virus; and a carrier acceptable for veterinary use.

11. A method for protecting a porcine animal from infection by a PRRS virus, which comprises vaccinating the animal with an amount of the vaccine of claim 10 that is effective to produce immunoprotection against infection by a PRRS virus.

~~12. A transfected host cell comprising a composition according to any of claims 1-9.~~

13. A method for making a genetically modified North American PRRS virus, which method comprises:

a) mutating a DNA sequence encoding an infectious RNA molecule which encodes a PRRS virus, to produce a genetically modified PRRS virus wherein the conserved cysteine in the E protein has been changed to a non-cysteine residue; and

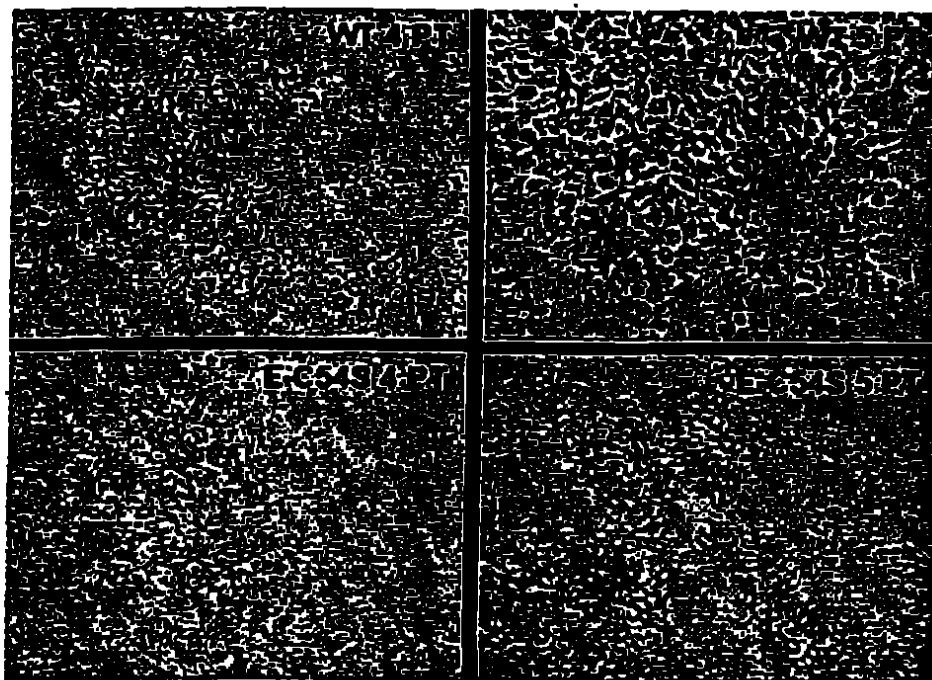
b) introducing the genetically modified North American PRRS virus into a host cell capable of supporting PRRS virus replication.

14. The method of claim 13 wherein the host cell capable of supporting PRRS replication is a MARC-145 cell.

15. The method of claim 13 wherein the host cell capable of supporting PRRS replication is comprised within a live porcine animal.

27
49

Figure 1



48
50

Figure 2



SJ

WFO 2006/051396

Figure 3

'MGSIQSLFDKIGQLFVDAFTEFLVSIVDIIIFLAILFGFTIAGWLVVFCIRLVCSAVFRARPANHPEQLQKIL" P129
'MGSMQSLFDKIGQLFVDAFTEFLVSIVDIIIFLAILFGFTIAGWLVVFCIRLVCSAILRTRPAIHSEQLQKIL" VR-2332
'MG---SLWSKISQLFVDAFTEFLVSVVDIAIFLAILFGFTVAGWLLVFLLRVVC SALLRSRSAINHSPESKVL" Lelystad

FCT/IB2005/003366

4/4

5p
52

SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Inc.
Yoo, Dongwan
Calvert, Jay G.
Lee, Changhee

<120> Mutant Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

<130> PC32633A

<150> 60/626767

<151> 2004-11-11

<160> 30

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 1

actcagtccta agtgctggaa agttatg

27

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 2

atcttatcat gtctggatcc ccgcggc

27

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 3

gcatcagatt ggtagctcc gcggtattcc g

31

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 4

cggaataccg cggagctaac caatctgatg c

31

<210> 5

<211> 73

<212> PRT

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 5

51
53

Met Gly Ser Ile Gln Ser Leu Phe Asp Lys Ile Gly Gln Leu Phe Val
1 5 10 15

Asp Ala Phe Thr Glu Phe Leu Val Ser Ile Val Asp Ile Ile Ile Phe
20 25 30

Leu Ala Ile Leu Phe Gly Phe Thr Ile Ala Gly Trp Leu Val Val Phe
35 40 45

Cys Ile Arg Leu Val Cys Ser Ala Val Phe Arg Ala Arg Pro Ala Ile
50 55 60

His Pro Glu Gln Leu Gln Lys Ile Leu
65 70

<210> 6
<211> 222
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 6
atgggggtcta tacaaagcct cttegacaaa attggccagc tttttgtgga tgctttcacg 60
gaatttttgg tgtccattgt tgatatcatc atatttttgg ccattttgtt tggcttcacc 120
atcgccgggt ggctgggtgg cttttgcac agattgggtt gctccgcggt attccgtgcg 180
cgccctgcc ttcaccctga gcaattacag aagatcctat ga 222

<210> 7
<211> 222
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 7
atgggggtcta tacaaagcct cttegacaaa attggccagc tttttgtgga tgctttcacg 60
gaatttttgg tgtccattgt tgatatcatc atatttttgg ccattttgtt tggcttcacc 120
atcgccgggt ggctgggtgg cttttgcac agattgggtt gctccgcggt attccgtgcg 180
cgccctgcc ttcaccctga gcaattacag aagatcctat ga 222

<210> 8
<211> 73
<212> PRT
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 8

Met Gly Ser Ile Gln Ser Leu Phe Asp Lys Ile Gly Gln Leu Phe Val
1 5 10 15

52
54

Asp Ala Phe Thr Glu Phe Leu Val Ser Ile Val Asp Ile Ile Ile Phe
20 25 30

Leu Ala Ile Leu Phe Gly Phe Thr Ile Ala Gly Trp Leu Val Val Phe
35 40 45

Cys Ile Arg Leu Val Ser Ser Ala Val Phe Arg Ala Arg Pro Ala Ile
50 55 60

His Pro Glu Gln Leu Gln Lys Ile Leu
65 70

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 9
agattgggttt gctccgcggt a 21

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 10

Arg Leu Val Cys Ser Ala Val
1 5

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 11
agattgggtta gctccgcggt a 21

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 12

Arg Leu Val Ser Ser Ala Val
1 5

<210> 13
<211> 31
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 13
gcatgagatt ggtagctcc gcggtattcc g 31

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 14
cggaaataccg cggagctaac caatctcatg c 31

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 15
agattggttt cgtccgcggt a 21

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 16
Arg Leu Val Ser Ser Ala Val
1 5

<210> 17
<211> 31
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 17
gcatgagatt ggtttegtcc gcggtattcc g 31

<210> 18
<211> 31
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 18
cggaaataccg cggacgaac caatctcatg c 31

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 19
agactgggtat cgtcggcggt a 21

<210> 20

5A
56

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 20

Arg Leu Val Ser Ser Ala Val
 1 5

<210> 21
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 21
 ttttgcata gactggtatc gtcggcggtt ttccgtgcg 39

<210> 22
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 22
 cgcacggaat accgccgacg ataccagtct catgcaaa 39

<210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 23
 agactgggtgg cggcggcggt a 21

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 24

Arg Leu Val Ala Ala Ala Val
 1 5

<210> 25
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 25
 ttttgcata gactgggtggc ggcggcggtt ttccgtgcg 39

<210> 26
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

55
58

<400> 26
cgcacggaat accgcgcgcg ccacagtct catgcaaaa 39

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 27
agactggtgg cggcggta 18

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 28
Arg Leu Val Ala Ala Val
1 5

<210> 29
<211> 36
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 29
ttttgcatga gactggtggc ggcggtattc cgtgcg 36

<210> 30
<211> 36
<212> DNA
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 30
cgcacggaat accgcgcgca ccagtctcat gcaaaa 36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2005/003366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/40 C12N7/04 A61K39/00 C07K14/18 A61K39/12
C12N15/86

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K C07K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt [Online] 1 May 2000 (2000-05-01), YOO,D., CARMAN,S: "ORF2b PRRSV" XP002374565 retrieved from EMBL Database accession no. Q9PZ71 the whole document	1,2,4,5, 8-15
P,X	CHANGHEE LEE AND DONGWAN YOO: "Cysteine residues of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus small envelope protein are non-essential for virus infectivity" J GEN VIROL, vol. 86, 2005, pages 3091-3096, XP002374560 the whole document	1-9, 12-14
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C

☒ See patent family annex.

Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 March 2006

Date of mailing of the international search report

25/04/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5518 Petershafen 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 881 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3076

Authorized officer

Chambonnet, F

56
58

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

International application No

PCT/IB2005/003366

57
59

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
P,A	YOO D ET AL: "Infectious cDNA clones of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their potential as vaccine vectors" VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 102, no. 3, 8 December 2004 (2004-12-08), pages 143-154, XP004613285 ISSN: 0165-2427 the whole document	1-15
A	WO 03/062407 A (PROTATEK INTERNATIONAL, INC; YUAN, SHISHAN; MA, SHI-JUN) 31 July 2003 (2003-07-31) paragraphs [0054], [0082]; claims 7,20,24,26; figure 1	1
A	WO 02/095040 A (ID-LELYSTAD, INSTITUUT VOOR DIERHOUDERIJ EN DIERGEZONDHEID B.V; VERHEI) 28 November 2002 (2002-11-28) the whole document	10,11
A	WO 00/65032 A (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE) 2 November 2000 (2000-11-02) claims; sequence 1 2	10,11
A	EP 1 438 969 A (UNIVERSITEIT UTRECHT) 21 July 2004 (2004-07-21) the whole document	1
A	WU WH, FANG Y, FARWELL R, STEFFEN-BIEN M, ROWLAND RR, CHRISTOPHER-HENNINGS J, NELSON EA.: "A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b" VIROLOGY., vol. 287, no. 1, 15 August 2001 (2001-08-15), pages 183-191, XP002374561 cited in the application the whole document	1
A	SNIJDER EJ, VAN TOL H, PEDERSEN KW, RAAMSMAN MJ, DE VRIES AA.: "Identification of a novel structural protein of arteriviruses." J VIROL., vol. 73, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 6335-6345, XP002374562 cited in the application the whole document	1

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2005/003356

58
60

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	WOOTTON SK, YOO D.: "Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages." J VIROL., vol. 77, no. 8, April 2003 (2003-04), pages 4546-4557, XP002374563 cited in the application the whole document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2005/003366

61 59

Box 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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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:

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claim 11 directed to a method of treatment of the animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

As far as claims 13 and 15 claims are directed to a method of treatment of the animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2005/003366

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03062407	A	31-07-2003	EP 1468080 A1	20-10-2004
WO 02095040	A	28-11-2002	NONE	
WO 0065032	A	02-11-2000	AU 4482200 A	10-11-2000
			CA 2370372 A1	02-11-2000
			EP 1183332 A1	06-03-2002
			JP 2003523727 T	12-08-2003
			MX PA01010681 A	20-08-2003
			US 2003072771 A1	17-04-2003
			US 2003119170 A1	26-06-2003
EP 1438969	A	21-07-2004	WO 2004062567 A2	29-07-2004

b2
b4

VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO PORCINO MUTANTE

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona un virus del PRRS genéticamente modificado y polinucleótidos que lo codifican. También se proporcionan vacunas que comprenden el virus y polinucleótidos genéticamente modificados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS) está
10 caracterizado por abortos, mortinatos, y otros problemas reproductores en cerdas y cachorras, así como enfermedad respiratoria en cerdos jóvenes. El agente causante es el virus del PRRS, un miembro de la familia *Arteriviridae* y el orden *Nidovirales*. Dos distintos genotipos del virus emergieron casi simultáneamente en América del Norte y en Europa a finales de los 80. El virus
15 del PRRS ahora es endémico en casi todos los países productores de cerdos, y se considera una de las enfermedades económicamente más importantes que afecta a la industria porcina mundial.

Actualmente, las vacunas comerciales frente a PRRS incluyen vacunas vivas modificadas y muertas (inactivadas). Las vacunas muertas se han
20 criticado por fallar en inducir inmunidad resistente frente a cepas heterólogas de virus del PRRS. Las vacunas vivas modificadas están atenuadas por pases seriados en cultivo celular hasta que se pierde la virulencia. Las vacunas vivas modificadas provocan protección más amplia que las vacunas muertas, pero pueden verse afectadas de varias preocupaciones de seguridad incluyendo
25 virulencia residual, propagación a cerdos no vacunados, y reversión genérica a

virulencia. A causa de los cambios antigénicos que tienen lugar durante el procedimiento de atenuación, dichas vacunas también pueden perder algo de la capacidad de proteger frente a cepas de campo virulentas de virus del PRRS. Hay una necesidad urgente, por lo tanto, de nuevas y mejoradas vacunas vivas modificadas para proteger frente al PRRS.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Efecto Citopático (CPE) en células MARC-145 a los 4 días (izquierda) y 5 días (derecha) después de la transfección usando el clon de ADNc parental pCMV-S-P129 (parte superior) o el clon de ADNc mutante pCMV-S-P129-E-C54S (parte de inferior).

