



Organizacion CSA Ltda

OK  
DCF

**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**

**07-86498**

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL  
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

**PCT**

SOLICITUD DE PATENTE DE  
INVENCION

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**  
**INVENTARIO**

TITULO: MUTANTES DE LA PROTEINA N DEL VIRUS DEL SINDROME  
REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO DE LOS PORCINOS

SOLICITANTE: PFIZER PRODUCTS INC.

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

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 23 de Agosto de 2007

P2007/000131



No. 07-086498- -00000-0000

Fecha: 2007-08-23 16:14:06 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 120

**PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD  
PATENTE PCT**

**ENTRADA EN FASE NACIONAL**

**P2007/0000131**

**SOLICITUD DE:**

25/01/2007

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE  
(71)**

**Nombre:** PFIZER PRODUCTS INC

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

**Nacionalidad o Domicilio:** ESTADOUNIDENSE

**Lugar de Constitución:** Delaware, Estados  
Unidos de América.

**Teléfono:** \_\_\_\_\_

**Fax:** \_\_\_\_\_

**E-mail:** \_\_\_\_\_

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual \_\_\_\_\_

**Número** \_\_\_\_\_

**REPRESENTANTE  
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 74.295

**INVENTOR (ES)  
(72)**

**Nombre:** VER PAGINA ADJUNTA

**Dirección:** VER PAGINA ADJUNTA

**Nacionalidad o Domicilio:** VER PAGINA ADJUNTA

5

**PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/IB2006/000376

Fecha

Febrero 13, 2006

Publicación Internacional No. WO 2006/129139

Fecha

Diciembre 7, 2006

6

**Título (54) MUTANTES DE LA PROTEINA N DEL VIRUS DEL SINDROME  
REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO DE LOS PORCINOS**

**Clasificación Internacional (51)** C07K 14/08, C12N 7/00, C12N 7/04, A61K 39/12.

**Prioridad**

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Febrero 25, 2005

Octubre 27, 2005

(31) Número de Solicitud

60/656.523

60/730.663

9

**Comprobante de pago No.** 07 - 63.792

**Fecha**

8 de Agosto de 2007

10

ANEXOS

x

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.

x

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

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

Declaraciones.

x

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

x

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

x

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.

x

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

x

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

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

## LISTA DE INVENTORES PCT/IB2006/000376

**Dongwan YOO,**  
Ramsgate Road, Sandwich,  
Kent CT13 9NJ  
Gran Bretaña  
Nacionalidad: Canadiense

**Changhee LEE,**  
Ramsgate Road, Sandwich,  
Kent CT13 9NJ  
Gran Bretaña  
Nacionalidad: Koreana

**Jay Gregory CALVERT,**  
301 Henrietta Street,  
Kalamazoo, MI 49001  
Estados Unidos de América  
Nacionalidad: Estadounidense

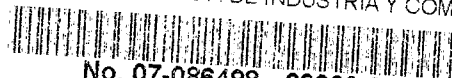
**Siao-Kun WELCH,**  
301 Henrietta Street,  
Kalamazoo, MI 49001  
Estados Unidos de América  
Nacionalidad: Estadounidense

4

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 7 - 63.792  
FECHA : AGOSTO 8 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-086498-00000-0000

Fecha: 2007-08-23 16:14:06 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 120

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE    | TIPO PAGO    | BANCO         | CUENTA      | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO     |
|----------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|--------------|
| OLARTE RAISBEK | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-6 | 68289256 | 08/08/2007 | 3,856,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

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

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

5

**TRADUCCION OFICIAL No. 05-223**

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

---

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

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

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

(Fdo.) Susan Z. Killian

  
**SERGIO ANDRES RUEDA IGLESIAS**  
C. C. 22-2  
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL  
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL  
RESOLUCIÓN 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 ANDRES RUEDA IGLESIAS**  
C. C. B. 1.773  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
ESPAÑOL - INGLES / INGLES - ESPAÑOL  
RESOLUCIÓN No. 0138 DE FEBRERO 11, 2002  
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

7

APOSTILLA

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

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

Es traducción fiel y completa efectuada por:

  
Sergio Andrés Rueda Iglesias  
c.c. 80.424.773 de Bogotá

**SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS**  
C. C. 80.424.773  
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL  
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL  
RESOLUCIÓN No. 0138 DE FEBRERO 11, 2002  
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

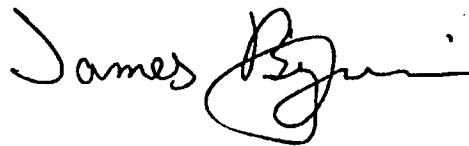
# Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

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

## Certified

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



---

James 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 Mendoza  
Camilo Rodríguez  
Santiago Pardo

Of Counsel  
Guillermo Chahín  
Graciela Melo

**Power of Attorney**

**Poder**

The undersigned,

El suscrito,

**PFIZER PRODUCTS INC.,**

domiciled in

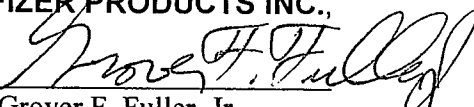
domiciliado en

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

10

**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 42<sup>nd</sup> Street  
City New York  
State New York 10017-5612 USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

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

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

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

4. Que con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se 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. 01K16116521  
Qualified in New York County  
Commission Expires October 4, 2008

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
7 December 2006 (07.12.2006)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2006/129139 A1**

(51) International Patent Classification:

C07K 14/08 (2006.01) C12N 7/04 (2006.01)  
C12N 7/00 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)

Siao-Kun [US/US]; Pharmacia & Upjohn Company LLC,  
301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US).

(21) International Application Number:

PCT/IB2006/000376

(74) Agents: **GROVER, Fuller, F. et al.**; Pfizer Global Research and Development, Ramsgate Road, Sandwich, Kent CT13 9NJ (GB).

(22) International Filing Date:

13 February 2006 (13.02.2006)

(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, HR, HU, 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, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/656,523 25 February 2005 (25.02.2005) US  
60/730,663 27 October 2005 (27.10.2005) US

(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).

(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, Dongwan** [CA/CA]; c/o Pfizer Limited, European Pharma Patent Department, Ramsgate Road, Sandwich, Kent CT13 9NJ (GB). **LEE, Changhee** [KR/CA]; c/o Pfizer Limited, European Pharma Patent Department, Ramsgate Road, Sandwich, Kent CT13 9NJ (GB). **CALVERT, Jay, Gregory** [US/US]; Pharmacia & Upjohn Company LLC, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US). **WELCH,**

Published:

— with international search report

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

(54) Title: N PROTEIN MUTANTS OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS

(57) Abstract: The present invention provides a genetically modified PRRS virus and polynucleotides which encode it. Vaccines comprising the genetically modified virus and polynucleotides are also provided.

WO 2006/129139 A1

12

## N Protein Mutants of 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  
15 considered one of the most economically important diseases affecting 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  
20 attenuated by serial passage in cell culture until virulence is lost. Modified live vaccines elicit broader protection 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  
25 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

Figure 1. (A) Drawing showing position and sequence of the NLS mutation within the P129 nucleocapsid protein. (B) Photomicrographs of mock infected, P129  
30 infected, and P129-GG infected MARK-145 cells. Upper row shows typical plaques using phase contrast microscopy, while lower row shows fluorescent antibody staining of infected foci using FITC-conjugated monoclonal antibody SDOW17. Note the absence of nucleocapsid staining in the nuclei and nucleoli of cells infected with P129-GG.

**Figure 2.** (A) Number of pigs viremic on days 0 through 28 post infection by treatment groups (7 pigs per group). (B) Mean viral titer in the sera of pigs at days 0 through 28 post infection, by treatment group. (C) Mean ELISA antibody levels (S/P ratios) in the sera of pigs at days 0 through 28 post infection, by treatment group (D) a re-titration of the sera shown in Figure 2C all samples were diluted 1:5 prior to assay in order to better distinguish differences in samples with high titers. (E) Mean serum neutralization titers in infected pigs during the four-week study

#### **Brief Description of the Sequences**

- SEQ ID NO: 1** N protein residues 41-47 of the North American PRRSV isolate VR2332
- SEQ ID NO: 2** VR2332 NoLS region sequence
- SEQ ID NO: 3** Lelystad NoLS region sequence
- SEQ ID NO: 4** The NES region of the VR2332 isolate
- SEQ ID NO: 5** The NES region of the Lelystad isolate
- SEQ ID NO: 6** Amino acid sequence of N protein from P129 isolate
- SEQ ID NO: 7** Nucleotide sequence of ORF 7 (encodes the N protein) from P129 isolate
- SEQ ID NO: 8** Primer P SHUTTLE FWD
- SEQ ID NO: 9** Primer P-SHUTTLE-REV
- SEQ ID NO: 10** Mutagenic primer KK43/44GG-Fwd
- SEQ ID NO: 11** Mutagenic primer KK43/44GG-REV
- SEQ ID NO: 12** Table 8 deletion mutants. Amino acid sequence of NLS2 region of wt P129:
- SEQ ID NO: 13** Table 8 deletion mutants. Nucleotide sequence of NLS2 region of wt P129
- SEQ ID NO: 14** Table 8 deletion mutants. Amino acid sequence of NLS2 region of P129-GG:
- SEQ ID NO: 15** Table 8 deletion mutants. Nucleotide sequence of NLS2 region of P129-GG:
- SEQ ID NO: 16** Table 8 deletion mutants. Amino acid sequence of NLS2 region of P129-d43/44:
- SEQ ID NO: 17** Table 8 deletion mutants. Nucleotide sequence of NLS2 region of P129-d43/44:

14

**SEQ ID NO: 18** Table 8 deletion mutants. Amino acid sequence of NLS2 region of P129-d43/44/46:

**SEQ ID NO: 19** Table 8 deletion mutants. Nucleotide sequence of NLS2 region of P129-d43/44/46:

5 **SEQ ID NO: 20** Table 8 deletion mutants. Amino acid sequence of NLS2 region of P129-d44/46/47:

**SEQ ID NO: 21** Table 8 deletion mutants. Nucleotide sequence of NLS2 region of P129-d44/46/47:

10 **SEQ ID NO: 22** Table 8 deletion mutants. Amino acid sequence of NLS2 region of P129-d46/47/48:

**SEQ ID NO: 23** Table 8 deletion mutants. Nucleotide sequence of NLS2 region of P129-d46/47/48

**SEQ ID NO: 24** P129-d43/44F

**SEQ ID NO: 25** P129-d43/44/46F

15 **SEQ ID NO: 26** P129-d44/46/47F

**SEQ ID NO: 27** P129-d46/47/48F

**SEQ ID NO: 28** P129-d43/44R

**SEQ ID NO: 29** P129-d43/44/46R

**SEQ ID NO: 30** P129-d44/46/47R

20 **SEQ ID NO: 31** P129-d46/47/48R

#### References Cited

- Doan, D. N. P., and Dokland, T. (2003). Structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Structure* 11(11), 1445-1451.
- 25 Lee, C., Calvert, J. G., Welch, S.-K. W., and Yoo, D. (2005). A DNA-launched reverse genetics system for porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals that homodimerization of the nucleocapsid protein is essential for virus infectivity. *Virology* 331, 47-62.
- Rowland, R. R., Kervin, R., Kuckleburg, C., Sperlich, A., and Benfield, D. A. (1999).
- 30 The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus Research* 64(1), 1-12.

- Rowland, R. R. R., Schneider, P., Fang, Y., Wootton, S., Yoo, D., and Benfield, D. A. (2003). Peptide domains involved in the localization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus. *Virology* 316(1), 135-145.
- 5 Rowland, R. R. R., and Yoo, D. (2003). Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences. *Virus Research* 95(1-2), 23-33.
- Wootton, S. K., Rowland, R. R. R., and Yoo, D. (2002). Phosphorylation of the  
10 porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein. *Journal of Virology* 76(20), 10569-10576.
- Wootton, S. K., and Yoo, D. (2003). Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages. *Journal of Virology* 77(8), 4546-4557.
- 15 Yoo, D., Wootton, S. K., Li, G., Song, C., and Rowland, R. R. (2003). Colocalization and interaction of the porcine arterivirus nucleocapsid protein with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *Journal of Virology* 77(22), 12173-12183.
- Yoo, D., Welch, S.-K. W., Lee, C., and Calvert, J. G. (2004). Infectious clones of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their potential as vaccine  
20 vectors. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, 143-154.

#### Summary of the Invention

The invention provides a genetically modified PRRS virus which has been modified within the NLS-2 region, NoLS region, and/or the NES region of the nucleocapsid (N) protein such that the resultant PRRS virus is attenuated. The subject  
25 invention further provides an infectious RNA molecule encoding the genetically modified virus and an isolated polynucleotide molecule comprising a DNA sequence encoding the infectious RNA molecule recited above.

The invention also provides a biologically pure culture of the viruses recited (i.e substantially free of other viruses) and it describes a viral vector comprising a DNA  
30 sequence encoding an infectious RNA molecule encoding a genetically modified PRRS virus as recited above.

The subject invention further provides a transfected host cell comprising any of the forgoing 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 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.

The invention further provides for reversion-resistant mutations of NLS-2. Preferred embodiments of the invention, especially for vaccine purposes, will contain additional nucleotide substitutions and/or deletions, designed to minimize the probability of reversion, and to minimize the probability of other flanking residues mutating to basic residues such as lysine and arginine and thereby restoring a functional NLS motif in the region.

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 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 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.

17

### Detailed Description of the Invention

We disclose herein a method of attenuating a virulent PRRS virus by mutating or deleting the NLS-2 region, NoLS region, or the NES region in the nucleocapsid or N protein (encoded by ORF7) 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.

The nucleocapsid protein (N) of PRRSV, which is encoded by ORF7, is a small basic protein that is phosphorylated (Wootton, Rowland, and Yoo, 2002) and forms homodimers (Wootton and Yoo, 2003). The crystal structure has recently been determined (Doan and Dokland, 2003). The N protein appears to have multiple functions in the infected cell. In addition to forming a spherical capsid structure into which genomic RNA is packaged, a process that takes place in the cytoplasm, a portion of N protein is transported into the nucleus and specifically to the nucleolus of the infected cell. The amino acid sequence of N protein contains two nuclear localization signals (NLS), a nucleolar localization signal (NoLS), and a nuclear export signal (NES) that facilitate transport into the nucleus and nucleolus, and export from the nucleus, respectively (Rowland et al., 1999; Rowland et al., 2003; Rowland and Yoo, 2003). While in the nucleolus, the N protein interacts with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin and may regulate rRNA processing and ribosome biogenesis in the infected cell in order to favor virus replication (Yoo et al., 2003). In the current invention, we show that mutations and deletions within the NLS, NoLS, and NES motifs of the N protein can result in viable viruses with aberrant nuclear trafficking, and that viruses containing such mutations are useful as vaccines against PRRS.

Viral mutations of this type are valuable, either alone or in combination with other attenuating mutations, for designing novel PRRS vaccines.

### Definitions

"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

13

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.

A genetically modified PRRS virus is "attenuated" if it is less virulent than its unmodified parental strain. A strain is "less virulent" if it shows a statistically significant decrease in one or more parameters determining disease severity. Such parameters may include level of viremia, fever, severity of respiratory distress, severity of reproductive symptoms, or number or severity of lung lesions, etc..

"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".

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

"Host cell capable of supporting PRRS virus replication" means a cell line which is capable of generating infectious PRRS when infected with a virus 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, and cells transfected with a receptor for the PRRS virus. 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.

14

**"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.

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

15       **"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.

**"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

20       **"PRRS virus"**, as used herein, unless otherwise indicated, means any strain of either the North American or European PRRS viruses.

**"PRRS"** encompasses disease symptoms in swine caused by a PRRS virus infection. Examples of such symptoms include, but are not limited to, fever, abortion in pregnant females, respiratory distress, lung lesions, 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 does not produce any disease symptoms normally associated with a PRRS infection in the pig.

**PRRSV "N protein"** or **"ORF7"** as used herein is defined as a polypeptide that is encoded by ORF7 of both the European and North American genotypes of PRRS virus. Examples of specific isotypes of N protein which are currently known are the 123 amino acid polypeptide of the North American PRRS prototype isolate VR2322 reported in Genbank by Accession numbers PRU87392, and the 128 residue

20

N protein of European prototype PRRS isolate Lelystad reported in Genbank  
Accession number A26843.

**“PRRSV N protein NLS-1 region” or “PRRSV ORF7 NLS-1 region”**  
refers to a “pat4” or “nuc1” nuclear localization signal (Nakai & Kanehisa, 1992;  
5 Rowland & Yoo, 2003) containing four continuous basic amino acids (lysine or  
arginine), or three basic residues and a histidine or proline, located within about the  
first 15 N-terminal residues of the mature N protein. By way of example the VR2332  
NLS-1 region sequence is KRKK and is located at residues 9-12, while the Lelystad  
isolate sequence is KKKK and is located at residues 10-13 of the N protein.

10 **“PRRSV N protein NLS-2 region” or “PRRSV ORF7 NLS-2 region”**  
refers to a second nuclear localization signal within the N protein that can take one of  
two forms. In North American PRRS viruses NLS-2 has a pattern which we have  
designated as the “pat8” motif, which begins with a proline followed within three  
residues by a five residue sequence containing at least three basic residues (K or R) out  
15 of five (a slight modification of the “pat7” or “nuc2” motif described by Nakai &  
Kanehisa, 1992; Rowland & Yoo, 2003). By way of example such a sequence is  
located at N protein residues 41-47 of the North American PRRSV isolate VR2332,  
and is represented by the sequence PGKKNKKK (SEQ ID NO: 1). In European  
PRRS viruses NLS-2 has a “pat4” or “nuc1” motif, which is a continuous stretch of  
20 four basic amino acids or three basic residues associated with histidine or proline  
(Nakai & Kanehisa, 1992; Rowland & Yoo, 2003). The NLS-2 of the European  
PRRSV isolate Lelystad is located at residues 47-50 and is represented by the  
sequence KKKK.

**“PRRSV N protein NoLS region” or “PRRSV ORF7 NoLS region”** refers  
25 to a nucleolar localization signal having a total length of about 32 amino acids and  
incorporating the NLS-2 region near its amino terminus. By way of example the  
VR2332 NoLS region sequence is located at residues 41-72 and is represented by the  
sequence PGKKNKKKNPEKPHFPLATEDDVRHHFTPSE (SEQ ID NO: 2)  
(Rowland & Yoo, 2003) and the corresponding Lelystad isolate sequence is located at  
30 residues 42-73 and is represented by the sequence  
PRGGQAKKKKPEKPHFPLAAEDDIRHHLTQTER (SEQ ID NO: 3).

**“PRRSV N protein NES region” or “PRRSV ORF7 NES region”** refers to  
a nuclear export signal containing an LXL motif located near the carboxy terminal end

of the N protein. The NES motif is X-R(2-5)-X-R2-X-R-Y where X is either leucine, isoleucine, or valine, Y either leucine, isoleucine, valine or alanine and R is any amino acid. As shown below the prototype North American and European isolates conform to this scheme with both having a 5-residue spacer.

5        **"Transfected host cell"** means practically any host cell which as described in US Patent 5,600,662 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.

10        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. 15 Meulenberg et al., Adv. Exp. Med. Biol, 1998, 440:199-206).