Figura 2. Morfología de placa del virus P129 parental (parte superior) y virus P129-E-C54S mutante (parte inferior). Se infectaron monocapas de células MARC-145, se cubrieron con un revestimiento de agarosa, se incubaron hasta que las placas fueron evidentes, y se tñieron con rojo neutro para visualizar las placas. Las placas del virus mutante son más pequeñas, con CPE más completos en los centros.

Figura 3. Alineamiento de la proteína E de aislados de América del Norte y Europa de virus del PRRS.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

- | | | |
|----|--------------------|---|
| 20 | SEC.ID.Nº 1 | Cebador Lanzadera Directo del Plásmido Lanzadera PTB-Lanzadera-PRRSV-3997 |
| | SEC.ID.Nº 2 | Cebador Lanzadera Inverso del Plásmido Lanzadera PTB-Lanzadera-PRRSV-3997 |
| | SEC.ID.Nº 3 | Cebadores Mutagénicos 2b-C54-Directo |
| 25 | SEC.ID.Nº 4 | Cebadores Mutagénicos 2b-C54-Directo |

- SEC.ID.Nº 5** Proteína E de PRRSV P129
- SEC.ID.Nº 6** ADNc de la Proteína E de PRRSV 129
- SEC.ID.Nº 7** ORF2b Mutado
- SEC.ID.Nº 8** Péptido para ORF2b Mutado
- 5 **SEC.ID.Nº 9, 11, 15, 19, 23, 27** Diversas Mutaciones C54 – Secuencias de Nucleótidos
- SEC.ID.Nº 10, 12, 16, 20, 24, 28** Diversas Mutaciones C54 – Péptidos
- SEC.ID.Nº 13, 14, 17, 18, 21, 22, 25, 26, 29, 30** Cebadores Mutagénicos Directo (F) e Inverso (R) para Mutaciones C54

10

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona un virus del PRRS genéticamente modificado que se ha modificado de tal modo que la cisteína conservada de la Proteína E se ha deletado o cambiado a un resto no de cisteína.

15 La invención proporciona adicionalmente un virus del PRRS genéticamente modificado que se ha modificado de tal modo que la cisteína conservada de la Proteína E se ha deletado o cambiado a un resto no de cisteína con la condición de que el resto no de cisteína no sea tirosina.

20 La presente invención proporciona adicionalmente una molécula de ARN infecciosa que codifica el virus genéticamente modificado mencionado anteriormente.

La presente invención proporciona adicionalmente una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa mencionada anteriormente.

25 La invención también proporciona un cultivo biológicamente puro (es decir, sustancialmente libre de otros virus) de los virus mencionados.

La presente invención proporciona adicionalmente un vector viral que comprende una secuencia de ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa que codifica un virus del PRRS genéticamente modificado como se ha mencionado anteriormente.

- 5 La presente invención proporciona adicionalmente una célula huésped transfectada que comprende cualquiera de los virus, moléculas de ARN infecciosas, polinucleótidos aislados o vectores virales anteriores mencionados anteriormente.

- 10 La presente invención proporciona adicionalmente una vacuna para proteger a un animal porcino de infección por un virus del PRRS, comprendiendo dicha vacuna un virus del PRRS genéticamente modificado como se ha mencionado anteriormente; una molécula de ARN infecciosa como se ha mencionado anteriormente que codifica el virus del PRRS genéticamente modificado; una molécula polinucleotídica aislada (opcionalmente en forma de
- 15 un plásmido), que codifica el virus del PRRS genéticamente modificado; o el vector viral mencionado anteriormente que codifica el virus del PRRS genéticamente modificado; en una cantidad eficaz para producir inmunoprotección frente a infección por un virus del PRRS; y un vehículo aceptable para uso veterinario.

- 20 La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para proteger a un animal porcino de infección por un virus del PRRS, que comprende vacunar al animal con una cantidad de la vacuna mencionada anteriormente que es eficaz para producir inmunoprotección frente a infección por un virus del PRRS.

- 25 La invención proporciona un procedimiento para fabricar un virus del

PRRS genéticamente modificado, comprendiendo dicho procedimiento mutar la secuencia de ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa que codifica el virus del PRRS como se ha descrito anteriormente, y expresar el virus del PRRS genéticamente modificado usando un sistema de expresión adecuado.

- 5 Un virus de PRRS, de tipo silvestre o genéticamente modificado, puede expresarse a partir de una molécula polinucleotídica aislada usando sistemas de expresión adecuados generalmente conocidos en la técnica, ejemplos de los cuales se describen en esta solicitud. Por ejemplo, la molécula polinucleotídica aislada puede estar en forma de un plásmido capaz de
- 10 expresar el virus codificado en una célula huésped adecuada in vitro, como se describe con más detalle a continuación.

Otras características de la invención serán evidentes después del análisis.

DESCRIPCIÓN NDETALLADA DE LA INVENCION

- 15 En este documento se describe un procedimiento para atenuar un virus del PRRS virulento mutando o deleccionando un resto de cisteína específico encontrado en la proteína E (o 2b) del virus, una composición inmunogénica que comprende dicho virus atenuado, y un procedimiento para proteger a los cerdos del PRRS por vacunación con dichas composiciones inmunogénicas.
- 20 Los virus del PRRS que se han atenuado por este procedimiento deben mantener las características antigénicas de la cepa de campo virulenta y, por lo tanto, producen protección más potente que las vacunas basadas en virus atenuados por cultivo celular.

- Los Arterivirus codifican una pequeña proteína estructural hidrófoba
- 25 llamada provisionalmente la proteína de envuelta (E). (Snijder, E. J., y col.

(1999). Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *Journal of Virology* 73(8), 6335-6345). La función de la proteína E no es conocida, pero está conservada en todos los arterivirus. Las mutaciones knockout en el virus de la arteritis equina han demostrado que la proteína E es esencial para la replicación del virus en cultivo celular. A diferencia de otras proteínas estructurales del virus del PRRS, que están cada una codificada por un ARN subgenómico único correspondiente, la proteína E y la proteína GP2 comparten un único ARN subgenómico. ORF2b (que codifica E) está completamente contenido en el ORF2a más grande (que codifica GP2) y utiliza una pauta de lectura diferente. Aunque el codón de inicio ATG de ORF2b está localizado 5
10
15
cadena abajo del codón de inicio de ORF2a, está en un contexto más favorable para el inicio de la traducción y probablemente es el producto principal producido por este ARN subgenómico. (Wu, W. H., y col. (2001). A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 287(1), 183-191).

Los virus del PRRS de genotipo de América del Norte generalmente contienen dos restos de cisteína en la secuencia de aminoácidos de sus proteínas E, en las posiciones 49 y 54. Usando clon de ADNc infeccioso del aislado del PRRS de América del Norte se mutaron individualmente P129, C49
20
y C54 a serina. La mutación C49S resultante fue viable. De manera similar, la mutación C54S también fue viable y produjo altos rendimientos de virus progenie a partir del clon infeccioso. Los virus P129-E-C49S y P129-E-C54S se pasaron fácilmente y se titularon en células MARC. Sin embargo, el virus P129-E-C54S mostró una morfología de placa alterada (pequeña, placas claras) y
25
efecto citopático (CPE) acelerado. Esta mutación debe conducir a atenuación

en el cerdo.

Los virus del PRRS de genotipo de Europa contienen un único resto de cisteína en la posición 51, que corresponde exactamente con C54 en el virus del PRRS de América del Norte cuando se alinean las secuencias de la proteína E. Se espera que la eliminación de C51 en la proteína E del PRRSV de Europa (por delección o sustitución) tenga un fenotipo alterado similar a P129-E-C54S en cultivo celular y esté atenuado en cerdos. (Como se observa a continuación el resto de cisteína presente tanto en las proteínas E tanto de PRRS de América de Norte como de PRRS de Europa se denominan como "cisteína conservada"). Las mutaciones virales de este tipo son valiosas, solas o en combinación con otras mutaciones atenuantes, para denominar nuevas vacunas del PRRS.

DEFINICIONES

CPE es efecto citopático.

El término "proteína E" o "proteína ORF2b" del PRRSV como se usa en este documento se define como un polipéptido que está codificado por ORF2b tanto del aislado de Europa como de América del virus del PRRS. A diferencia de otras proteínas estructurales del virus del PRRS, que están cada una codificada por un ARN subgenómico único correspondiente, la proteína E y la proteína GP2 comparten un único ARN genómico. ORF2b (que codifica E) está completamente contenido en el ORF2a más grande (que codifica GP2) y utiliza una pauta de lectura diferente. Aunque el codón de inicio ATG de ORF2b está localizado cadena abajo del codón de inicio de ORF2a, está en un contexto más favorable para el inicio de la traducción y probablemente es el producto principal producido por este ARN subgenómico. (Wu y col. (2001)).

La expresión **"virus del PRRS de Europa"** se refiere a cualquier cepa del virus del PRRS que tiene las características genéticas asociadas al virus del PRRS que se aisló en un principio en Europa alrededor de 1991 (véase, por ejemplo, Wensvoort, G., y col., 1991, Vet. Q. 13:121-130). **"Virus del PRRS de Europa"** a veces también se menciona en la técnica como **"virus Lelystad"**.

La expresión **"genéticamente modificado"**, como se usa en este documento y salvo que se indique otra cosa, significa genéticamente mutado por intervención humana.

La expresión **"célula huésped capaz de soportar la replicación del virus del PRRS"** significa una línea celular que es capaz de generar PRRS infeccioso cuando se infecta o transfecta con un virus o polinucleótido de la invención. Dichas células incluyen macrocitos alveolares porcinos y derivados de macrocitos alveolares porcinos, células MA-104 y derivados de células MA-104, células MARC-145 y derivados de células MARC-145. Para mostrar el fenotipo de placa pequeña de la invención, son especialmente preferidas las células MARC-145. La expresión **"células huésped capaz de soportar la replicación del virus del PRRS"** también puede incluir células en un cerdo vivo.

La expresión **"respuesta inmune"** para propósitos de esta invención significa la producción de anticuerpos y/o células (tales como linfocitos T) que están dirigidos frente a, o ayudan en la descomposición o inhibición de un epítipo antigénico particular o epítopes antigénicos particulares. Las expresiones **"una respuesta inmunoprotectora eficaz"**, **"inmunoprotección"**, y términos similares, para propósitos de la presente invención, significan una respuesta inmune que está dirigida frente a uno o más epítopes antigénicos de un patógeno para proteger frente a infección por el patógeno en un animal

vacunado. Para propósitos de la presente invención, la protección frente a infección por un patógeno incluye no sólo la prevención absoluta de infección, sino también cualquier reducción detectable en el grado o proporción de infección por un patógeno, o cualquier reducción detectable en la gravedad de la enfermedad o cualquier síntoma o afección resultante de la infección por el patógeno en el animal vacunado en comparación con un animal infectado no vacunado. Una respuesta inmunoprotectora eficaz puede inducirse en animales que no se han infectado previamente con el patógeno y/o no están infectados con el patógeno en el momento de la vacunación. Una respuesta inmunoprotectora eficaz también puede inducirse en un animal ya infectado con el patógeno en el momento de la vacunación.

El término "mutado" significa el remplazamiento de un aminoácido por otro o el remplazamiento del nucleótido codificante por otro (por ejemplo, C por una T), es decir, una supuesta "sustitución", preferiblemente de un modo que el aminoácido codificado se cambie, o cualquier otra mutación tal como "delección" o "inserción". La mutación siempre se realiza en la secuencia de nucleótidos codificante.

El término "virus del PRRS de América del Norte" significa cualquier virus del PRRS que tiene características genéticas asociadas a un aislado del virus del PRRS de América del Norte, tal como, aunque sin limitación, el virus del PRRS que se aisló por primera vez en los Estados Unidos alrededor de comienzo de los 90 (véase, por ejemplo, Collins, J. E., y col., 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126); el aislado MN-1b del virus del PRRS de América del Norte (Kwang, J. y col., 1994, J. Vet. Diagn. Invest. 6:293-296); la cepa Quebec IAF-exp91 del PRRS (Mardassi, H. y col., 1995, Arch. Virol. 140:1405-1418); y

74
73

el aislado VR 2385 del virus del PRRS de América del Norte (Meng, X.-J y col., 1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801). Las características genéticas se refieren a la similitud de secuencia de nucleótidos genómica y la similitud de secuencia de aminoácidos compartidas por las cepas del virus del PRRS de América del Norte.

La expresión **"pauta de lectura abierta"**, u **"ORF"**, como se usa en este documento, significa la secuencia de nucleótidos mínima necesaria para codificar una proteína del virus del PRRS particular sin que intervenga un codón de parada.

Los términos **"porcino"** y **"cerdo"** se usan en este documento de manera intercambiable y se refieren a cualquier animal que sea un miembro de la familia Suidae tales como, por ejemplo, un cerdo. El término **"virus del PRRS"**, o **"PRRSV"**, como se usa en este documento, salvo que se indique otra cosa, significa cualquier cepa de los virus del PRRS de América del Norte o Europa.

Como se usa en este documento, el término **"PRRS"** incluye síntomas de enfermedad en cerdos provocados por una infección con virus del PRRS. Los ejemplos de dichos síntomas incluyen, aunque sin limitación, aborto en hembras preñadas, y crecimiento lento, dificultades respiratorias, pérdida de apetito, y mortalidad en cerdos jóvenes. Como se usa en este documento, un virus del PRRS que es **"incapaz de producir PRRS"** se refiere a un virus que puede infectar un cerdo, pero que, no produce ningún síntoma de enfermedad normalmente asociado a una infección de virus del PRRS en el cerdo, o produce dichos síntomas, pero en menor grado, o produce menor cantidad de dichos síntomas, o ambos, en comparación con una infección virulenta de tipo silvestre.

La expresión **"célula huésped transfectada"** significa prácticamente cualquier célula huésped tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.600.662, incorporada en este documento como referencia, que cuando se transfecta con ARN del virus del PRRS puede producir una primera ronda de viriones del PRRS. Si se desea una infección más productiva se usaría una **"célula huésped capaz de soportar la replicación del virus del PRRS"** como se define a continuación.

Las moléculas polinucleotídicas pueden mutarse genéticamente usando técnicas recombinantes conocidas por los especialistas en la técnica, incluyendo por mutagénesis dirigida de sitio, o por mutagénesis aleatoria tal como por exposición a mutágenos químicos o a radiación, como se sabe en la técnica. Dichas mutaciones pueden realizarse por procedimientos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, mutagénesis dirigida de sitio (véase, por ejemplo, Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) de una copia infecciosa como se ha descrito (por ejemplo, Meulenberg y col., Adv. Exp. Med. Biol, 1998, 440:199-206).

Por consiguiente, la presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para fabricar un virus del PRRS de América del Norte genéticamente modificado, comprendiendo dicho procedimiento mutar la secuencia de ADN que codifica la molécula de ARN infecciosa que codifica el virus del PRRS como se ha descrito anteriormente, y expresar el virus del PRRS genéticamente modificado usando un sistema de expresión adecuado. Un virus del PRRS genéticamente modificado puede expresarse a partir de una molécula polinucleotídica aislada usando sistemas de expresión adecuados

23
25

generalmente conocidos en la técnica, ejemplos de los cuales se describen en esta solicitud. Por ejemplo, la molécula polinucleotídica aislada puede estar en forma de un plásmido capaz de expresar el virus codificado en una célula huésped adecuada in vitro, como se describe con más detalle a continuación.

5 Los ejemplos de isotipos específicos de proteína E que se conocen actualmente son el polipéptido de 73 aminoácido del PRRS de América como se predice por la secuencia presentada en el número de acceso a Genbank U87392 (también conocido como VR2332) en las posiciones del genoma 12.078-12.299, y como se predice por la secuencia con número de acceso a
10 Genbank AF494042 (también conocido como P129) y presentada como proteína AAM18560.1, y la proteína E de 70 restos del PRRS de Europa como se predice por el número de acceso a Genbank M96262 (también conocido como el aislado Lelystad) en las posiciones del genoma 11.801-12.013.

Las secuencias de la proteína E del PRRSV de América del Norte están
15 altamente conservadas y las secuencias presentadas tienen aproximadamente un 93% de identidad entre sí. Las proteínas E del PRRSV de América del Norte y Europa son aproximadamente un 83% idénticas y comparten (entre muchos otros restos) una cisteína conservada en el resto 54 de los aislados de proteína E VR2332 y P129 y el resto 51 de la proteína E del aislado Lelystad. La Figura
20 3 permite la visualización de la cisteína que se ha denominado como la "cisteína conservada", es decir, la cisteína conservada entre los aislados del PRRS de Europa y América. La numeración de los aminoácidos mencionados anteriormente es de acuerdo con las entradas de base de datos mencionadas. En todos los otros aislados del PRRS, que pueden estar numerados de manera
25 diferente, la identificación de la cisteína apropiada se consigue fácilmente

74
76

identificando aminoácidos característicos conservados en una cepa del PRRS de interés y alineándola con una cepa de referencia. Un objeto de la presente invención es modificar un virus del PRRS o sus ácidos nucleicos codificantes de modo que la cisteína conservativa se elimine por sustitución, delección o inserción de modo que de como resultado un fenotipo de placa pequeña.

Las delecciones o sustituciones que eliminan la cisteína conservada se introducen por modificación de los polinucleótidos que codifican los virus de la invención. En una realización preferida una delección o inserción comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10 aminoácidos que dan como resultado la eliminación de la cisteína conservada y en la que dicha delección o sustitución da como resultado un fenotipo de placa pequeña en el virus resultante. Una realización preferida sería una delección o inserción de 5 o menos aminoácidos.

Los aminoácidos pueden clasificarse de acuerdo con las propiedades físicas y contribución a la estructura proteica secundaria y terciaria. Una sustitución conservativa se reconoce en la técnica como una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares. Las sustituciones conservativas ejemplares se exponen en la Tabla A (del documento WO 97/09433, página 10, publicado el 13 de marzo de 1997 (documento PCT/GB96/02197, presentado el 9/6/96)), inmediatamente a continuación.

TABLA A – SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS I

CARACTERÍSTICA	AMINOÁCIDO
DE LA CADENA LATERAL	
Alifática	
No polar	G A P

25
78

Polar-no cargada	ILV CSTM NQ
Polar-cargada	DE KR
Aromática	HFY
Otras	NQDE

Como alternativa, los aminoácidos conservativos se pueden agrupar como se describe en Lehninger, [Biochemistry, Segunda Edición; Worth Publishers, Inc. NY:NY (1975), páginas 71-77], como se expone en la Tabla B, inmediatamente a continuación.

5

TABLA B – SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS II

CARACTERÍSTICA	AMINOÁCIDO
DE LA CADENA LATERAL	
No polar (hidrófoba)	
A. Alifática:	ALIVP
B. Aromática:	FW
C. Que contiene azufre:	M
D. Fronteriza:	G
No cargada-polar	
A. Hidroxilo:	STY
B. Amidas:	NQ
C. Sulfhidrilo:	C
D. Fronterizo:	G
Cargada Positivamente (Básica):	KRH

75
78**Cargada Negativamente (Ácida):****D E**

Como otra alternativa más, las sustituciones conservativas ejemplares se exponen en la Tabla C, inmediatamente a continuación.

TABLA C – SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS III

Resto Original	Sustitución Ejemplar
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

PREPARACIÓN DE VIRUS DEL PRRS GENÉTICAMENTE MODIFICAD S

La tecnología de ADN recombinante comprende técnicas biología molecular extremadamente variadas y poderosas dirigidas a modificar ácidos nucleicos a nivel de ADN y hacen posible analizar y modificar genomas a nivel molecular. A este respecto, los virus tales como virus del PRRS, a causa del

5 pequeño tamaño de su genoma, es particularmente susceptible a dichas manipulaciones. Sin embargo, la tecnología de ADN recombinante no es inmediatamente aplicable a virus ARN no retrovirales porque estos virus no incluyen una etapa intermedia de ADN en su replicación. Para dichos virus, tienen que desarrollarse clones de ADNc infecciosos antes de poder aplicar la

10 tecnología de ADN recombinante a su genoma para generar virus modificados. Los clones infecciosos puede obtenerse a través de la construcción de ADNc de longitud completa (longitud genómica) (aquí usado en el sentido amplio de una copia de ADN del ARN y no sólo en el sentido estricto de una copia de ADN del ARNm) del virus en estudio después de lo cual se sintetiza el

15 transcrito infeccioso in vivo en células transfectadas con el ADNc de longitud completa. Los transcritos infecciosos también se pueden obtener por transcripción in vitro de fragmentos de ADNc de longitud completa o de longitud parcial ligados que comprenden el genoma viral completo. En todos los casos, el ARN transcrito lleva todas las modificaciones que se ha introducido en el

20 ADNc y puede usarse para pasar adicionalmente el virus modificado de esta manera.

La preparación de un clon infeccioso de un asilado del virus del PRRS de Europa, virus Lelystad, se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.268.199 Meulenberg y col., 31 de julio de 2001, que se incorpora por la

25 presente completamente como referencia. La preparación de un clon de ADNc

80 78

infeccioso de un aislado de virus del PRRS de América del Norte denominado P129 se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.500.662 Calvert y col., 31 de diciembre de 2002, que se incorpora por la presente completamente como referencia. La secuencia del ADNc de P129 se describe en el número de
5 acceso a Genbank AF494042 y en la Patente de Estados Unidos N° 6.500.662 Calvert y col., 31 de diciembre de 2002. El siguiente trabajo hace uso de dicho clon infeccioso que en el contexto de un plásmido se expresa por el promotor inmediato temprano de CMV y se ha denominado pCMV-S-P129 y también se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.500.662, Calvert y col., 31 de
10 diciembre de 2002. Como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.500.662 Calvert y col., 31 de diciembre de 2002, también son adecuados otros plásmidos y promotores.

Es evidente que dada la secuencia completa de cualquier pauta de lectura abierta de interés y la localización de un resto de aminoácido de interés
15 un especialista en la técnica simplemente necesita consultar una tabla de codones para diseñar cambios en la posición particular deseada.

TABLA D

Secuencia Codificante de la proteína E del aislado P129
--

81/29

M	G	S	I	Q	S	L	F	D	K	I	G	Q	L
ATG	GGG	TCT	ATA	CAA	AGC	CTC	TTC	GAC	AAA	ATT	GGC	CAG	CTT
F	V	D	A	F	T	E	F	L	V	S	I	V	D
TTT	GTG	GAT	GCT	TTC	ACG	GAA	TTT	TTG	GTG	TCC	ATT	GTT	GAT
I	I	I	F	L	A	I	L	F	G	F	T	I	A
ATC	ATC	ATA	TTT	TTG	GCC	ATT	TTG	TTT	GGC	TTC	ACC	ATC	GCC
G	W	L	V	V	F	C	I	R	L	V	C	S	A
GGT	TGG	CTG	GTG	GTC	TTT	TGC	ATC	AGA	TTG	GTT	TGC	TCC	GCG
V	F	R	A	R	P	A	I	H	P	E	Q	L	Q
GTA	TTC	CGT	GCG	CGC	CCT	GCC	ATT	CAC	CCT	GAG	CAA	TTA	CAG
K	I	L	*										
AAG	ATC	CTA	TGA										

A continuación se expone una tabla de aminoácidos y sus abreviaturas representativas, símbolos y codones en la siguiente Tabla E.

TABLA E

Aminoácido	Abrev.	Símbolo	Codón o codones					
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU				
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU				
Ácido glutámico	Glu	E	GAA	GAG				
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU				
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	His	H	CAC	CAU				
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Lisina	Lys	K	AAA	AAG				
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU

82
80

Metionina	Met	M	AUG					
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU				
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG				
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Triptófano	Trp	W	UGG					
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU				

Como se sabe bien en la técnica, los codones constituyen tripletes de nucleótidos en ARNm y sus moléculas de ADNc correspondientes. Los codones se caracterizan por la base uracilo (U) cuando está presente en un molécula de ARNm pero se caracteriza por la base timidina (T) cuando está presente en ADN. Un simple cambio en un codón para el mismo resto de aminoácido en un polinucleótido no cambiará la secuencia o estructura del polipéptido codificado. Es evidente que cuando una frase que establece esa secuencia de 3 nucleótidos particular "codifica" cualquier aminoácido particular, el especialista en la técnica reconocería que la tabla anterior proporciona un medio para identificar los nucleótidos particulares en cuestión. A modo de ejemplo, si un secuencia de tres nucleótidos particular codifica cisteína la tabla anterior describe que las dos posibles secuencias triplete son UGC (TGC si es en ADN) y UGU (TGT si es en ADN). La serina está codificada por AGC, AGU (AGT en ADN), UCA (TCA en ADN) y UCC (TCC en ADN), UCG (TCG en ADN) y UCU (TCT en ADN). Para cambiar un resto de cisteína a serina en una

proteína codificada, se puede remplazar un triplete TGC o TGT con cualquiera de AGC, AGT, TCA, TCC, TCG o TCT en el ácido nucleico codificante.

La construcción de justo dicha secuencia polinucleotídica de proteína E mutante se muestra a continuación a modo de ejemplo ilustrativo.

**5 EJEMPLO 1: CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO LANZADERA PTB-
LANZADERA-PRRSV-3997**

Se construyó un plásmido lanzadera para facilitar la introducción de modificaciones específicas a un clon de ADNc genómico del virus del PRRS de longitud completa. Se amplificaron por PCR un fragmento de 3.997 pb, que
10 representa el extremo 3' terminal del genoma viral (posiciones de nucleótido 11.504 a 15.416, incluyendo una cola de poliadenosina de 21 restos) y 84 pb de secuencias de vector cadena abajo. La reacción de PCR incluyó 5 ng de ADN del plásmido pCMV-S-P129 (documento US 6.5800.662 B1), 300 ng de cebador
directo P-lanzadera-Dir **SEC.ID.Nº 1** (5'-
15 ACTCAGTCTAAGTGCTGGAAAGTTATG-3': posiciones 11.504 a 11.530), 300 ng de cebador inverso P-lanzadera-Inv **SEC.ID.Nº 2** (5'-ATCTTATCATGTCTGGATCCCCGCGGC-3': posiciones 15.500 a 15.475), 1 mM de cada dNTP, tampón de PCR 1x [KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8,8), MgSO₄ 2 mM, Tritón X-100 al 0,1%], y 2,5 U de ADN polimerasa *Pfu* (Stratagene) usando el GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer). Se calentó la reacción durante 5 min a 95°C y se sometió a 35 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones; desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación de cebador a 55°C durante 1 min, y extensión a 72°C durante 3 min. El producto de PCR se clonó en el vector pTrueBlue usando el
25 TrueBlue MicroCartridge™ PCR Cloning Kit XL (Genomics One; Buffalo, Nueva

84
82

York) para crear pTB-lanzadera-PRRSV-3997.