20        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 capable of expressing 25 the encoded virus in a suitable host cell in vitro, as is described in further detail below.

The North American PRRSV N protein sequences are highly conserved and the reported sequences have about 93-100% identity with each other. The North American and European PRRSV N proteins are about 57-59% identical and share common structural motifs.

30        By way of example the VR2332 NES region sequence is located at residues 106-117 and is represented by the sequence LPTHHTVRLIRV (SEQ ID NO: 4) (Rowland & Yoo, 2003) and the Lelystad isolate sequence is located at residues 107-118 and is represented by the sequence LPVAHTVRLIRV (SEQ ID NO: 5).

22

In the consensus below, which includes all sequences in North American PRRSV sequences in Genbank, the positions with a (\*) are completely conserved. Alternative amino acids are shown under each position.

5 LPTHTVRLIRV (SEQ ID NO: 4)  
 \*\*VAQ\*\*\*\*\*A  
     Q  
     V  
     G

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 regions are 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 modify a PRRS virus or its encoding nucleic acids such that one or more conserved regions are eliminated either by substitution, deletion, or insertion such that it results in an attenuated phenotype.

Deletions, insertions, or substitutions which eliminate the conserved NLS-2 motif, the NoLS region, or the NES motif are introduced by modification of polynucleotides in the encoding viruses of the invention. In a preferred embodiment, a deletion or insertion comprising 1,2,3,4 or 5 amino acids results in the elimination of a conserved motif and results in an attenuated virus

**Amino acids can be classified according to physical properties and contribution to 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 1 (from WO 97/09433, page 10, published March 13, 1997 (PCT/GB96/02197, filed 9/6/96)), immediately below. Table 1**  
**Conservative Substitutions I**

| SIDE CHAIN |                   |            |
|------------|-------------------|------------|
|            | CHARACTERISTIC    | AMINO ACID |
| 30         | Aliphatic         |            |
|            | Non-polar         | G A P      |
|            |                   | I L V      |
|            | Polar - uncharged | C S T M    |
| 35         |                   | N Q        |
|            | Polar - charged   | D E        |
|            |                   | K R        |
|            | Aromatic          | H F W Y    |
|            | Other             | N Q D E    |

23

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 2, immediately below

**Table 2**  
**Conservative Substitutions II**

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

As still an another alternative, exemplary conservative substitutions are set out in Table 3, immediately below.

**Table 3**  
**Conservative Substitutions III**

| Original Residue | Exemplary Substitution   |
|------------------|--------------------------|
| 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, |

29

|    |         |                         |
|----|---------|-------------------------|
|    | Leu (L) | Ile, Val, Met, Ala, Phe |
|    | Lys (K) | Arg, Gln, Asn           |
|    | Met (M) | Leu, Phe, Ile           |
|    | Phe (F) | Leu, Val, Ile, Ala      |
| 5  | Pro (P) | Gly                     |
|    | Ser (S) | Thr                     |
|    | Thr (T) | Ser                     |
|    | Trp (W) | Tyr                     |
|    | Tyr (Y) | Trp, Phe, Thr, Ser      |
| 10 | 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 transcript is synthesized in vivo in cells transfected with the full-length cDNA, but infectious transcripts can also be obtained by in vitro transcription from in vitro 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 or Lelystad virus is described in US Patent No. 6,268,199 which is hereby fully incorporated by reference. The preparation of an infectious cDNA clone of a North American PRRS virus isolate designated P129 (Lee et al., 2005; Yoo et al., 2004) is described in US Patent 6,500,662 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. 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. As described in US Patent 6,500,662 there are other plasmids and promoters suitable for use here.

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.

A table of amino acids and their representative abbreviations, symbols and codons is set forth below in the following Table 4.

Table 4

| 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 | Gln     | 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 |     |     |     |     |

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 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 lysine, the table above discloses that the two possible triplet sequences are AAA and AAG. Glycine is

26

encoded by GGA, GGC, GGT (GGU if in RNA) and GGG. To change a lysine to glycine residue in an encoded protein one might replace a AAA or AAG triplet with any of by GGA and GGC, GGT or GGG in the encoding nucleic acid. The coding sequence of the N or ORF7 protein from the P129 isolate is exemplified below.

5

**Table 5—Coding Sequence from N protein of P129 isolate**

|          |          |                         |                |          |          |          |          |          |          |          |                         |
|----------|----------|-------------------------|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------------------|
| <b>M</b> | <b>P</b> | <b>N</b>                | <b>N</b>       | <b>N</b> | <b>G</b> | <b>K</b> | <b>Q</b> | <b>Q</b> | <b>K</b> | <b>K</b> | <b>K</b> <sup>12</sup>  |
| ATG      | CCA      | AAT                     | AAC            | AAC      | GGC      | AAG      | CAG      | CAA      | AAG      | AAA      | AAG <sup>36</sup>       |
| <b>K</b> | <b>G</b> | <b>N</b>                | <b>G</b>       | <b>Q</b> | <b>P</b> | <b>V</b> | <b>N</b> | <b>Q</b> | <b>L</b> | <b>C</b> | <b>Q</b> <sup>24</sup>  |
| AAG      | GGG      | AAT                     | GGC            | CAG      | CCA      | GTC      | AAT      | CAG      | CTG      | TGC      | CAG <sup>72</sup>       |
| <b>M</b> | <b>L</b> | <b>G</b>                | <b>K</b>       | <b>I</b> | <b>I</b> | <b>A</b> | <b>Q</b> | <b>Q</b> | <b>N</b> | <b>Q</b> | <b>S</b> <sup>36</sup>  |
| ATG      | CTG      | GGT                     | AAA            | ATC      | ATC      | GCC      | CAG      | CAA      | AAC      | CAG      | TCC <sup>108</sup>      |
| <b>R</b> | <b>G</b> | <b>K</b>                | <b>G</b>       | <b>P</b> | <b>G</b> | <b>K</b> | <b>K</b> | <b>S</b> | <b>K</b> | <b>K</b> | <b>K</b> <sup>48</sup>  |
| AGA      | GGC      | AAG                     | GGA            | CCG      | GGC      | AAG      | AAA      | AGT      | AAG      | AAG      | AAA <sup>144</sup>      |
| <b>N</b> | <b>P</b> | <b>E</b>                | <b>K</b>       | <b>P</b> | <b>H</b> | <b>F</b> | <b>P</b> | <b>L</b> | <b>A</b> | <b>T</b> | <b>E</b> <sup>60</sup>  |
| AAC      | CCG      | GAG                     | AAG            | CCC      | CAT      | TTT      | CCT      | CTA      | GCG      | ACC      | GAA <sup>180</sup>      |
| <b>D</b> | <b>D</b> | <b>V</b>                | <b>R</b>       | <b>H</b> | <b>H</b> | <b>F</b> | <b>T</b> | <b>P</b> | <b>G</b> | <b>E</b> | <b>R</b> <sup>72</sup>  |
| GAT      | GAC      | GTC                     | AGG            | CAT      | CAC      | TTC      | ACC      | CCT      | GGT      | GAG      | CGG <sup>216</sup>      |
| <b>Q</b> | <b>L</b> | <b>C</b>                | <b>L</b>       | <b>S</b> | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>Q</b> | <b>T</b> | <b>A</b> | <b>F</b> | <b>N</b> <sup>84</sup>  |
| CAA      | TTG      | TGT                     | CTG            | TCG      | TCG      | ATC      | CAG      | ACT      | GCC      | TTT      | AAC <sup>252</sup>      |
| <b>Q</b> | <b>G</b> | <b>A</b>                | <b>G</b>       | <b>T</b> | <b>C</b> | <b>T</b> | <b>L</b> | <b>S</b> | <b>D</b> | <b>S</b> | <b>G</b> <sup>96</sup>  |
| CAG      | GGC      | GCT                     | GGA            | ACT      | TGT      | ACC      | CTG      | TCA      | GAT      | TCA      | GGG <sup>288</sup>      |
| <b>R</b> | <b>I</b> | <b>S</b>                | <b>Y</b>       | <b>T</b> | <b>V</b> | <b>E</b> | <b>F</b> | <b>S</b> | <b>L</b> | <b>P</b> | <b>T</b> <sup>108</sup> |
| AGG      | ATA      | AGT                     | TAC            | ACT      | GTG      | GAG      | TTT      | AGT      | TTG      | CCG      | ACG <sup>324</sup>      |
| <b>H</b> | <b>H</b> | <b>T</b>                | <b>V</b>       | <b>R</b> | <b>L</b> | <b>I</b> | <b>R</b> | <b>V</b> | <b>T</b> | <b>A</b> | <b>S</b> <sup>120</sup> |
| CAT      | CAT      | ACT                     | GTG            | CGC      | CTG      | ATC      | CGC      | GTC      | ACA      | GCA      | TCA <sup>360</sup>      |
| <b>P</b> | <b>S</b> | <b>A</b> <sup>123</sup> | (SEQ ID NO: 6) |          |          |          |          |          |          |          |                         |
| CCC      | TCA      | GCA <sup>369</sup>      | (SEQ ID NO: 7) |          |          |          |          |          |          |          |                         |

The construction of a mutant protein N polynucleotide sequence modified in the NLS-2 regions is demonstrated by way of illustrative example in Example 2.

It will be appreciated that mutations in the NLS-1, NoLS or NES regions can be accomplished with similar techniques and similar results.

10

#### **Demonstration that a Genetically Modified PRRS Virus is Attenuated**

To demonstrate that a particular genetically modified strain is attenuated an experiment as described below might be used.

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. 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  $10^5$  TCID<sub>50</sub> 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.

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.