**EJEMPLO 2 – SUSTITUCIÓN DEL RESTO DE CISTEÍNA 54 EN LA
PROTEÍNA E (O 2B) PARA GENERAR VIRUS P129-E-C54S**

La proteína E de PRRSV P129, que está codificada por ORF 2b,
5 contiene dos restos de cisteína en las posiciones de los aminoácidos 49 y 54,
véase **SEC.ID.Nº 5** 5
MGSIQSLFDKIGQLFVDAFTEFLVSIVDIIIFLAILFGFTIAGWLWVFCIRLVCSAVF
RARPAIHPEQLQKIL. El ADN c para **SEC.ID.Nº 5** es **SEC.ID.Nº 6**
ATGGGGTCTATACAAAGCCTCTTCGACAAAATTGGCCAGCTTTTTGTGGAT
10 GCTTTCACGGAATTTTTGGTGTCCATTGTTGATATCATCATATTTTTGGCCA
TTTTGTTTGGCTTCACCATCGCCGGTTGGCTGGTGGTCTTTTGCATCAGAT
TGGTTTGCTCCGCGGTATTCCGTGCGCGCCCTGCCATTCACCCTGAGCAA
TTACAGAAGATCCTATGA. El resto de cisteína en la posición 54 (posiciones
de nucleótido 12.221-12.223 en el genoma de P129) se reemplazó por una
15 serina usando mutagénesis dirigida de sitio basada en PCR. El plásmido
lanzadera pTB-lanzadera-PRRS-3997 se usó como molde, con los cebadores
2b-C54S-Dir **SEC.ID.Nº 3** (5'-GCATCAGATTGGTTAGCTCCGCGGTATTCCG-
3': posiciones de nucleótido 12.207 a 12.238) y 2b-C54S-Inversión **SEC.ID.Nº**
4 (5'-CGGATACCGCGGAGCTAACCAATCTGATGC-3': posiciones de
20 nucleótido 12.207 a 12.238). El codón mutado está subrayado. Las
amplificaciones por PCR se realizaron usando 5 ng de ADN del plásmido pTB-
lanzadera-PRRS-3997, 300 ng de cada uno de los cebadores directo e inverso;
concentraciones 1 mM de cada dCTP, dGTP, dATP, y dTTP, tampón de PCR
1x [KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8,8), MgSO₄ 2 mM,
25 Tritón X-100 al 0,1%]; y 2,5 U de ADN polimerasa *Pfu* (Stratagene). Las

muestras se sometieron a 16 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación del cebador a 55°C durante 1 min, y extensión del cebador a 68°C durante 12 min 30 segundos. Después de la ciclación por PCR, el producto de PCR se digirió con 5 10 U de *DpnI* para retirar el molde de ADN plasmídico metilado. Se transformaron células XL1-Blue de *E. coli* por choque con calor con 4 µl de la reacción de PCR digerido con *DpnI* que contenía los plásmidos y se sembraron en una placa de agar LB que contenía ampicilina. Las colonias se cogieron aleatoriamente y se cultivaron durante una noche. El ADN plasmídico se 10 preparó usando un kit QIAprep spin miniprep (Qiagen). La presencia de mutaciones deseadas de cisteína a serina (C54S) se verificó por secuenciación de nucleótidos y el plásmido resultante se llamó pTB-lanzadera-E-C54S. La secuencia del ORF2b mutado se da en SEC.ID.Nº 7

ATGGGGTCTATACAAAGCCTCTTCGACAAAATTGGCCAGCTTTTTGTGGAT
 15 GCTTTCACGGAATTTTTGGTGTCCATTGTTGATATCATCATATTTTTGGCCA
 TTTTGTGGCTTCACCATCGCCGGTTGGCTGGTGGTCTTTTGCATCAGAT
 TGGTTAGCTCCGCGGTATTCCGTGCGCGCCCTGCCATTCACCCTGAGCAA
 TTACAGAAGATCCTATGA, y el péptido codificado se da en SEC.ID.Nº 8

MGSIQSLFDKIGQLFVDAFTEFLVSIVDIIIFLAILFGFTIAGWLWVFCIRLVSSAVF
 20 RARPAIHPEQLQKIL.

El plásmido lanzadera pTB-lanzadera-E-C54S y el clon genómico de longitud completa pCMV-S-P129 contienen ambos sitios *Eco47 III* y *BsrG I* únicos (posiciones 285 y 1.192, y posiciones 11.785 y 12.692, respectivamente). Cada plásmido se digirió con *Eco47 III* y *BsrG I*. El fragmento 25 de 908 pb *Eco47 III-BsrG I* se purificó en gel a partir de pTB-lanzadera-E-C54S,

y el fragmento de 17.984 pb *Eco47 III-BsrG I* se purificó en gel a partir de pCMV-S-P129. Los dos fragmentos se ligaron usando ADN ligasa T4 (Invitrogen) para construir un clon de ADNc genómico de longitud completa C54S-modificado. Se transformó la cepa DH5- α de *E. coli* con 10 μ l de la
5 reacción de ligamiento. Las colonias bacterianas se seleccionaron de placas LB que contenían ampicilina y se prepararon ADN plasmídicos. En base a los patrones de digestión con *Xma I*, se seleccionaron clones de longitud completa. Los clones seleccionados se secuenciaron para confirmar la presencia de la modificación C54S en el clon de ADNc genómico de longitud completa. El
10 plásmido resultante se denominó pCMV-S-P129-E-C54S.

Se hicieron crecer células MARC-145 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 8% (FBS; Gibco BRL), penicilina (100 U/ml), y estreptomycin (50 μ g/ml) a 37°C con CO₂ al 5%. Las células se sembraron en placas de 35 mm de diámetro y se hicieron crecer
15 hasta una confluencia del 70%. Las células se transfectaron durante 24 h con 2 μ g de ADN plasmídico de pCMV-S-P129-E-C54S o pCMV-S-P129 parental usando Lipofectina (Invitrogen). Las células transfectadas se incubaron a 37°C en DMEM suplementado con FBS al 8% durante 5 días. Se observó el efecto citopático (CPE) específico de PRRSV 3 días después de la transfección y se
20 la propagación adicional a las células adyacentes se vio 5 días después de la transfección. La especificidad de CPE se confirmó por tinción de células por inmunofluorescencia usando un antisuero de conejo para proteínas no estructurales nsp2 y nsp3, y el MAb SDOW17 N-específico. Los sobrenadantes del cultivo de células transfectadas se recogieron 5 días después de la
25 transfección y se denominó "P129-E-C54S pase 1" (P1). El virus de pase 1 se

usó para inocular células MARC-145 recientes y la recogida a los 5 días se denominó "pase 2" (P2). El virus de "pase 3" se preparó del mismo modo que P2. Cada pase viral se almacenó en alícuotas de 1 ml a -80°C hasta su uso. Cada pase de virus P129-E-C54S se tituló por ensayo de placa, y se determinó
5 que los títulos fueron $1,5 \times 10^4$, 5×10^4 , y 1×10^4 pfu/ml para los pases 1, 2, y 3, respectivamente. El virus P129 de tipo silvestre se generó a partir de pCMV-S-P129 y se tituló en paralelo, produciendo títulos de 1×10^3 , 1×10^4 , y 5×10^5 pfu/ml para los pases 1, 2, y 3 respectivamente.

El virus P129-E-C54S indujo un desarrollo distinto del efecto citopático
10 (CPE) que muestra una lenta aparición de aspecto CPE y mostró un fenotipo de placa pequeña con relación al virus parental P129. La transfección de células MARC-145 con el clon de ADNc parental pCMV-S-P129 o el clon de ADNc mutante pCMV-S-P129-C54S dio como resultado focos visibles de células infectadas, y CPE mediado por el virus P129-E-C54S fue muy similar
15 en tamaño, pero más lento en aparecer que el del virus parental P129 en aproximadamente el día 4 después de la transfección. Sin embargo, a partir de entonces el virus mutante provocó CPE rápido y extensivo (en aproximadamente 5 días después de la transfección) con áreas de células muertas o despegadas en los focos, mientras que el virus parental simplemente
20 mostró un aumento moderado en el tamaño de los focos durante el mismo periodo de tiempo. La diferencia en CPE se ilustra en la Figura 1. Los títulos virales correspondían con esta diferencia en CPE, produciendo el mutante más virus progenie que el parental durante los dos primeros pases del virus (pero menos en el tercero). La diferencia en la morfología de placa se muestra en la
25 Figura 2. El virus P129-E-C54S produce placas que son más pequeñas de

diámetro y diferentes en morfología, con relación a las placas de P129 parental. Las placas de P129-E-C54S fueron más claras, debido a que las células en el centro de la placas morían y se despegaban antes y más completamente que en las placas de P129. Aunque puede haber varias explicaciones biológicas para el fenotipo de placa pequeña, la observación de placas pequeñas es una evidencia directa de que el virus P129-E-C54S se propaga de célula a célula más lentamente que su parental. Esta característica puede usarse en la presente invención para generar un virus de vacuna viva atenuada (menos virulenta) a partir de un virus parental virulento.

- 10 De hecho, hay numerosos ejemplos de virus que producen fenotipos de placa pequeña y que están por sí mismos atenuados en sus huéspedes naturales (Mathew y col., The extracellular domain of vaccinia virus protein B5R affects plaque phenotype, extracellular enveloped virus release, and intracellular actin tail formation. *Journal of Virology*. 72(3):2429-38, (1998);
- 15 Engelstad y col., The vaccinia virus 42-kDa envelope protein is required for the envelopment and egress of extracellular virus and for virus virulence. *Virology*. 194(2):627-37, (1993); Lewis y col., An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. *Journal of Virology*. 74(3):1275-85, (2000); Lee y col.,
- 20 Common E protein determinants for attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis and West Nile viruses. *Journal of Virology*. 78(15):8271-80 (2004); Frampton y col., Contribution of gene products encoded within the unique short segment of equine herpesvirus 1 to virulence in a murine model. *Virus Research*. 90(1-2):287-301, (2002); Lee, y col., Mechanism of
- 25 virulence attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese

B9 87

encephalitis virus and Murria Valley encephalitis virus. Journal of Virology. 76(10):4901-11, (2002); Butrapet y col., Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. Journal of Virology. 74(7):3011-9, (2000)). El siguiente ejemplo, obtenido de la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2002/0012670, proporciona una clara directriz para la comparación del carácter virulento de dos cepas diferentes de virus de PRRS.

EJEMPLO 3 MUTACIONES RESISTENTES A LA REVERSIÓN DEL RESTO DE CISTEÍNA 54

La mutación C54S descrita en el ejemplo 2 se crea cambiando un único nucleótido en un único codón, de TGC (cisteína) a AGC (serina). Aunque es adecuado para determinar el fenotipo de la mutación, se podría predecir que el virus resultante podría revertir a la secuencia parental (y fenotipo parental) a una frecuencia relativamente alta debido a la mutación aleatoria y selección natural. Las realizaciones preferidas de la invención, especialmente para propósitos de vacuna, contendrían sustituciones y/o delecciones de nucleótidos múltiples, diseñados para minimizar la probabilidad de que el resto en la posición 54 revierta a cisteína, y para minimizar la probabilidad de que otros restos flanqueantes (especialmente los restos 51-57) muten para llegar a ser cisteínas. El examen de código genético revela que la cisteína está codificada por sólo dos codones (TGT y TGC). El uso de codones que necesitan dos o tres acontecimientos de mutación de nucleótidos separados para llegar a ser codones de cisteína se prefieren sobre aquellos que necesitan sólo uno. Los ejemplos de dichas mutaciones "resistentes a la reversión" se muestran en la

Tabla F, y pretenden ser representativos en lugar de limitantes. Pueden preverse mucho otros ejemplos de mutaciones resistentes a la reversión por un especialista en la técnica.

La mutación C54S-2 (véase Tabla F) da como resultado el mismo
 5 cambio de aminoácido que la mutación C54S, pero la elección del codón de serina se cambia de AGC a TCG. Por tanto, se necesitan dos mutaciones de nucleótido independientes para generar un codón de cisteína y la probabilidad de reversión fenotípica se reduce con relación a C54S. La mutación C54S-3 incorpora el mismo codón de serina en la posición 54, pero también altera los
 10 codones para la leucina 52 (de TTG a CTG), valina 53 (de GTT a GTA), y serina 55 (de TCC a TCG). Como resultado, estos tres codones tienen menos probabilidad de mutar a codones de cisteína y por lo tanto tienen menos probabilidad de complementar funcionalmente la ausencia de un resto de cisteína en la posición 54. En la mutación CS54-55AA, C54 y S55 están ambos
 15 mutados para codificar restos de alanina. Como la serina, la alanina tiene una pequeña cadena lateral no cargada pero carece de la capacidad de la cisteína de formar enlaces disulfuro o de interaccionar con iones metálicos. Dos de los cuatro posibles codones de alanina (GCG y GCA) son suficientemente diferentes de los codones de cisteína de modo que los tres nucleótidos deben
 20 mutarse para generar un codón de cisteína. Por lo tanto, las sustituciones con alanina son un modo preferido de reducir adicionalmente la posibilidad de reversión fenotípica. Finalmente, en la mutación CS54-55delA, el codón para la posición 54 está delecionado. Además, la serina 55 está cambiada a alanina y los codones para la leucina 52 y la valina 53 están alterados. La reversión
 25 fenotípica de dichos virus mutantes se predice que es extremadamente rara.

al 89

Cuando se diseñan mutaciones resistentes a la reversión, los codones alternativos pueden, a veces, seleccionarse de un modo tal que los sitios de reconocimiento por enzimas de restricción se crean y destruyen. Estas diferencias pueden servir como marcadores prácticos para distinguir los plásmidos y virus mutados de los no mutados. En el caso de las mutaciones C54S-3, CS54-55AA, y CS54-55delA (Tabla F), la mutación del codón S55 TCC a TCG (serina) o GCG (alanina) da como resultado la destrucción de un sitio de restricción SacII de origen natural (CCGCGG).

Como ORF2b solapa con ORF2a (que codifica GP2 en una pauta de lectura diferente), hay que ser cuidadoso de no introducir codones de terminación en ORF2a en el procedimiento de modificar los codones en ORF2b. En algunos casos, los cambios de codones en ORF2b pueden alterar la secuencia de aminas codificada por ORF2a. El efecto de dichos cambios en la función de la proteína GP2 puede ser difícil de predecir y se determinan mejor empíricamente.

TABLA F

Denominación	Secuencia de nucleótidos (posiciones de genoma 12.212-12.232 mostradas). Los nucleótidos mutados están subrayados.	Secuencia de Aminoácidos (restos 51-57 de la proteína E). Los restos mutados están subrayados.	Cebadores Mutagénicos Directo (F) e Inverso (R) (posiciones de genoma 12.207-12.238 para los dos primeros pares de cebadores, posiciones de genoma 12.203-12.242 para los pares de cebadores restantes). Los nucleótidos mutados están subrayados.
WT ("tipo silvestre")	SEC ID Nº: 9	SEC ID Nº: 10	No aplicable

9092

parental)	AGATTG GTTTGCTCCGCGGTA	RLVCSAV	
C54S	SEC ID N°: 11 AGATTGGTTAGCTCCG CGGTA	SEC ID N°: 12 RLVSSAV	SEC ID N°: 13 F-GCATGAGATTGGTTAGCTCCGCGGT ATTCCG SEC ID N°: 14 R-CGGAATACCGCGGAGCTAAACCAATC TCATGC
C54S-2	SEC ID N°: 15 AGATTGGTTTCGTCCG CGGTA	SEC ID N°: 16 RLVSSAV	SEC ID N°: 17 F-GCATGAGATTGGTTTCGTCCGCGG TATTCCG SEC ID N°: 18 R-CGGAATACCGCGGAGCTAAACCAAT CTCATGC
C542-3	SEC ID N°: 19 AGACTGGTATCGTCCG CGGTA	SEC ID N°: 16 RLVSSAV	SEC ID N°: 21 F-TTTTG CATGAGACTGGTATCGTCCG GCGGTATTCCGTGCG SEC ID N°: 22 R-CGCACGGAATAACCGCGGACGATAC CAGTCTCATGCAAAA
CS54-55AA	SEC ID N°: 23 AGACTGGTGGCGGCG GCGGTA	SEC ID N°: 24 RLVAAV	SEC ID N°: 25 F-TTTTG CATGAGACTGGTGGCGGCG GCGGTATTCCGTGCG SEC ID N°: 26 R-CGCACGGAATAACCGCGGCGGCA CCAGTCTCATGCAAAA
CS54-55delA	SEC ID N°: 27 AGACTGGTG= GCGGCGGTA	SEC ID N°: 28 RLV-AAV	SEC ID N°: 29 F-TTTTG CATGAGACTGGTGGCGGCGG TATTCCGTGCG SEC ID N°: 30 R-CGCACGGAATAACCGCGGCAACCAAT CTCATGCAAAA

EJEMPLO 4 ESTABLECIMIENTO DE ATENUACIÓN

Se incluyeron al menos 10 cachorras en cada ensayo, que se obtienen de una granja libre de PRRSV.

Los animales se ensayan libres de anticuerpos en suero específicos del virus de PRRS y negativos para PRRS. Todos los animales incluidos en el
5 ensayo son de la misma fuente y raza. El reparto de los animales en los grupos está aleatorizado.

Se realiza una estimulación en el día 90 de la preñez con aplicación intranasal de 1 ml de PRRSV con 10^5 TCID₅₀ por orificio nasal. Hay tres grupos para cada sistema de ensayo: Un grupo para estimulación con P129; un grupo
10 de ensayo para estimulación con el virus posiblemente atenuado; y un grupo de control estricto.

Es estudio se considera válido cuando los controles estrictos permanecen negativos para PRRSV durante el transcurso de tiempo del estudio y nacen al menos un 25% menos de lechones sanos vivos en el grupo
15 estimulado con P129 en comparación con los controles estrictos.

La atenuación, menos virulencia en otras palabras, se define como el cambio con significancia estadística de uno o más parámetros que determinan el rendimiento reproductor:

Se prefiere la reducción significativa de al menos uno de los siguientes
20 parámetros para el grupo de ensayo (virus posiblemente atenuado) en comparación con el grupo infectado con P129:

- a.) frecuencia de mortinatos
- b.) aborto en o antes del día 112 de la preñez
- c.) cantidad de lechones momificados
- 25 d.) cantidad de lechones menos enérgicos y débiles

e.) mortalidad antes del destete

además, se prefiere un aumento significativo en uno de los siguientes parámetros para el grupo de ensato en comparación con el grupo infectado con P129:

5 f.) cantidad de lechones destetados por cerda

g.) cantidad de lechones sanos vivos nacidos por cerda

VACUNAS

Una cepa atenuada es valiosa para la formulación de vacunas. La presente vacuna es eficaz si protege a un cerdo frente a infección por un virus del PRRS. Una vacuna protege a un cerdo frente a infección por un virus del PRRS si, después de la administración de la vacuna a uno o más cerdos no afectados, una estimulación posterior con un aislado del virus biológicamente puro (por ejemplo, VR 2385, VR 2386, P129 etc.) da como resultado una gravedad reducida de cualquier cambio general o histopatológico (por ejemplo, lesiones en el pulmón) y/o de los síntomas de la enfermedad, en comparación con los cambios o síntomas típicamente provocados por el aislado en cerdos similares que no están protegidos (es decir, en relación a un control apropiado). Más particularmente, la presente vacuna puede demostrar se eficaz administrando la vacuna a uno o más ceros adecuados en necesidad de la misma, después, estimulando tras una extensión de tiempo apropiada (por ejemplo, 4 semanas) con una muestra más grande ($10^{(3-7)}$ TCID₍₅₀₎) de un asilado de PRRSV biológicamente puro. Después se extrae un muestra de sangre del cerdo estimulado después de aproximadamente una semana, y después se realiza un intento de aislar el virus de la muestra de sangre (por ejemplo, véase el procedimiento de aislamiento de virus ejemplificado en el

Experimento VIII a continuación). El aislamiento de altos niveles del virus (similar a cerdos de control no vacunados, estimulados) es un indicio de que la vacuna puede no ser eficaz. No lograr aislar el virus, o el aislamiento de una cantidad reducida de virus, es un indicio de que la vacuna puede ser eficaz.

5 Por tanto, la eficacia de la presente vacuna puede evaluarse cuantitativamente (es decir, una disminución en el porcentaje de tejido pulmonar consolidado en comparación con un grupo de control apropiado) o cualitativamente (por ejemplo, aislamiento de PRRSV de la sangre, detección de antígeno de PRRSV en una muestra tisular de pulmón, amígdala, o nódulo
10 linfático por un procedimiento de inmunoensayo). Los síntomas de la enfermedad reproductora y respiratoria porcina puede evaluarse cuantitativamente (por ejemplo, temperatura/fiebre), semi-cuantitativamente (por ejemplo, gravedad de insuficiencia respiratoria [explicada con detalle a continuación]), o cualitativamente (por ejemplo, la presencia o ausencia de uno
15 o más síntomas o una reducción en la gravedad de uno o más síntomas, tales como cianosis, neumonía, lesiones de corazón y/o cerebro, etc.).

Un cerdo no afectado es un cerdo que no se ha expuesto a un agente infeccioso de la enfermedad reproductora y respiratoria porcina, o que se ha expuesto a un agente infeccioso de la enfermedad reproductora y respiratoria
20 porcina pero que no muestra síntomas de la enfermedad. Un cerdo afectado es uno que muestra síntomas del PRRS o del que puede aislarse PRRSV.

Las vacunas de la presente invención pueden formularse siguiendo el convenio aceptado para incluir vehículos aceptables para animales, incluyendo seres humanos (si es aplicable), tales como tampones, estabilizadores,
25 diluyentes, y/o solubilizantes convencionales, y también pueden formularse para

facilitar la liberación sostenida. Los diluyentes incluyen agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, y similares. Los aditivos para isotonicidad incluyen cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol, y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina, entre otros. Otros vehículos y aditivos de
5 vacuna adecuados, incluyendo aquellos que son particularmente útiles en formulación de vacunas vivas modificadas, se conocen o serán evidentes para los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 18ª ed., 1990, Mack Publishing, que se incorpora en este documento como referencia.

10 Las vacunas de la presente invención pueden comprender adicionalmente uno o más componentes inmunomoduladores adicionales tales como, por ejemplo, un adyuvante o citoquina, entre otros. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes que se pueden usar en la vacuna de la presente invención incluyen el sistema adyuvante RIBR (Ribi Inc., Hamilton, Mont.),
15 alumbre, geles minerales tales como gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, por ejemplo, adyuvantes completo e incompleto de Freund, copolímero Block (CytRx, Atlanta Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Clif.), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A o otra fracción de saponina,
20 monofosforil lípido A, y adyuvante lípido-amina Avridine. Los ejemplos no limitantes de emulsiones de aceite en agua útiles en la vacuna de la invención incluyen formulaciones SEAM62 y SEAM1/2 modificadas. SEAM62 modificado es una emulsión de aceite en agua que contiene escualeno al 5% (v/v) (Sigma), detergente SPAN®85 al 1% (v/v) (ICI Surfactants), detergente TWEEN®80 al
25 0,7% (v/v) (ICI Surfactants), etanol al 2,5% (v/v), 200 pg/ml de Quil A, 100

[mgr]g/ml de colesterol, y lecitina al 0,5% (v/v). SEAM1/2 modificado es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno al 5% (v/v), detergente SPAN[®]85 al 1% (v/v), detergente Tween 80 al 0,7% (v/v), etanol al 2,5% (v/v), 100 µg/ml de Quil A, y 50 µg/ml de colesterol. Otros agentes
5 Inmunomoduladores que pueden incluirse en la vacuna incluyen, por ejemplo, una o más interleuquinas, interferones, u otras citoquinas.

Las vacunas de la presente invención pueden formularse opcionalmente para liberación sostenida del virus, molécula de ARN infecciosa, plásmido, o vector viral de la presente invención. Los ejemplos de dichas formulaciones de
10 liberación sostenida incluyen virus, molécula de ARN infecciosa, plásmido, o vector viral en combinación con compuestos de polímeros biocompatibles, tales como, por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, colágeno y similares. La estructura, selección y uso de polímeros degradables en vehículos de suministro de fármacos se han
15 analizado en varias publicaciones, incluyendo A. Domb y col., 1992, *Polymers for Advanced Technologies* 3: 279-292, que se incorpora en este documento como referencia. Puede encontrarse una directriz adicional sobre la selección y uso de polímeros en formulaciones farmacéuticas en textos conocidos en la técnica, por ejemplo, M. Chasin y R. Langer (eds), 1990, "Biodegradable
20 *Polymers as Drug Delivery Systems*" en: *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Vol. 45, M. Dekker, N.Y., que también se incorpora en este documento como referencia. Como alternativa, o adicionalmente, el virus, plásmido, o vector viral puede microencapsularse para mejorar la administración y eficacia. Los procedimientos para microencapsular antígenos
25 son bien conocidos en la técnica, e incluyen técnicas descritas, por ejemplo, en

la Patente de Estados Unidos N° 3.137.631; Patente de Estados Unidos N° 3.959.457; Patente de Estados Unidos N° 4.205.060; Patente de Estados Unidos N° 4.606.940; Patente de Estados Unidos N° 4.744.933; Patente de Estados Unidos N° 5.132.117; y la Publicación de Patente Internacional WO 95/28227, todas las cuales se incorporan en este documento como referencia.

También pueden usarse liposomas para proporcionar la liberación sostenida del virus, plásmido, o vector viral. Pueden encontrarse los detalles con respecto a cómo fabricar y usar formulaciones liposomales en, entre otros sitios, la Patente de Estados Unidos N° 4.016.100; Patente de Estados Unidos N° 4.452.747; Patente de Estados Unidos N° 4.921.706; Patente de Estados Unidos N° 4.927.637; Patente de Estados Unidos N° 4.944.948; Patente de Estados Unidos N° 5.008.050; y Patente de Estados Unidos N° 5.009.956, todas las cuales se incorporan en este documento como referencia.

Una cantidad eficaz de cualquiera de las vacunas descritas anteriormente puede determinarse por medios convencionales, comenzando con una baja dosis de virus, plásmido o vector viral, y después aumentando la dosificación mientras se controlan los efectos. Una cantidad eficaz puede obtenerse después de una administración única de una vacuna o después de administraciones múltiples de una vacuna. Pueden tenerse en cuenta factores conocidos cuando se determina una dosis óptima por animal. Estos incluyen la especie, tamaño, edad y condición general del animal, la presencia de otros fármacos en el animal, y similares. La dosificación real se elige preferiblemente después de considerar los resultados de otros estudios animales.

Un procedimiento para detectar si se ha conseguido una respuesta inmune adecuada es determinar la seroconversión y título de anticuerpo en el

animal después de la vacunación. El ritmo de vacunación y la cantidad de estimulaciones, si las hay, se determinará preferiblemente por un doctor o veterinario en base al análisis de todos los factores pertinentes, algunos de los cuales se describen anteriormente.