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

Significant reduction in at least one of the following parameters for the test group (possibly attenuated virus) compared to the un-modified parental strain infected group would be an indication of attenuation:

- 15 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
- 20 e) preweaning mortality

Furthermore a significant increase in one of the following parameters for the test group compared the unmodified parental strain infected group is preferred:

- f) number of piglets weaned per sow
- g) number of live healthy piglets born per sow
- 25 In the alternative, respiratory symptoms and other symptoms of PRRSV infection could be examined to establish attenuation as described in Example 3 below

### Vaccines

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., 3 weeks), challenging with a large sample ( $10^{(3-7)}$  TCID<sub>50</sub>) 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 a large amount of the virus is an indication that the vaccine may not be effective, while isolation of reduced amounts of the virus (or no 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). 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, lung 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 which 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.

- 5 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 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<sup>®</sup> adjuvant, saponin, Quil A or other saponin fraction, 10 monophosphoryl lipid A, and Avridine lipid-amine adjuvant. 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<sup>®</sup> 85 detergent (ICI Surfactants), 0. 7% 15 (v/v) TWEEN<sup>®</sup> 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 comprising 5% (v/v) squalene, 1% (v/v) SPAN<sup>®</sup> 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 -- 20 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 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 25 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 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 30 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 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 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. 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 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 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.

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 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

27

from about 0.1 µg to about 100 mg, more preferably from about 1 µg to about 10 mg, even more preferably from about 10 µg to about 1 mg. The dose amount of an infectious 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 µg to about 10 mg, even more preferably from about 10 µg 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 preferably from about 1 ml to about 5 ml.

By way of example, vaccines may be delivered orally, parenterally, intradermally, subcutaneously, intramuscularly, intranasally or intravenously. Oral delivery may encompass, for example, adding the compositions to the feed or drink of the animals. Factors bearing on the vaccine dosage include, for example, the weight and age of the pig.

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 pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Bacillus anthracis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Haemophilus parasuis*, *Leptospira* spp.,

*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynovia*,  
*Pasteurella multocida*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*,  
*Streptococcus equismitis*, and *Streptococcus suis*. Nucleotide sequences encoding  
antigenic epitopes from the aforementioned swine pathogens are known in the art and  
5 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  
10 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 which are described herein as critical to the invention  
should be viewed as such; variations of the invention lacking limitations which have  
15 not been described herein as critical 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. -----

20 The present invention is further illustrated by, but not limited to, the following  
examples

**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,  
25 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 (5'-  
ACTCAGTCTAAGTGCTGGAAAGTTATG - 3') (SEQ ID NO: 8) : positions  
30 11,504 to 11,530), 300 ng of reverse primer P-shuttle-Rev primers (5'-  
ATCTTATCATGTCTGGATCCCCGCGGC - 3') (SEQ ID NO: 9) : positions 15,500  
to 15,475), 1 mM each of dCTP, dGTP, dATP, and dTTP, 1× PCR buffer [10 mM  
KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 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: Modification of the NLS-2 sequence to generate P129-GG virus**

PCR-based site-directed mutagenesis was used to modify the nuclear localization signal 2(NLS-2) motif located at amino acid positions 41 to 47 of the nucleocapsid (N) protein. Among North American genotype PRRS viruses, this NLS motif is generally PGKKNNKK (as in the prototype isolate VR-2332 or the Canadian isolate PA-8), or a derivative thereof, such as PGKKSKK (found in isolates P129 and 93-47324). The presence of multiple positively charged lysine (K) or arginine (R) residues is believed to be important for a fully functional NLS signal. The lysine residues at positions 43 and 44 of N (nucleotide positions 14,999-15,004 of the P129 genome) were replaced by glycine residues using the shuttle plasmid and the mutagenic primer pair KK43/44GG-Fwd (5'-GGCAAGGGACCGGGAGGGGGAAATAAGAAGAAAAAC - 3') (SEQ ID NO: 10)-: genome positions 14,984 to 15,019) and KK43/44GG-Rev (5'-GTTTTTCTTCTTATTTCCCCCTCCCGGTCCCTTGCC - 3') (SEQ ID NO: 11)-: genome positions 14,984 to 15,019), where underlines indicate codon changes for amino acid substitutions from KKS to GGN. 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, 1× PCR buffer [10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 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 the desired mutation (PGGGNKK) was verified by nucleotide sequencing and the resulting plasmid was named pTB-shuttle-N-GG.

5        The shuttle plasmid carrying the GG mutation (pTB-shuttle-N-GG) and the wild type full-length genomic clone (pCMV-S-P129) each contain unique *Bsr*G I and *Spe* I sites (at positions 1,192 and 3,963, and positions 12,692 and 15,463, respectively). After digestion with these two enzymes, the 2,772 bp *Bsr*G I-*Spe* I fragment was gel-purified from pTB-shuttle-N-GG, and the 16,120 bp *Bsr*G I-*Spe* I  
10        fragment was gel-purified from pCMV-S-P129. These two fragments were ligated using T4 DNA ligase (Invitrogen) to construct a GGN-modified full-length genomic cDNA clone. *E. coli* strain DH5- $\alpha$  was transformed with 10  $\mu$ l 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  
15        selected. The selected clones were sequenced to confirm the presence of the GGN modification in the full-length genomic cDNA clone. One of the resulting plasmids was designated pCMV-S-P129-GG.

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);  
20        and streptomycin (50  $\mu$ g/ml) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were seeded in 35 mm-diameter dishes and grown to 70% confluency. The cells were transfected for 24 h with 2  $\mu$ g of pCMV-S-P129-GG 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-  
25        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 (see Figure 1). The culture supernatants from transfected cells were harvested at 5 days post-transfection and designated 'P129-GG passage 1' (P1).  
30        The passage-1 virus was used to inoculate fresh Marc-145 cells and the 5-day harvest was designated 'passage-2' (P2). 'Passage-3' (P3) 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-GG virus was titrated by plaque assay, and the titers were determined to be

35

$1 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^2$ , and  $5 \times 10^3$  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  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ , and  $5 \times 10^5$  pfu/ml for passages 1, 2, and 3 respectively.

**Example 3: Infection of pigs with P129-GG virus and parental P129 virus**

**(Demonstration that the P129-GG virus is Attenuated)**

Twenty-one healthy, crossbred pigs without a history of disease caused by or vaccination against PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* were randomly assigned to 3 treatment groups of 7 pigs each. At approximately 6 weeks of age, T01 pigs received a placebo while T02 and T03 pigs received an intranasal challenge with 2.0 ml of virus stock diluted to  $2.5 \times 10^4$  pfu/ml ( $5.0 \times 10^4$  pfu/dose) of the genetically modified P129-GG virus (generated from plasmid pCMV-S-P129-GG) or parental P129 PRRS virus (generated from plasmid pCMV-S-P129), respectively. All pigs were observed daily for clinical signs including general condition, depression, loss of appetite, sneezing, coughing, and respiratory distress. Rectal temperatures and body weights were recorded. Blood samples were taken on Days 0, 4, 7, 10, 14, 21, and 28 for PRRSV isolation and serology. Necropsies were performed on Days 14 (2 pigs/group) and 28 (5 pigs/group), and tissue samples (lung and tonsil) were collected. Estimates of lung lesion severity and percent consolidation of each lung lobe were made. Pigs in groups T02 and T03 developed signs of a mild PRRS virus infection; shed virus in the serum, and seroconverted. Uninfected control pigs (T01) remained negative for serum viremia and negative for antibody to the PRRS virus.

Compared to pigs infected with P129 parental virus (T03), pigs infected with the P129-GG virus (T02) shed less virus in their serum (Figures 2a and 2b) and produced higher levels of anti-PRRS ELISA antibody (Figure 2C and 2D), and neutralizing antibody (Figure 2e).

| Table 6—ELISA Antibody Levels (S/P) |       |       |       |        |        |        |        |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
|                                     | day 0 | day 4 | day 7 | day 10 | day 14 | day 21 | day 28 |
| <b>P129-wt</b>                      |       |       |       |        |        |        |        |
| pig 28                              | 0.000 | 0.000 | 0.061 | 0.283  | 0.527  | 0.689  | 1.025  |
| pig 30                              | 0.006 | 0.000 | 0.044 | 0.178  | 0.527  | 0.731  | 0.672  |
| pig 35                              | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.027  | 0.157  | 0.241  | 0.197  |
| pig 40                              | 0.004 | 0.021 | 0.030 | 0.208  | 0.575  | 0.723  | 0.890  |
| pig 43                              | 0.000 | 0.000 | 0.049 | 0.354  | 0.419  | 1.760  | 2.006  |
| mean                                | 0.002 | 0.004 | 0.037 | 0.210  | 0.441  | 0.829  | 0.958  |
|                                     |       |       |       |        |        |        |        |
| <b>P129-GG</b>                      |       |       |       |        |        |        |        |
| pig 33                              | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.356  | 0.873  | 1.377  | 1.705  |

36

|         |       |       |       |       |       |       |       |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| pig 36  | 0.000 | 0.000 | 0.019 | 0.383 | 1.038 | 1.536 | 1.604 |
| pig 38  | 0.000 | 0.000 | 0.034 | 0.248 | 0.383 | 0.723 | 1.398 |
| pig 45  | 0.004 | 0.000 | 0.090 | 0.288 | 0.416 | 0.371 | 0.386 |
| pig 46  | 0.000 | 0.000 | 0.066 | 0.627 | 1.154 | 1.438 | 1.676 |
| mean    | 0.001 | 0.000 | 0.042 | 0.380 | 0.773 | 1.089 | 1.354 |
| Means   | 0     | 4     | 7     | 10    | 14    | 21    | 28    |
| P129-wt | 0.002 | 0.004 | 0.037 | 0.210 | 0.441 | 0.829 | 0.958 |
| P129-GG | 0.001 | 0.000 | 0.042 | 0.380 | 0.773 | 1.089 | 1.354 |

Serum neutralization titers were determined in both the T02 and T03 groups at 7, 14, 21 and 28 days post infection. The neutralizing titers were determined by TCID<sub>50</sub> in 96 well plates in duplicate. In each well 200 pfu of wild type P129 virus in a volume of 100  $\mu$ l was combined with 100  $\mu$ l of a serial 2-fold dilution of sera (previously heat inactivated for 30 min at 56°C). The mixture was incubated for 1 hr at 37 C, followed by infection of cells. The infected cells were incubated for 5 days and CPEs were determined. The data is presented below and shows that pigs infected with the mutant virus developed higher mean neutralizing titers than those infected with the wild type parent virus.

10 **Table 7- Neutralizing Titers During Four Weeks of Infection (duplicate values)**

| P129-wt        | Day 7  | Day 14 | Day 21 | Day 28 |
|----------------|--------|--------|--------|--------|
| Pig 28         | <2, <2 | <2, <2 | 4, 4   | 3.5    |
| Pig 30         | <2, <2 | 2, 8   | 2, 2   | 4      |
| Pig 35         | <2, <2 | 4, 4   | 8, 4   | 7.5    |
| Pig 40         | <2, <2 | 4, 4   | 2, 8   | 8      |
| Pig 43         | <2, <2 | 2, 4   | <2, 8  | 3.5    |
| Mean           | <2     | 3.2    | 4.2    | 5.3    |
| <b>P129-GG</b> |        |        |        |        |
| Pig 33         | <2, <2 | 4, 8   | 8, 16  | 16     |
| Pig 36         | <2, <2 | 2, 2   | 16, 16 | 16     |
| Pig 38         | <2, <2 | 8, 4   | 8, 4   | 36     |
| Pig 45         | <2, <2 | 2, 2   | 4, 4   | 6      |
| Pig 46         | <2, <2 | 8, 8   | 16, 16 | 48     |
| Mean           | <2     | 4.8    | 10.8   | 24.4   |

One of the hallmarks in PRRSV infection is the persistence of virus in tonsils. Therefore, tonsils were collected from all infected pigs and two mock-infected control pigs at the termination of the study (4 weeks post-infection) and examined for viral persistence by RT-PCR. The N gene was detectable by RT-PCR in all pigs infected with either GG virus or P129 virus, while tonsils from mock-infected pigs remained negative. This indicates that all infected pigs shed the virus at 4 weeks post-infection. To examine possible mutations in NLS of the N gene, PCR products from tonsils were

37

sequenced.

In all five pigs, GG virus persisting in the tonsils was found to be mutated in the NLS-2 sequence by the introduction of an arginine at either position 43 or 44.

Wild-type P129 virus from tonsils did not mutate and retained the wild-type NLS-2  
5 sequence.

#### **Example 4: Reversion-resistant mutations of NLS-2**

The P129-GG mutation described in **Example 2** was created by changing six nucleotides. As seen in **Example 3**, this virus is capable of partial or full reversion and can regain the parental NLS-negative phenotype at a relatively high frequency due to  
10 random mutation and natural selection. Preferred embodiments of the invention, especially for vaccine purposes, would contain additional nucleotide substitutions and/or deletions, designed to minimize the probability of reversion, and to minimize the probability of other flanking residues mutating to basic residues such as lysine and arginine and thereby restoring a functional NLS motif in the region. Codons that  
15 require two or three separate nucleotide changes in order to mutate to codons encoding a basic residue are preferred over those that require only one change. Deletion mutations are very unlikely to revert, since a portion of the region has been removed. Alternative codons can be chosen for flanking amino acids, in order to reduce the chances of reacquiring a pat7, pat4, or other NLS motif by mutation.  
20 Examples of such "reversion resistant" mutations are shown in **Table 6**, and are intended to be representative rather than limiting. Given this information, other examples of reversion resistant mutations may be envisioned by one of ordinary skill in the art.

In **Table 8**, mutant virus P129-d43/44 is a deletion of amino acids 43 and 44. In  
25 addition, the serine codon at position 45 is changed from AGT to TCT to reduce the probability of it mutating to a lysine or arginine codon. Also, the asparagine codon at position 49 (AAC) is changed to a serine codon (TCC) for the same reason. Serine is found at position 49 in some naturally occurring field isolates, so should be well tolerated. A minimal pat 7 NLS motif (PGSKKKS) remains in this mutant, and may  
30 have partial NLS activity. Viruses with partial NLS activity are predicted to have phenotypes that are intermediate between wild type (parental) virus and complete NLS knockout mutants. Such viruses may be especially useful as vaccines.

### Table 8---Contemplated Deletion Mutants

|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | T                            |   |   | D | M | I |   |   | E | K |   |   | G |
|-----|-----|-----|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | N                            | N | I | N | N | R | R | R | R | S | S | D |   |
| V   | R   |     |            |            |     | E   | N   | N   | I   | N   | N   | R          | R   | R   | R   | S                            | S | D |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 38  | 39  | 40  | 41         | 42         | 43  | 44  | 45  | 46  | 47  | 48  | 49  | 50         | 51  | 52  | 53  |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| G   | K   | G   | P          | G          | K   | K   | S   | K   | K   | K   | N   | P          | E   | K   | P   |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| GGC | AAG | GGA | <u>CCG</u> | <u>GGC</u> | AAG | AAA | AGT | AAG | AAG | AAA | AAC | <u>CCG</u> | GAG | AAG | CCC |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | wtP129(SEQ ID NO:12)         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | (SEQ ID NO:13)               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 38  | 39  | 40  | 41         | 42         | 43  | 44  | 45  | 46  | 47  | 48  | 49  | 50         | 51  | 52  | 53  |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| G   | K   | G   | P          | G          | G   | G   | N   | K   | K   | K   | N   | P          | E   | K   | P   |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| GGC | AAG | GGA | CCG        | GGA        | GGG | GGA | AAT | AAG | AAG | AAA | AAC | CCG        | GAG | AAG | CCC |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | P129-GG SEQ ID NO:14)        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | (SEQ ID NO:15)               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 38  | 39  | 40  | 41         | 42         | 43  | 44  | 45  | 46  | 47  | 48  | 49  | 50         | 51  | 52  | 53  |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| G   | K   | G   | P          | G          | -   | -   | S   | K   | K   | K   | S   | P          | E   | K   | P   |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| GGC | AAG | GGA | CCG        | GGC        | --- | --- | TCT | AAG | AAG | AAA | TCC | CCG        | GAG | AAG | CCC |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | P129-d43/44(SEQ ID NO:16)    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | (SEQ ID NO:17)               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 38  | 39  | 40  | 41         | 42         | 43  | 44  | 45  | 46  | 47  | 48  | 49  | 50         | 51  | 52  | 53  |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| G   | K   | G   | P          | G          | -   | -   | S   | -   | K   | K   | S   | P          | E   | K   | P   |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| GGC | AAG | GGA | CCG        | GGC        | --- | --- | TCT | --- | AAG | AAA | TCC | CCG        | GAG | AAG | CCC |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | P129-d43/44/46(SEQ ID NO:18) |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | (SEQ ID NO:19)               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 38  | 39  | 40  | 41         | 42         | 43  | 44  | 45  | 46  | 47  | 48  | 49  | 50         | 51  | 52  | 53  |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| G   | K   | G   | P          | G          | K   | -   | S   | -   | -   | K   | S   | P          | E   | K   | P   |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| GGC | AAG | GGA | CCG        | GGC        | AAG | --- | TCT | --- | --- | AAA | TCC | CCG        | GAG | AAG | CCC |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | P129-d44/46/47(SEQ ID NO:20) |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | (SEQ ID NO:21)               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 38  | 39  | 40  | 41         | 42         | 43  | 44  | 45  | 46  | 47  | 48  | 49  | 50         | 51  | 52  | 53  |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| G   | K   | G   | P          | G          | K   | K   | S   | -   | -   | -   | S   | P          | E   | K   | P   |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| GGC | AAG | GGA | CCG        | GGC        | AAG | AAA | TCT | --- | --- | --- | TCC | CCG        | GAG | AAG | CCC |                              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | P129-d46/47/48(SEQ ID NO:22) |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |     |     |            |            |     |     |     |     |     |     |     |            |     |     |     | (SEQ ID NO:23)               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

- The letters in bold at the top above are alternative residues that are found in at least one NA PRRS virus.
- The two underlined segments form a 5-base stem that may be important for negative strand synthesis.
- 4 and 5 residue deletions are also contemplated

The other three mutants shown in Table 8 (P129-d43/44/46, P129-d44/46/47, and P129-d46/47/48) are deletions of three amino acids, and also have the codon changes at positions 45 and 49 discussed above. These mutations lack an NLS motif and are predicted to have a complete knockout of NLS activity. These viruses are anticipated to be attenuated in pigs and especially useful as vaccines.