- 5 La cantidad de dosis eficaz de virus, molécula de ARN infecciosa, plásmido, o vector viral, de la presente invención puede determinarse usando técnicas conocidas, teniendo en cuenta factores que pueden determinarse por un especialista en la técnica tales como peso del animal a vacunar. Esta cantidad de dosis de virus de la presente invención en una vacuna de la
- 10 presente invención varía preferiblemente de aproximadamente 10^1 a aproximadamente 10^9 pfu (unidades formadoras de placas), más preferiblemente de aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^8 pfu, y más preferiblemente de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^7 pfu. La cantidad de dosis de un plásmido de la presente invención en una vacuna de la
- 15 presente invención preferiblemente varía de aproximadamente 0,1 μ g a aproximadamente 100 mg, más preferiblemente de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 10 mg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 1 mg. La cantidad de dosis de una molécula de ARN infecciosa de la presente invención en una vacuna de la presente invención
- 20 preferiblemente varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg, más preferiblemente de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 10 mg, incluso más preferiblemente de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 1 mg. La cantidad de dosis de un vector viral de la presente invención en una vacuna de la presente invención varía preferiblemente de aproximadamente
- 25 10^1 pfu a aproximadamente 10^9 pfu, más preferiblemente de aproximadamente

10^2 pfu a aproximadamente 10^8 pfu, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^7 pfu. Un tamaño de dosificación adecuado varía de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 10 ml, y más preferiblemente de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 5 ml.

5 La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para preparar una vacuna que comprende un virus del PRRS, molécula de ARN infecciosa, plásmido, o vector viral descrito en este documento, comprendiendo dicho procedimiento combinar una cantidad eficaz de uno de virus del PRRS, molécula de ARN infecciosa, plásmido, o vector viral de la
10 presente invención, con un vehículo aceptable para uso farmacéutico o veterinario.

Además, la vacuna atenuada viva de la presente invención puede modificarse como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 6.500.662 para que codifique un epítotope antigénico heterólogo que está insertado en el
15 genoma viral del PRRS usando técnicas recombinantes conocidas. Los epítotope antigénicos útiles como epítotope antigénicos heterólogos para la presente invención incluyen epítotope antigénicos de un patógeno de cerdos distinto del virus del PRRS que incluyen, aunque sin limitación, un epítotope antigénico de un patógeno de cerdos seleccionado entre el grupo constituido
20 por parvovirus porcino, circovirus porcino, un rotavirus porcino, gripe del cerdo, virus de la pseudorrabia, virus de la gastroenteritis transmisible, coronavirus respiratorio porcino, virus de la fiebre del cerdo clásica, virus de la fiebre del cerdo africana, virus de la encefalomiocarditis, paramixovirus porcino, *Actinobacillus pleuropneumoni*, *Bacillus anthraci*, *Bordetella bronchiseptica*,
25 *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*,

Escherichia coli, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Haemophilus parasuis*, *Leptospira* spp., *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus equismitis*, y *Streptococcus suis*. Las

5 secuencias de nucleótidos que codifican los epítopes antigénicos de los patógenos del cerdo mencionados anteriormente son conocidas en la técnica y pueden obtenerse de bases de datos de genes públicas tales como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Genbank/index.html>) proporcionado por NCBI.

10 Las características y variaciones adicionales de la invención serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de la totalidad de esta solicitud, incluyendo la descripción detallada, y todas dichas características se entienden como aspectos de la invención. Del mismo modo, las características de la invención descrita en este documento pueden re-combinarse en

15 realizaciones adicionales que también se entienden como aspectos de la invención, sin tener en cuenta si la combinación de características está específicamente mencionada anteriormente como un aspecto o realización de la invención. Además, sólo dichas limitaciones que se describen en este documento como críticas para la invención deben verse como tales; las

20 variaciones de la invención que no se han descrito en este documento como críticamente limitantes se entienden como aspectos de la invención. Quedará claro que la invención puede practicarse de manera distinta a la descrita particularmente en la descripción y ejemplos anteriores.

Son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la presente

25 invención a la luz de los contenidos anteriores y, por lo tanto, pertenecen al

alcance de la invención.

La descripción completa de todas las publicaciones citadas en este documento se incorporan por la presente como referencia.

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende al menos uno de los siguientes:
- a) un virus del PRRS genéticamente modificado que se ha modificado de modo que el resto de cisteína conservado en la proteína E se ha mutado;
- b) una molécula de ARN infecciosa que codifica el virus del PRRS genéticamente modificado de a.);
- 10 c) una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de ADN que codifica la molécula de ARN infecciosa de b.).
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la cisteína conservada está delecionada o remplazada con un resto no de cisteína.
- 15 3. La composición de la reivindicación 2, en la que la cisteína se ha remplazado con otro resto no de cisteína, con la condición de que el resto no sea tirosina.
- 20 4. La composición de la reivindicación 1, en la que la cisteína conservada se ha remplazado con serina o sustituciones conservativas para la serina.
5. La composición de la reivindicación 1, en la que la cisteína conservada se ha remplazado con un resto de aminoácido seleccionado entre el grupo
- 25 constituido por serina, treonina, metionina y tirosina.

6. La composición de la reivindicación 1, en la que la cisteína conservada se ha remplazado con un resto de aminoácido seleccionado entre el grupo constituido por serina, treonina y metionina.

5

7. La composición de las reivindicaciones 1-6, en la que la mutación de la cisteína conservada se hace resistente a la reversión para minimizar la probabilidad de que el resto de la posición 54 revierta a cisteína.

10 8. La composición de la reivindicación 1, en la que el virus del PRRS es un virus del PRRS de América del Norte, o un virus del PRRS de Europa.

9. La composición de la reivindicación 1, en la que la modificación da como resultado un virus con fenotipo de placa pequeña.

15

10. Una vacuna para proteger a un animal porcino de infección por un virus del PRRS que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en una cantidad eficaz para producir inmunoprotección frente a infección por un virus del PRRS; y un vehículo aceptable para uso veterinario.

20

11. Un procedimiento para proteger a un animal porcino de infección por un virus del PRRS, que comprende vacunar al animal con una cantidad de la vacuna de la reivindicación 10, que es eficaz para producir inmunoprotección frente a infección por un virus del PRRS.

25

12. Una célula huésped transflectada que comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicación 1-9.

13. Un procedimiento para fabricar un virus del PRRS de América del Norte genéticamente modificado, comprendiendo dicho procedimiento:

- a) mutar una secuencia de ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa que codifica un virus del PRRS, para producir un virus del PRRS genéticamente modificado en el que la cisteína conservada en la proteína E se ha cambiado a un resto no de cisteína; y
- 10 b) Introducir el virus del PRRS de América del Norte genéticamente modificado en una célula huésped capaz de soportar la replicación del virus del PRRS.

14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la célula huésped capaz de soportar la replicación del PRRS es una célula MARC-145.

15

15. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la célula huésped capaz de soportar la replicación del PRRS está comprendida en un animal porcino vivo.

RESUMEN

La presente invención proporciona un virus del PRRS genéticamente modificado y polinucleótidos que lo codifican. También se proporcionan
5 vacunas que comprenden el virus y polinucleótidos genéticamente modificados.

107
105

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Pfizer Inc.	
	Yoo, Dongwan	
	Calvert, Jay G.	
5	Lee, Changhee	
	<120> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino Mutante	
	<130> PC32633A	
10	<150> 60/626767	
	<151> 11-11-2004	
	<160> 30	
15	<170> PatentIn Versión, 3.3	
	<210> 1	
	<211> 27	
	<212> ADN	
20	<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino	
	<400> 1	
	actcagtccta agtgctggee agttatg	27
25	<210> 2	

108
106

<211>27
<212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

5 <400> 2
atcttatcat gtctggatcc ccgcggc 27

<210> 3
<211>31
10 <212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 3
gcctcagatt ggtagctcc gcggtattcc g 31

15
<210> 4
<211>31
<212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

20
<400> 4
cggataccg cggagctaac caatctgatg c 31

<210> 5
25 <211>73

109
107

<212> PRT

<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 5

Met Gly Ser Ile Gln Ser Leu Phe Asp Lys Ile Gly Gln Leu Phe Val
1 5 10 15
Asp Ala Phe Thr Glu Phe Leu Val Ser Ile Val Asp Ile Ile Ile Phe
20 25 30
Leu Ala Ile Leu Phe Gly Phe Thr Ile Ala Gly Trp Leu Val Val Phe
35 40 45
Cys Ile Arg Leu Val Cys Ser Ala Val Phe Arg Ala Arg Pro Ala Ile
50 55 60
His Pro Glu Gln Leu Gln Lys Ile Leu
65 70

5

<210> 6

<211> 222

<212> ADN

10 <213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 6

atgggggtcta tacaaagcct cttcgacaaa attggccagc tttttgtgga tgctttcacg 60
gaatttttgg tgtccattgt tgatatcacc atatttttgg ccattttggt tggcttcacc 120
atcgccgggt ggcgtggtgt cttttgcacc agattggttt gctccgcggt attcogtgcg 180
cgccctgccca ttcaccctga gcaattacag aagatcctat ga 222

110
108

<210> 7
<211>222
<212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

5

<400> 7
atgggggtota tacaagagcct ottegacaaa attgggcagc tttttgtgga tgcttttcacg 60
gaattttttgg tgtccattgt tgatatcatc atatttttgg ccatttttgtt tggcttcaco 120
atgcgcggtt ggcgtggtgtt ottttgoatc agattgggta gctccgcggt attccgtgcg 180
cgccctgoca ttoaccctga gcaattacag aagatcctat ga 222

<210> 8
10 <211>73
<212> PRT
<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 8
15 Met Gly Ser Ile Gln Ser Leu Phe Asp Lys Ile Gly Gln Leu Phe Val
1 5 10 15
Asp Ala Phe Thr Glu Phe Leu Val Ser Ile Val Asp Ile Ile Ile Phe
20 25 30
Leu Ala Ile Leu Phe Gly Phe Thr Ile Ala Gly Trp Leu Val Val Phe
35 40 45
Cys Ile Arg Leu Val Ser Ser Ala Val Phe Arg Ala Arg Pro Ala Ile
50 55 60
His Pro Glu Gln Leu Gln Lys Ile Leu
65 70

111
109

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
5 <213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 9
agattggttt gctccgcggt a . 21

10 <210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

15 <400> 10
Arg Leu Val Cys Ser Ala Val
1 5

<210> 11
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 11
agattggtta gctccgcggt a . 21

112
H0

<210> 12

<211>7

<212> PRT

5 <213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 12

Arg Leu Val Ser Ser Ala Val
1 5

10 <210> 13

<211> 31

<212> ADN

<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

15 <400> 13

gcatgagatt ggtagctcc gcggtattcc g 31

<210> 14

<211>31

20 <212> ADN

<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 14

cggaatacgg cggagctaac caatctcatg c 31

25

113
H1

<210> 15
<211>21
<212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

5

<400> 15
agattgggtt cgtccgcggt a 21

<210> 16
10 <211>7
<212> PRT
<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 16
15 Arg Leu Val Ser Ser Ala Val
1 5

<210> 17
<211>31
<212> ADN
20 <213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 17
gcatgagatt ggtttcgtcc gcggtattcc g 31

25 <210> 18

114
142

<211>31
<212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

5 <400> 18
cggaatacog cggacgaaac caatctcatg c 31

<210> 19
<211>21
10 <212> ADN
<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 19
agactgggtat cgtcggcggt a 21

15
<210> 20
<211>7
<212> PRT
<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

20
<400> 20
Arg Leu Val Ser Ser Ala Val
1 5

<210> 21
25 <211>39

113
43

<212> ADN

<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 21

5 **ttttgcatga gactgggtatc gtgggcggta ttccgtgog** 39

<210> 22

<211>39

<212> ADN

10 <213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 22

cgcacgggaat accgcgcgacg ataccagtct catgcaaaa 39

15 <210> 23

<211>21

<212> ADN

<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

20 <400> 23

agactgggtgg cggcggcggt a 21

<210> 24

<211>7

25 <212> PRT

116
114

<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 24

Arg Leu Val Ala Ala Ala Val
1 5

5

<210> 25

<211> 39

<212> ADN

<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

10

<400> 25

ttttgcatga gactggtggc ggcggcggtt ttccgtgcg 39

<210> 26

15

<211> 39

<212> ADN

<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 26

20

cgcacgggaat acgcgcgcgc ccaccagtct catgcanaa 39

<210> 27

<211> 18

<212> ADN

117
45

<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 27

agactggtgg cggcggta

18

5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

10

<400> 28

Arg Leu Val Ala Ala Val
1 5

<210> 29

15

<211> 36

<212> ADN

<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 29

20

ttttgcatga gactggtggc ggcggtatcc cgtgcg

36

<210> 30

<211> 36

<212> ADN

118
H6

<213> Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino

<400> 30

cgcacgggaat accgcgcgcca ccagtctcat gcaaaa . . 36

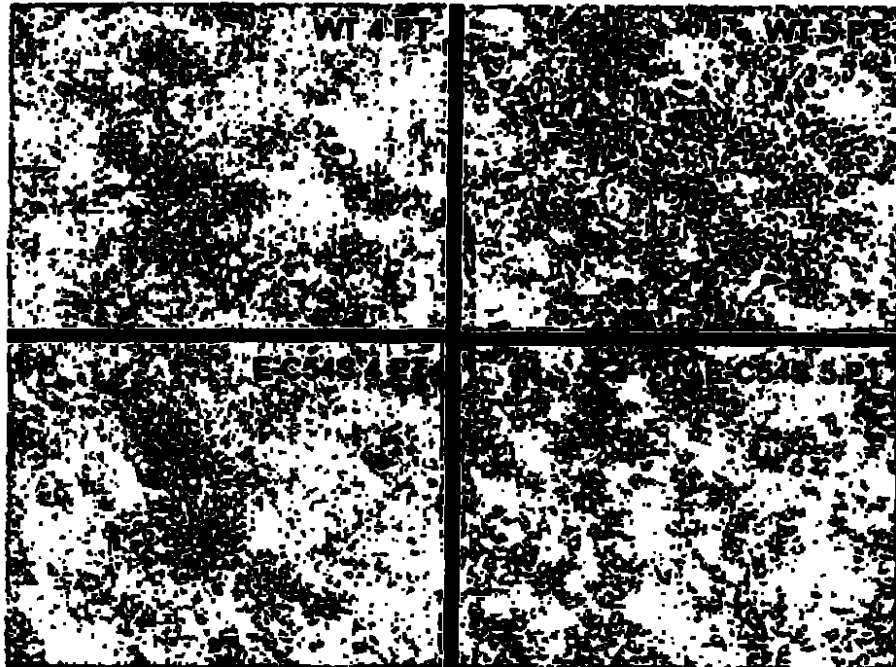
Figura 1***1/3***

Figura 2

Figura 3

'MGSIQSLFDKIGQLFVDAFTEFLVSIVDIIIFLAILFGFTIAGNLVVFCIRLVCSAVFRARPANHPEQLQKIL" P129
'MGSMQSLFDKIGQLFVDAFTEFLVSIVDIIIFLAILFGFTIAGNLVVFCIRLVCSAILRTRPAIHSEQLKIL" V2-2332
'MG---SLWSKISQLFVDAFTEFLVSIVDIAIFLAILFGFTVAGWLLVFLLRVVCSALLRSRPAIHSPELSKVL" Lelystad