The forward and reverse primers for the mutations described in Table 8 are as follows:

**Forward Primers (5' – 3')**

- 10 P129-d43/44 F (SEQ ID NO: 24)  
GTCCAGAGGCAAGGGACCGGGATCTAAGAAGAAATCCCCGGAG  
P129-d43/44/46F (SEQ ID NO: 25)  
GTCCAGAGGCAAGGGACCGGGATCTAAGAAGAAATCCCCGGAG  
P129-d44/46/47F (SEQ ID NO: 26)  
GCAAGGGACCGGGAAAGTCTAAATCCCCGGAGAAGCCCC  
15 P129-d46/47/48F (SEQ ID NO: 27)  
GCAAGGGACCGGGAAAGAAATCTTCCCCGGAGAAGCCCC

### Reverse Primers (5' – 3')

- 20 P129-d43/44 R (SEQ ID NO: 28)  
CTCCGGGGATTCTTCTTAGATCCCGGTCCCTTGCCTCTGGAC

39

P129-d43/44/46R (SEQ ID NO: 29)

CTCCGGGGATTCTTAGATCCCGGTCCCTTGCCTCTGGAC

P129-d44/46/47R (SEQ ID NO: 30)

GGGGCTTCTCCGGGGATTAGACTTTCCCGGTCCCTTGC

5 P129-d46/47/48R (SEQ ID NO: 31)

GGGGCTTCTCCGGGGAAGATTCTTTCCCGGTCCCTTGC

The descriptions and examples above demonstrate that the NLS-2 regions is not required for virus multiplication but is an important virulence factor for PRRSV, as demonstrated by the fact that the only virus persisting in tonsils has mutated. We also demonstrate that the NLS in the PRRSV N protein is positively correlated with higher neutralizing antibodies and higher ELISA titers. We thus have established that mutations eliminating the NLS-2 sequence motif result in an attenuated strain of PRRSV.

#### 15 **Numbered Description of the Invention**

1. A composition comprising a PRRS infectious agent selected from the group consisting of: a.) a genetically modified PRRS virus comprising an N protein which has been modified in at least one conserved region selected from the group consisting of the NLS-2 region, NoLS region and the NES region such that the conserved region has been eliminated, and wherein the genetically modified PRRS virus is attenuated; b.) an infectious RNA molecule encoding the genetically modified PRRS virus of a.); and c.) an isolated polynucleotide molecule comprising a DNA sequence encoding the infectious RNA molecule of b.).
2. The composition of claim 1 which has been further modified to result in the elimination of the conserved NLS-1 region.
3. The composition of claim 1 wherein the conserved region has been eliminated by the introduction of a non-conservative amino acid substitution.
4. The composition of claim 1 or 2 wherein the conserved region has been at least partially deleted.
5. The composition of claim 1 wherein the conserved region is the NoLS region.
6. The composition of claim 1 wherein the conserved region is the NLS-2 region.
7. The composition of claim 1 wherein the conserved region is the NES region.
8. The composition of claim 1 wherein the PRRS virus is a North American PRRS virus.
9. The composition of claim 1 wherein the PRRS virus is a European PRRS virus.
10. The composition of claim 8 wherein the conserved region is the NLS-2 region.
11. The composition of claim 10 wherein residues 42 and 43 of the N protein are glycines.
12. The composition of claim 10 wherein residues 42 and 43 of the N protein are

20

glycine and residue 44 is an asparagine. 13. The composition of claim 10 wherein the NLS-2 region has been at least partially deleted. 14. The composition of claim 13 wherein at least one of residues 43 through 48 of the N protein have been deleted. 15. The composition of claim 14 wherein both residues 43 and 44 of the N protein have been deleted. 17. The composition of claim 14 wherein residues 43, 44, and 46 of the N protein have been deleted. The composition of claim 14 wherein residues 44, 46, and 47 of the N protein have been deleted. 19. The composition of claim 14 wherein residues 46, 47, and 48 of the N protein have been deleted. 20. The composition of claims 1-19 that contain additional nucleotide mutation, substitutions and/or deletions, designed to minimize the probability of reversion.

21. A vaccine for protecting a porcine animal from infection by a PRRS virus comprising the composition of any of claims 1-20 in an amount effective to produce immunoprotection against infection by a PRRS virus; and a carrier acceptable for veterinary use. 22. 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 20 that is effective to produce immunoprotection against infection by a PRRS virus. 23. A transfected host cell comprising a composition according to any of claims 1-20.

24. A method for making a genetically modified and attenuated 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 comprising an N protein which has been modified in at least one conserved region selected from the group consisting of the NLS-2 region, NoLS region and the NES region such that the conserved region has been eliminated; b.) introducing the genetically modified PRRS virus into a host cell capable of supporting PRRS replication. 25. A method of claim 24 wherein the genetically modified PRRS virus is a North American PRRS virus. 26. A method of claim 24 wherein the genetically modified PRRS virus is a European PRRS virus. 27. The method of claim 24 wherein the host cell capable of supporting PRRS replication is a MARC-145 cell. 28. The method of claim 24 wherein the host cell capable of supporting PRRS replication is comprised within a live porcine animal. 29. Any of the inventions described herein or any of the combinations of claims described above.

A5

**What is claimed is:**

1. A composition comprising a PRRS infectious agent selected from the group consisting of:
  - a.) a genetically modified PRRS virus comprising an N protein which has been  
5 modified in at least one conserved region selected from the group consisting of the NLS-2 region, NoLS region and the NES region such that the conserved region has been eliminated, and wherein the genetically modified PRRS virus is attenuated;
  - b.) an infectious RNA molecule encoding the genetically modified PRRS virus of a.); and
  - 10 c.) an isolated polynucleotide molecule comprising a DNA sequence encoding the infectious RNA molecule of b.).
2. The composition of claim 1 which has been further modified to result in either a) the elimination of the conserved NLS-1 region, or the conserved region has been  
15 eliminated by the introduction of a non-conservative amino acid substitution, or the conserved region has been at least partially deleted.
3. The composition of claim 1 wherein the conserved region is selected from any of or combination of the following: a) the NoLS region, the NLS-2 region, and or the NES  
20 region.
4. The composition of claims 1 - 3 wherein the PRRS virus is selected from any of or combination of the following: North American PRRS virus or a European PRRS virus.
- 25 5. The composition of claim 3, where the PRRS virus is a North American PRRS virus and where the conserved region is the NLS-2 region.
6. The composition of claim 5 selected from the group consisting of these compositions:  
30 where residues 43 and 44 of the N protein are glycines,  
where residues 43 and 44 of the N protein are glycine and residue 45 is an asparagine,  
where the NLS-2 region has been at least partially deleted,

A2

where at least one of residues 43 through 48 of the N protein have been deleted,

where both residues 43 and 44 of the N protein have been deleted,

where residues 43, 44, and 46 of the N protein have been deleted,

5 where residues 44, 46, and 47 of the N protein have been deleted, and or

where residues 46, 47, and 48 of the N protein have been deleted.

7. The composition of claims 1-6 that contain additional nucleotide mutation, substitutions and/or deletions, designed to minimize the probability of reversion.

10

8. A vaccine for protecting a porcine animal from infection by a PRRS virus comprising the composition of any of claims 1-7 in an amount effective to produce immunoprotection against infection by a PRRS virus; and a carrier acceptable for veterinary use.

15

9. 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 8 that is effective to produce immunoprotection against infection by a PRRS virus.

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

11. A method for making a genetically modified and attenuated PRRS virus, which method comprises:

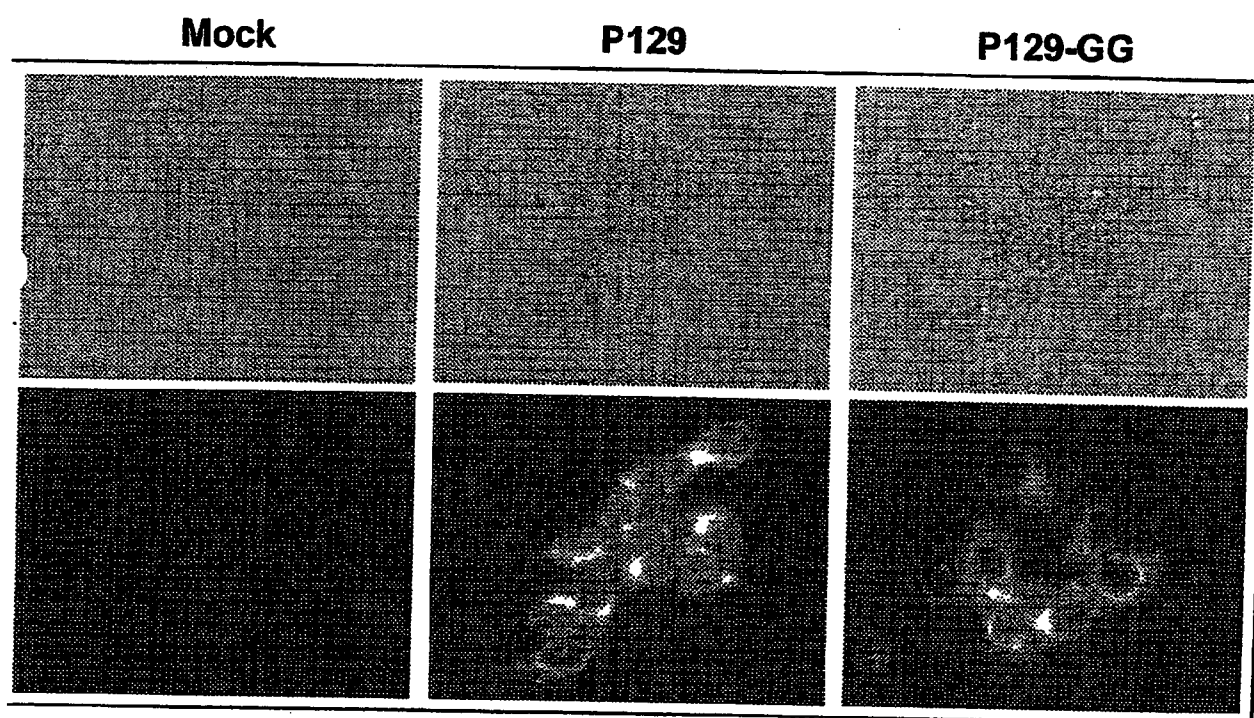
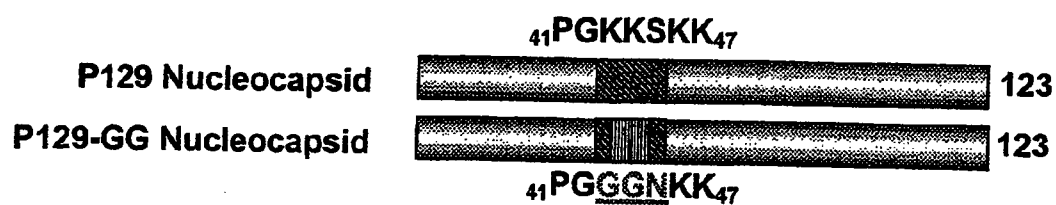
- 25 a.) mutating a DNA sequence encoding an infectious RNA molecule which encodes a PRRS virus, to produce a genetically modified PRRS virus comprising an N protein which has been modified in an at least one conserved region selected from the group consisting of the NLS-2 region, NoLS region and the NES region such that the conserved region has been eliminated;
- 30 b.) introducing the genetically modified PRRS virus into a host cell capable of supporting PRRS replication.