58

121

122
120

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL REPORTE DE EXAMEN
PRELIMINAR INTERNACIONAL DE PATENTABILIDAD
(PCT Regla 71.1)
De: AUTORIDAD DE REVISION PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para:
FULLER, Grover, F., Jr
Pfizer Inc.
201 Tabor Road
Morris Plains, NJ 07950
Estados Unidos de América

Fecha de expedición: 04.10.2006
Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC32633A
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2005/003366
Fecha de presentación internacional: 02.11.2005
Fecha de prioridad: 11.11.2004
Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC. et. al.

1. Se notifica al solicitante que la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional ha emitido el informe de examen preliminar internacional para la solicitud internacional y se lo transmite adjunto, acompañado, si procede, de sus anexos.
2. Se transmite una copia del presente informe y, si procede, de sus anexos, a la Oficina Internacional para comunicación a todas las Oficinas elegidas.
3. Si alguna Oficina elegida lo exige, la Oficina Internacional realizará una traducción en inglés del informe (con exclusión de sus anexos) y la transmitirá a las Oficinas interesadas.

4. RECORDATORIO

Para iniciar la fase nacional ante cada Oficina elegida, el solicitante debe cumplir ciertos actos (presentación de la traducción y pago de las tasas nacionales) en el plazo de 30 meses desde la fecha de prioridad (o más tarde por lo que respecta a ciertas oficinas) (Artículo 39 (1)) (véase también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional en el formulario PCT/IB/301).

Cuando deba entregarse una traducción de la solicitud internacional o una oficina elegida, se incluirá la traducción de cualquier anexo de informe de Examen Preliminar Internacional. Corresponde al

123
124

solicitante preparar la traducción en cuestión y entregarla directamente a cada Oficina elegida interesada

Para más amplios detalles en lo relativo a los plazos aplicables y las exigencias de las oficinas elegidas, véase el Volumen II de la guía del solicitante PCT.

Se llama la atención del solicitante sobre el Artículo 33(5) que prevé que los criterios de novedad, actividad inventiva y de aplicación industrial definidos en el Artículo 33(2) a (4) sólo servirán a los efectos del examen preliminar internacional, y que "todo Estado contratante puede aplicar criterios adicionales o diferentes al objeto de decidir, en ese Estado, si la invención es patentable o no" (véase también el Artículo 27(5)). Tales criterios adicionales pueden afectar, por ejemplo, a las excepciones de patentabilidad, requisitos específicos relativos a la divulgación, la claridad de las reivindicaciones.

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea – PB-5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk – Pays Bas
Tel: +31 70 340-2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340-3016

Funcionario Autorizado: Wallentin, Marko
Tel: +31 70 340-3991

124
122

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en materia de Patentes)
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC32633A
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2005/003366
Fecha de presentación internacional: 02.11.2005
Fecha de prioridad: 11.11.2004
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la vez clasificación nacional e IPC: INV. C12N 15/40, C12N 7/04, A61K 39/00, C07K 14/18, A61K 39/12, C12N 15/86
Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC. et al.

1. El reporte de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Revisión Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y es transmitido al solicitante según el Artículo 36.
2. Este REPORTE consta de un total de 7 hojas, incluida la presente hoja de portada.
3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden.
 - a. ☐ (remitido al solicitante y a la oficina internacional) un total de hojas, descritas a continuación:
 - ☐ hojas de la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos que han sido modificadas y que sirven de base al presente informe, y/o de hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Administración (véase la Regla 70.16 y la Instrucción Administrativa 607 del PCT).
 - ☐ hojas que reemplazan a otras hojas anteriores, pero que esta Administración considera que contienen modificaciones que se extienden más allá de la divulgación de la invención tal como fue originalmente presentada, según se indica en el punto 4 del Reglamento I y en el Recuadro Suplementario.
 - b. ☐ (remitido únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y soporte(s) electrónico(s)) , que contienen una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s), solo en formato legible por ordenador, como se indica en el Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias (ver Instrucción Administrativa 802).

125
123

4. El presente informe contiene indicaciones relativas a los siguientes puntos:

- | | | |
|-------------------------------------|---------------|--|
| ☒ | Recuadro I | Base de este informe |
| ☐ | Recuadro II | Prioridad |
| ☐ | Recuadro III | Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial |
| ☐ | Recuadro IV | Falta de unidad de Invención |
| ☒ | Recuadro V | Declaración motivada según el Artículo 35(2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial, citas y explicaciones en apoyo de esta declaración |
| ☐ | Recuadro VI | Ciertos documentos citados |
| ☐ | Recuadro VII | Defectos en la Solicitud Internacional |
| ☐ | Recuadro VIII | Observaciones relativas a la solicitud internacional |

Fecha de radicación de la demanda: 26.01.2006
Fecha de elaboración de este reporte: 04.10.2006

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea – PB-5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk – Pays Bas
Tel: +31 70 340-2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340-3016

Funcionario Autorizado: CHAMBONNET, F
Tel: +31 70 340-

126
129

Recuadro I. Base de este informe

1. Por lo que respecta al **idioma**, este informe se ha establecido sobre la base de la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada a continuación.

- ☐ Este informe está basado en una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el de una traducción proporcionada a los fines de:
 - ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3 y 23.1 (b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según Regla 12.4)
 - ☐ examen preliminar internacional (según Reglas 55.2 y/o 55.3)

2. Por lo que respecta a los **elementos*** de la solicitud internacional, esta opinión se ha establecido sobre la base de *(las hojas de reemplazo que hayan sido enviadas a la Oficina receptora en respuesta a un requerimiento según el Artículo 14 se las denomina en este informe como "inicialmente presentadas" y no se anexan al informe)*:

Descripción, Páginas

1 - 22 tal como se presentaron inicialmente

Lista de secuencias que hacen parte de la descripción, paginas,

1 - 6 tal como se presentaron inicialmente

Reivindicaciones, Números

1 - 15 tal como se presentaron inicialmente

Dibujos, Figuras

1-3 tal como se presentaron inicialmente

☒ una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s) – ver Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias

3. ☐ Las modificaciones ha ocasionado la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.

127
125

- ☐ la lista de secuencias (especificar):
☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):
4. ☐ El presente informe ha sido establecido como si no se hubiesen presentado (algunas de) las modificaciones anexadas a este informe y listadas abajo, ya que se ha considerado que iban más allá de la divulgación de la invención tal como fue presentada, como se indica en el Recuadro Suplementario (Regla 70.2(c)).
- ☐ la descripción, páginas
☐ las reivindicaciones, Nos.
☐ los dibujos, hojas/fig.
☐ la lista de secuencias (especificar):
☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

* Si se utiliza el punto 4, algunas o todas estas páginas pueden llevar el sello de "sustituida".

Recuadro No. V Declaración razonada según el Artículo 35 (2) con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial: anterioridades y explicaciones que soportan tal declaración

1. Declaración

Novedad (N)	Si:	Reivindicaciones 6 7 9 10 11 13 14
		15
	No:	Reivindicaciones 1-5 8 12
Nivel Inventivo (IS)	Si:	Reivindicaciones
	No:	Reivindicaciones 1-15
Aplicación Industrial (IA)	Si:	Reivindicaciones 1-15
	No:	Reivindicaciones

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7)

ver hoja separada.

128
126

Recuadro suplementario relativo a listas de secuencias

Continuación del Recuadro 1, punto 2:

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido sobre la base de:

a. tipo de material

- ☒ una lista de secuencias
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias

b. formato del material

- ☒ por escrito
- ☒ en soporte legible por ordenador

c. fecha de presentación/entrega

- ☒ contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó
- ☒ presentado junto con la solicitud internacional en formato legible por ordenador
- ☐ presentado posteriormente a esta Administración a los fines de búsqueda y/o examen
- ☐ recibido como modificación, por esta Administración en fecha _____

2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla(s) relacionada(s) con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales, si se requiere:

129
127

Ítem II

El documento de prioridad no estaba disponible en la Oficina de Patentes Europea en el momento y la validez de la prioridad no pudo verificarse. El siguiente razonamiento debe estar por escrito asumiendo que la prioridad es válida.

Ítem V

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

Se hace referencia al siguiente documento:

D1: DATABASE UNIPROTKB/TREMBL embl; db_xref
UniProtKB/TrEMBL:Q9PZ71 1 Mayo 2000, YOO, D., CARMAN, S: "ORF2b
PRRSV" XP002374565

Novedad

La presente solicitud no cumple con los criterios establecidos en el Artículo 33(1) del PCT, puesto que la materia de las reivindicaciones 1-5, 8, 12 no es novedosa a la luz del Artículo 33(2) del PCT.

D3 divulga la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificada por par ORF2b a partir de una cepa del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) : MGSMQSLFDK IGQLFVDAFT EFLVSIVDII IFLAILFGFT IAGWLVVFCI RLVYSAILRT RPAIHSEQLQ KIL. El aminoácido 54 es un residuo de tirosina. Por lo tanto, se conoce un virus PRRSV norteamericano modificado a partir del cual el residuo de cisteína C54 conservado en la proteína E codificado por ORF2b es reemplazado por tirosina.

La presente solicitud no cumple con los criterios del Artículo 33(1) del PCT, puesto que la materia de las reivindicaciones 1 a 5, 8 y 12 no es novedosa a la luz del Artículo 33(2) del PCT.

La materia de las reivindicaciones 6, 7, 9-11, 13-15 parece novedosa a la luz del Artículo 33(2) del PCT.

Nivel Inventivo

Solo se puede reconocer actividad inventiva para la materia que aparezca soportada y suficientemente divulgada en la descripción (Artículos 5 y 6 del PCT).

La descripción subyacente divulga en el ejemplo 2 la sustitución del residuo de cisteína 54 en la proteína E (ó 2b) del Virus Norteamericano del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV-NA) P129 para generar el virus P129-E-C54S. El

ejemplo 3 describe varias mutaciones del residuo de cisteína 54 en serina resumidas en la Tabla F.

Al transfectarse en células Marc-145, el clon mutante P129-E-C54S C54S indujo un efecto citopático distinto y demostró un fenotipo de placa-pequeña relativo al virus P129 parental (página 14 líneas 18-32, Figura 2). La descripción indica (página 14, línea 32 hasta la página 15 línea 2): "Aunque pueden existir varias explicaciones biológicas para el fenotipo de placa-pequeña, la observación de placas pequeñas es una evidencia directa que el P129-E-C54S se está regando de célula en célula de manera más lenta en comparación a su ascendencia. Esta característica puede utilizarse en el actual invento para generar un virus de vacuna vivo atenuado (menos virulento) a partir de un virus parental virulento."

El ejemplo 4 está describiendo solamente una metodología y no se proporciona dato alguno. La naturaleza de la atenuación del mutante P129-E-C54S solo se postula y el uso como vacuna es puramente especulativo. Las sustituciones por otro aminoácido, particularmente la treonina, metionina y tirosina, o por un virus europeo PRRS no han sido realizadas.

Las reivindicaciones 1-15 no han sido soportadas por la descripción tal como lo requiere el Artículo 6 del PCT, puesto que su alcance es más amplio que lo justificado por la descripción y los dibujos. Por lo tanto las razones se exponen a continuación:

El alcance de las reivindicaciones 1-9 parece excesivo a la luz de la contribución al estado de la técnica: la descripción (ejemplos 2 y 3) dan la impresión que el efecto técnico solo puede llevarse a cabo de una manera en particular, a saber por la sustitución del residuo de cisteína 54 en la proteína E (ó 2b) del Virus Norteamericano del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV-NA). La materia de las reivindicaciones 1 a 9 solamente es divulgada y soportada de manera suficiente mediante una descripción que abre posibilidades en cuanto a relacionarse con un virus PRRS-NA en donde la cisteína conservadora en la posición 54 de la proteína E ha sido sustituida por serina (Artículos 5 y 6 del PCT). La materia que se relaciona con otros virus PRRS modificados es especulativa.

Ídem, la materia de las reivindicaciones 10 y 11 es puramente especulativa puesto que no ha sido demostrado en la descripción (Artículo 6 del PCT) que sea adecuado resolver el problema y sí lo hace, cómo lograr el efecto.