DB

12. A method of claim 11 where the genetically modified PRRS virus has been further modified with one or more additional nucleotide mutations, substitutions and or deletions, that minimize the possibility of reversion.
- 5 13. A method of claim 11 wherein the genetically modified PRRS virus is a North American PRRS virus or a European PRRS virus.
14. The method of claims 11-13 wherein the host cell capable of supporting PRRS replication is a MARC-145 cell.
- 10 15. The method of claims 11-13 wherein the host cell capable of supporting PRRS replication is comprised within a live porcine animal.

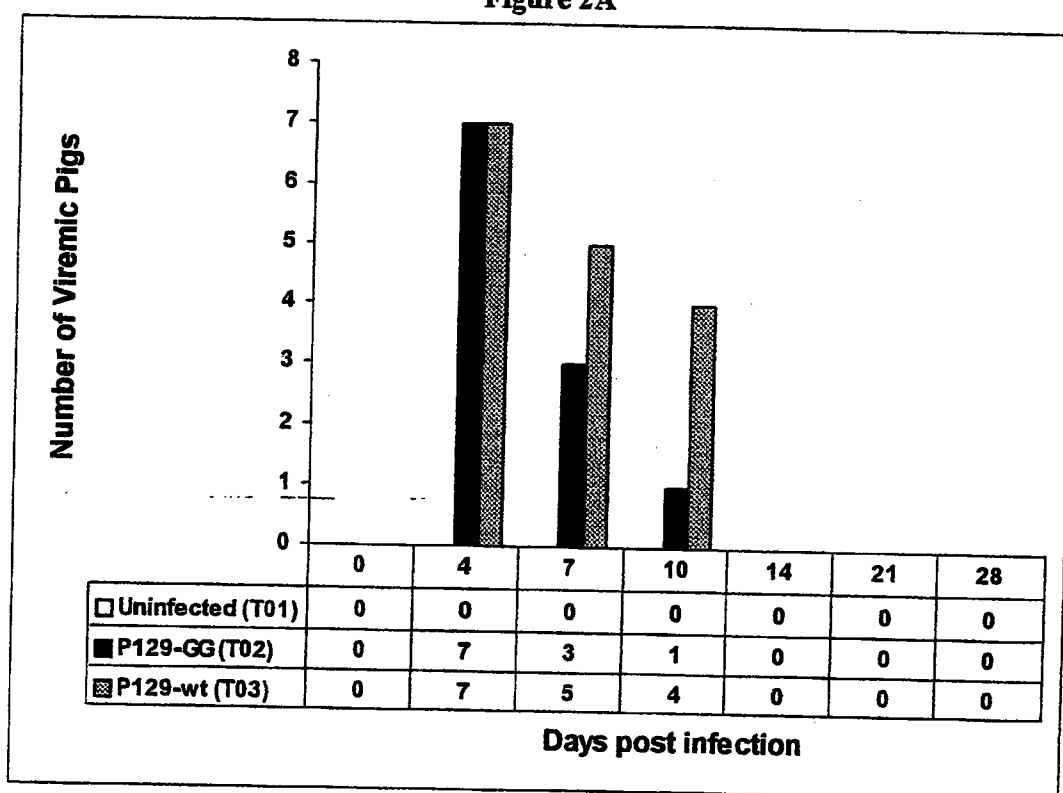
AA

Figure 1



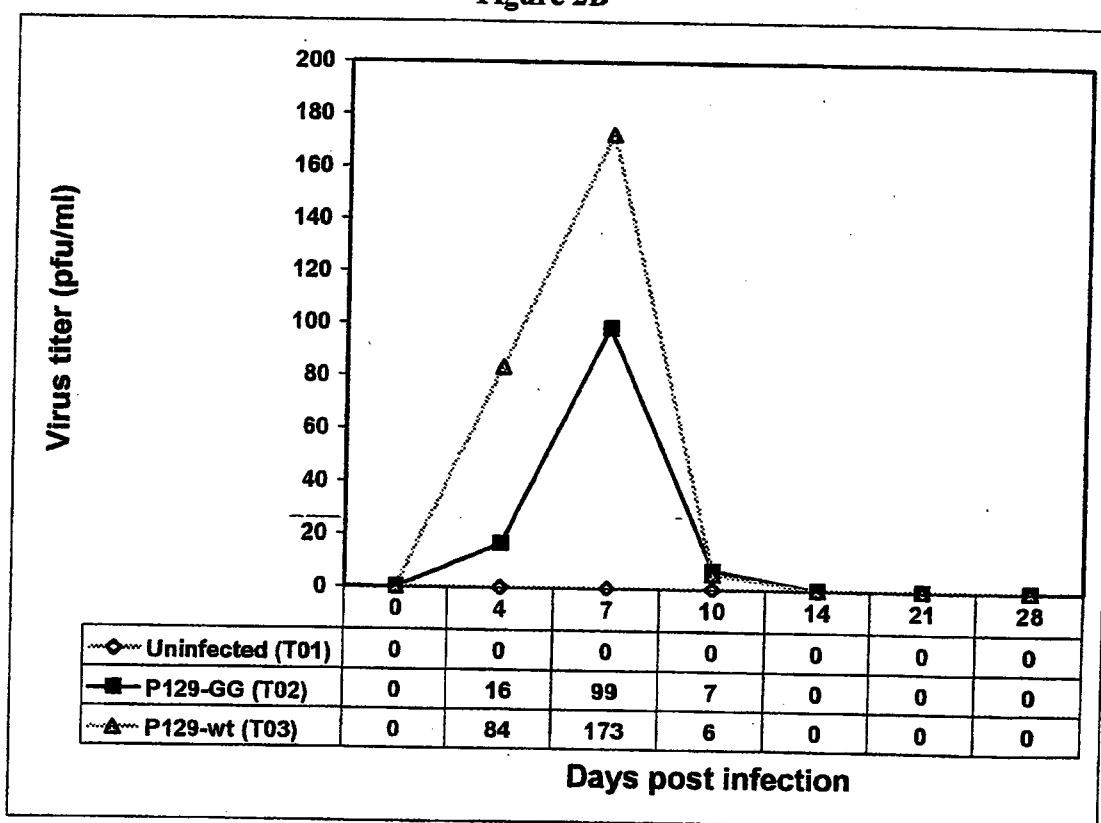
45

Figure 2A



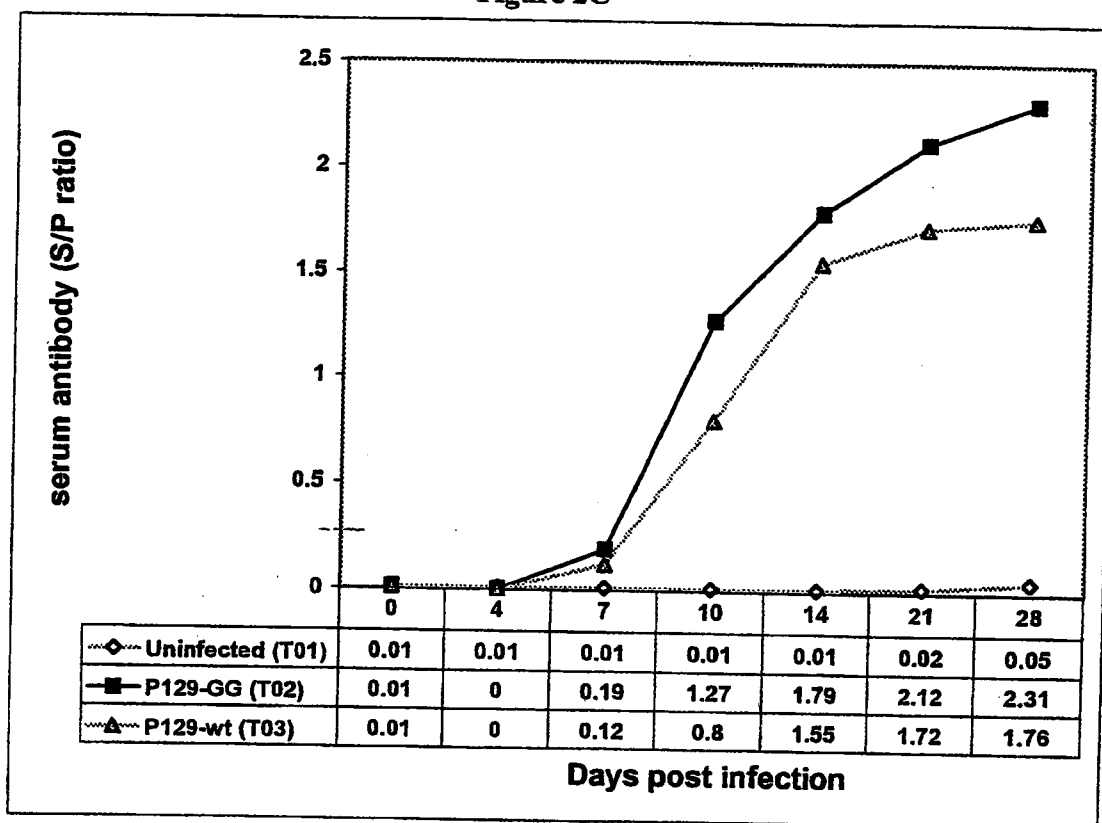
226

Figure 2B



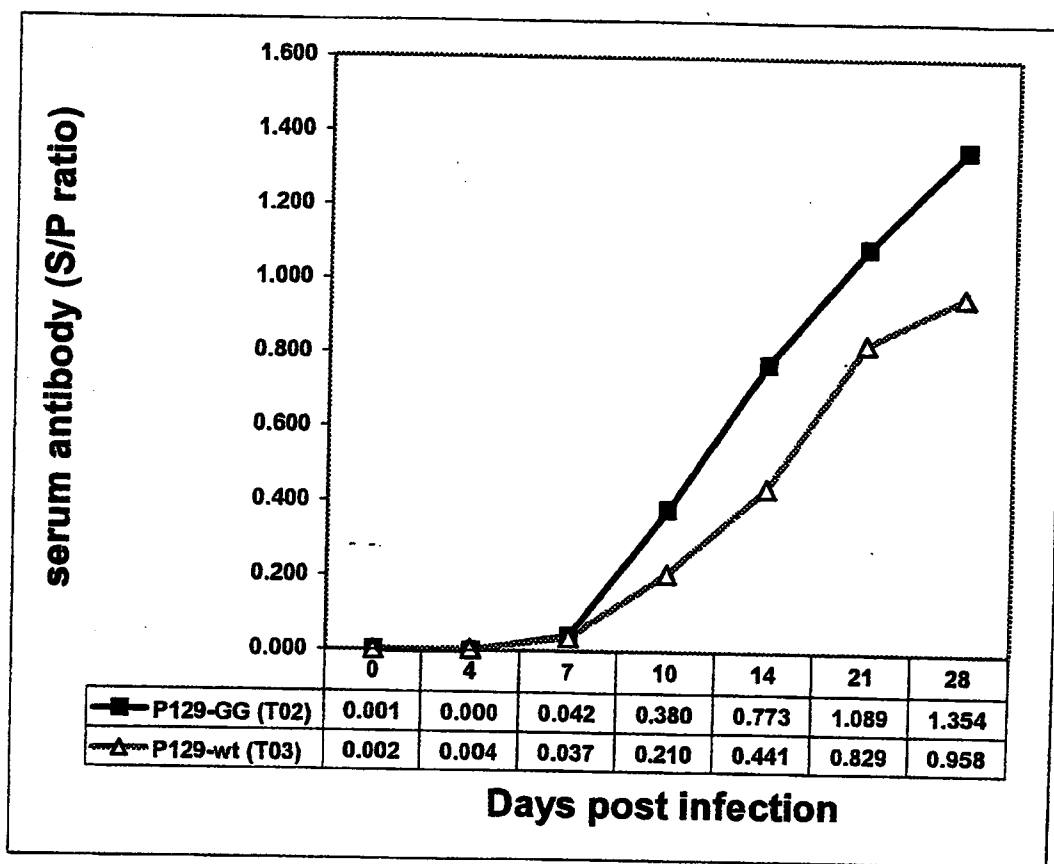
47

Figure 2C



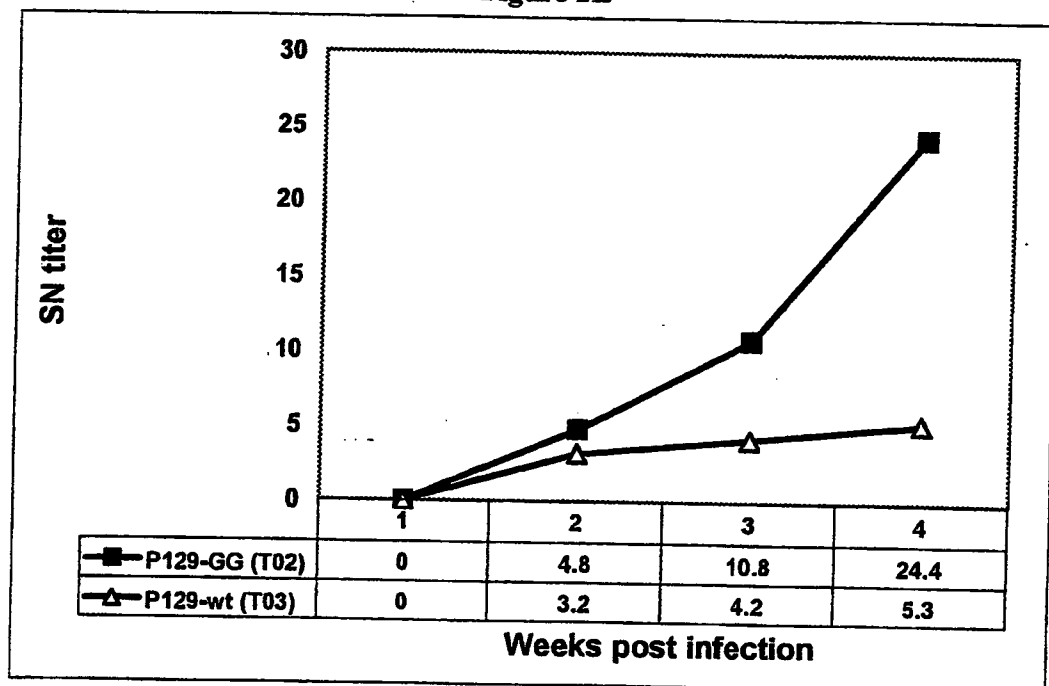
10

Figure 2D



29

Figure 2E



50

## SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Inc.  
 Yoo, Dongwan  
 Lee, Changhee  
 Calvert, Jay G.  
 Welch, Siao-Kun W. .

<120> MUTANT PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS

<130> PC32632A

<160> 31

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 1

Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys  
 1 5

<210> 2  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 2

Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro  
 1 5 10 15

Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg  
 20 25 30

<210> 3  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 3

Pro Arg Gly Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Pro Glu Lys Pro His Phe  
 1 5 10 15

Pro Leu Ala Ala Glu Asp Asp Ile Arg His His Leu Thr Gln Thr Glu  
 20 25 30

Arg

51

<210> 4  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 4

Leu Pro Thr His His Thr Val Arg Leu Ile Arg Val  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 5

Leu Pro Val Ala His Thr Val Arg Leu Ile Arg Val  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 6

Met Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Gln Lys Lys Lys Lys Gly Asn Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala Gln  
 20 25 30

Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Ser Lys Lys Lys  
 35 40 45

Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg  
 50 55 60

His His Phe Thr Pro Gly Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln  
 65 70 75 80

Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly  
 85 90 95

Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val  
 100 105 110

Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Ser Pro Ser Ala  
 115 120

<210> 7  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 7  
 atgccaaata acaacggcaa gcagcaaaag aaaaagaagg ggaatggcca gccagtcaat 60  