Ninguna actividad inventiva a la luz del Artículo 33 del PCT podría reconocerse para tal materia especulativa.

Adicionalmente, la descripción es bastante general y simplemente recuerda procedimientos estándares. A seguir concierne materia obvia para el experto en el estado de la técnica a la luz del Artículo 33 del PCT. Si fuera argumentado que por cualquier razón, la materia especulativa de las reivindicaciones 1-15 no fuera obvia porque requeriría adaptaciones particulares sobre lo que sería obvio para el experto, entonces habría una falta de divulgación (Artículo 6 del PCT) puesto que dicha adaptación no está descrita en la solicitud.

La presente solicitud no cumple con los requisitos establecidos en el Artículo 33(1) del PCT, puesto que la materia de las reivindicaciones 1-15 no es novedosa y/o no posee nivel inventivo a la luz de los Artículos 33(2) y (3) del PCT.

130
128

La materia de las reivindicaciones 1 a 9, 12 y 13-15, en lo que se relaciona con un virus PRRS-NA en donde la Cisteína conservadora en la posición 54 de la proteína E ha sido sustituida por Serina, parece estar soportada, y parece novedosa y poseer nivel inventivo en vista del estado de la técnica anterior si la prioridad es considerada válida.

131
129

132
130

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL – HOJA ANEXA
Solicitud Internacional No. PCT/IB2005/003366

Ítem II

El documento de prioridad no estaba disponible en la Oficina de Patentes Europea en el momento y la validez de la prioridad no pudo verificarse. El siguiente razonamiento debe estar por escrito asumiendo que la prioridad es válida.

Ítem V

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

Se hace referencia al siguiente documento:

DI: DATABASE UNIPROTKB/TREMBL embi; db_xref
UniProtKB/TrEMBL:Q9PZ71 1 Mayo 2000, YOO, D., CARMAN, S: "ORF2b
PRRSV" XP002374565

Novedad

La presente solicitud no cumple con los criterios establecidos en el Artículo 33(1) del PCT, puesto que la materia de las reivindicaciones 1-5, 8, 12 no es novedosa a la luz del Artículo 33(2) del PCT.

D3 divulga la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificada por par ORF2b a partir de una cepa del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) : MGSMQSLFDK IGQLFVDAFT EFLVSIVDII IFLAILFGFT IAGWLVVFCI RLVYSAILRT RPAIHSEQLQ KIL. El aminoácido 54 es un residuo de tirosina. Por lo tanto, se conoce un virus PRRSV norteamericano modificado a partir del cual el residuo de cisteína C54 conservado en la proteína E codificado por ORF2b es reemplazado por tirosina.

La presente solicitud no cumple con los criterios del Artículo 33(1) del PCT, puesto que la materia de las reivindicaciones 1 a 5, 8 y 12 no es novedosa a la luz del Artículo 33(2) del PCT.

La materia de las reivindicaciones 6, 7, 9-11, 13-15 parece novedosa a la luz del Artículo 33(2) del PCT.

Nivel Inventivo

Solo se puede reconocer actividad inventiva para la materia que aparezca soportada y suficientemente divulgada en la descripción (Artículos 5 y 6 del PCT).

La descripción subyacente divulga en el ejemplo 2 la sustitución del residuo de cisteína 54 en la proteína E (ó 2b) del Virus Norteamericano del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV-NA) P129 para generar el virus P129-E-C54S. El

ejemplo 3 describe varias mutaciones del residuo de cisteína 54 en serina resumidas en la Tabla F.

Al transfectarse en células Marc-145, el clon mutante P129-E-C54S C54S indujo un efecto citopático distinto y demostró un fenotipo de placa-pequeña relativo al virus P129 parental (página 14 líneas 18-32, Figura 2). La descripción indica (página 14, línea 32 hasta la página 15 línea 2): "Aunque pueden existir varias explicaciones biológicas para el fenotipo de placa-pequeña, la observación de placas pequeñas es una evidencia directa que el P129-E-C54S se está regando de célula en célula de manera más lenta en comparación a su ascendencia. Esta característica puede utilizarse en el actual invento para generar un virus de vacuna vivo atenuado (menos virulento) a partir de un virus parental virulento."

El ejemplo 4 está describiendo solamente una metodología y no se proporciona dato alguno. La naturaleza de la atenuación del mutante P129-E-C54S solo se postula y el uso como vacuna es puramente especulativo. Las sustituciones por otro aminoácido, particularmente la treonina, metionina y tirosina, o por un virus europeo PRRS no han sido realizadas.

Las reivindicaciones 1-15 no han sido soportadas por la descripción tal como lo requiere el Artículo 6 del PCT, puesto que su alcance es más amplio que lo justificado por la descripción y los dibujos. Por lo tanto las razones se exponen a continuación:

El alcance de las reivindicaciones 1-9 parece excesivo a la luz de la contribución al estado de la técnica: la descripción (ejemplos 2 y 3) dan la impresión que el efecto técnico solo puede llevarse a cabo de una manera en particular, a saber por la sustitución del residuo de cisteína 54 en la proteína E (ó 2b) del Virus Norteamericano del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV-NA). La materia de las reivindicaciones 1 a 9 solamente es divulgada y soportada de manera suficiente mediante una descripción que abre posibilidades en cuanto a relacionarse con un virus PRRS-NA en donde la cisteína conservadora en la posición 54 de la proteína E ha sido sustituida por serina (Artículos 5 y 6 del PCT). La materia que se relaciona con otros virus PRRS modificados es especulativa.

Ídem, la materia de las reivindicaciones 10 y 11 es puramente especulativa puesto que no ha sido demostrado en la descripción (Artículo 6 del PCT) que sea adecuado resolver el problema y si lo hace, cómo lograr el efecto.

Ninguna actividad inventiva a la luz del Artículo 33 del PCT podría reconocerse para tal materia especulativa.

Adicionalmente, la descripción es bastante general y simplemente recuerda procedimientos estándares. A seguir concierne materia obvia para el experto en el estado de la técnica a la luz del Artículo 33 del PCT. Si fuera argumentado que por cualquier razón, la materia especulativa de las reivindicaciones 1-15 no fuera obvia porque requeriría adaptaciones particulares sobre lo que sería obvio para el experto, entonces habría una falta de divulgación (Artículo 6 del PCT) puesto que dicha adaptación no está descrita en la solicitud.

La presente solicitud no cumple con los requisitos establecidos en el Artículo 33(1) del PCT, puesto que la materia de las reivindicaciones 1-15 no es novedosa y/o no posee nivel inventivo a la luz de los Artículos 33(2) y (3) del PCT.

134
151

La materia de las reivindicaciones 1 a 9, 12 y 13-15, en lo que se relaciona con un virus PRRS-NA en donde la Cisteína conservadora en la posición 54 de la proteína E ha sido sustituida por Serina, parece estar soportada, y parece novedosa y poseer nivel inventivo en vista del estado de la técnica anterior si la prioridad es considerada válida.

PATENT COOPERATION TREATY

07/69
13 9
25

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (PCT Rule 71.1)

To:

FULLER, Grover, F., Jr.,
Pfizer Inc.
201 Tabor Road
Morris Plains, NJ 07950
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)	04.10.2006
-------------------------------------	------------

Applicant's or agent's file reference PC32633A	IMPORTANT NOTIFICATION
--	-------------------------------

International application No. PCT/IB2005/003366	International filing date (day/month/year) 02.11.2005	Priority date (day/month/year) 11.11.2004
---	---	---

Applicant PFIZER PRODUCTS INC. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. **REMINDER**

 The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

 Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

 For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

 The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed invention is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tlx 31 651 epo nl Fax +31 70 340 - 3016	Authorized Officer Wallentin, Marko Tel. +31 70 340-3991
---	---



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

136
13A

Applicant's or agent's file reference PC32633A		FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA/416	
International application No. PCT/IB2005/003366		International filing date (day/month/year) 02.11.2005	Priority date (day/month/year) 11.11.2004
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C12N15/40 C12N7/04 A61K39/00 C07K14/18 A61K39/12 C12N15/86			
Applicant PFIZER PRODUCTS INC. et al.			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (Indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 26.01.2006		Date of completion of this report 04.10.2006	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016		Authorized officer CHAMBONNET, F Telephone No. +31 70 340- 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REP RT
ON PATENTABILITY**

13^x 135
International application No.
PCT/IB2005/003366

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-22 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-6 as originally filed

Claims, Numbers

1-15 as originally filed

Drawings, Figures

1-3 as originally filed

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

139 136

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2005/003366

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	6 7 9 10 11 13 14 15
	No: Claims	1-5 8 12
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-15
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-15
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

139 137

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2005/003366

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report has been established on the basis of:

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ in written format
- ☒ in computer readable form

c. time of filing/furnishing:

- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
- ☐ received by this Authority as an amendment on

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional observations, if necessary:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

140
14138
International application No.

PCT/IB2005/003366

Re Item II

The priority document was not available in the EPO at this time and the validity of the priority cannot be checked. The following reasoning has been written assuming the priority is valid.

Re Item V

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

Reference is made to the following document

D1: DATABASE UNIPROT/KB/TREMBL embi; db_xref UniProtKB/TrEMBL:Q9PZ71 1
May 2000 (2000-05-01), YOO,D., CARMAN,S: "ORF2b PRRSV" XP002374565

Novelty

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-5, 8, 12 are not new in the sense of Article 33(2) PCT.

D3 discloses the amino acid sequence of the proteins encoded par ORF2b from an Ontario strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) :
MGSMQSLFDK IGQLFVDAFT EFLVSIVDII IFLAILFGFT IAGWLVVFCI RLVYSAILRT
RPAIHSEQLQ KIL. The amino acid 54 is a tyrosine residue. Hence, an infectious North American modified PRRSV virus from which the conserved cysteine residue C54 in the protein E encoded by ORF2b is replaced by tyrosine is known.

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1 to 5, 8 and 12 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

The subject-matter of claims 6, 7, 9-11, 13-15 appears novel in the sense of Article 33(2) PCT.

Inventive step

Inventive activity can only be acknowledged for the subject matter that appears supported and sufficiently disclosed in the description (Articles 5 and 6 PCT).

The underlying description discloses in example 2 the substitution of Cysteine residue 54 in protein E (or 2b) of North American Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-NA) P129 to generate P129-E-C54S virus. Example 3 describes several mutations of cysteine residue 54 in serine summarized in Table F.

When transfected into Marc-145 cells, the P129-E-C54S C54S mutant clone induced a distinct cytopathic effect and displayed a small-plaque phenotype relative to P129 parental virus (page 14 lines 18- 32, Figure 2). The description indicates (page 14, line 32 to page 15 line 2) : " Although there can be a number of biological explanations for a small-plaque phenotype, the observation of small plaques is a direct evidence that the P129-E-C54S is spreading from cell to cell more slowly than its parent. This characteristic can be used in the current invention to generate an attenuated (less virulent) live vaccine virus from a virulent parent virus."

Example 4 is only describing a methodology and no data are provided. The character of attenuation of the mutant P129-E-C54S is only postulated and the use as a vaccine is purely speculative. Substitutions by another amino acid, in particular Threonine, Methionine and Tyrosine, or for a European PRRS virus, has not been done.

Claims 1-15 are not supported by the description as required by Article 6 PCT, as their scope is broader than justified by the description and drawings. The reasons therefor are the following:

The scope of claims 1-9 seems excessive in the light of contribution to the art : the description (examples 2 and 3) convey the impression that the technical effect can only be carried out in a particular way, namely by the substitution of Cysteine residue 54 in protein E (or 2b) of North American Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-NA). The subject-matter of claims 1 to 9 is only sufficiently disclosed and supported by an enabling description as far as pertaining to a North American PRRS virus wherein the conservative Cysteine in position 54 of the protein E has been substituted by Serine (Articles 5 and 6 PCT). The subject-matter pertaining to other modified PRRS virus is speculative.

Idem, the subject matter of claims 10 and 11 is purely speculative because it has not been

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

142
120
International application No.

PCT/IB2005/003366

shown in the description (Art. 6 PCT) that it is suitable to solve the problem and if it does, how to achieve the effect.

No inventive activity in the sense of Article 33 PCT may be acknowledged for such a speculative subject matter.

Moreover, the description is fairly vague and simply recalls standard procedures. It follows that it concerns subject-matter obvious to the skilled artisan in the sense of Article 33 PCT. If it were argued that, for whatever reason, the speculative subject matter of claims 1-15 is not obvious because it requires particular adaptations over what would be obvious to the skilled artisan, then there is lack of disclosure (Art. 6 PCT) because said adaptation is not described in the application.

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-15 is not new and/or does not involve an inventive step in the sense of Articles 33 (2) and (3) PCT.

The subject matter of claims 1 to 9, 12 and 13-15, as far as it pertains to a North American PRRS virus wherein the conservative Cysteine in position 54 of the protein E has been substituted by Serine, appears supported, novel and inventive in view of the prior state of art if the priority will be deemed to be valid .

Frédérique Chambonnet

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

[X]

MODELO DE UTILIDAD

[]

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

COMPLETA [X]

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
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

144

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 142

2020
Bogotá D.C.,

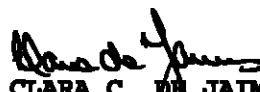
Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER PRODUCTS INC.

REFERENCIA	Radicación No.	07 46274
	Solicitud internacional	PCT/IB2005/003366
	Fecha inicio fase nacional	11/06/2007
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	3334
	Folios	1

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

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

13 JUL. 2007


CLARA C. DE JAIMES
Jefe de la División de Nuevas Creaciones (E)

adpa11