 cagctgtgcc agatgctggg taaaatcatc gccagcaaa accagtccag aggcaaggga 120  
 ccgggcaaga aaagtaagaa gaaaaacccg gagaagcccc attttcctct agcgaccgaa 180  
 gatgacgtca ggcatacatt caccctggt gagcggcaat tgtgtctgtc gtcgatccag 240  
 actgccttta accagggcgc tggaacttgt accctgtcag attcagggag gataagttac 300  
 actgtggagt ttagtttgcc gacgcatcat actgtgcgcc tgatccgcgt cacagcatca 360  
 ccctcagca 369

<210> 8  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 8  
 actcagtcta agtgctggaa agttatg 27

<210> 9  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 9  
 atcttatcat gtctggatcc ccgcggc 27

<210> 10  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 10  
 ggcaaggac cgggaggggg aaataagaag aaaaac 36

<210> 11  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 11  
 gtttttcttc ttattttccc ctcccggtcc cttgcc 36

<210> 12  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus



<400> 12

Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Ser Lys Lys Lys Asn Pro Glu Lys Pro  
1 5 10 15

<210> 13

<211> 48

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 13

ggcaagggac cgggcaagaa aagtaagaag aaaaacccgg agaagccc

48

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 14

Gly Lys Gly Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Lys Asn Pro Glu Lys Pro  
1 5 10 15

<210> 15

<211> 48

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 15

ggcaagggac cgggaggggg aaataagaag aaaaacccgg agaagccc

48

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 16

Gly Lys Gly Pro Gly Ser Lys Lys Lys Ser Pro Glu Lys Pro  
1 5 10

<210> 17

<211> 42

<212> DNA

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

<400> 17

ggcaagggac cgggctctaa gaagaaatcc cgggagaagc cc

42

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus



&lt;400&gt; 18

Gly Lys Gly Pro Gly Ser Lys Lys Ser Pro Glu Lys Pro  
1 5 10

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

&lt;400&gt; 19

ggcaaggagac cgggctctaa gaaatccccg gagaagccc

39

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

&lt;400&gt; 20

Gly Lys Gly Pro Gly Lys Ser Lys Ser Pro Glu Lys Pro  
1 5 10

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

&lt;400&gt; 21

ggcaaggagac cgggcaagtc taaatccccg gagaagccc

39

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

&lt;400&gt; 22

Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Ser Ser Pro Glu Lys Pro  
1 5 10

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

&lt;400&gt; 23

ggcaaggagac cgggcaagaa atcttccccg gagaagccc

39

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

&lt;400&gt; 24

gtccagagggc aagggaccgg gatctaagaa gaaatccccg gag

43

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

&lt;400&gt; 25

gtccagagggc aagggaccgg gatctaagaa atccccggag

40

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

&lt;400&gt; 26

gcaagggacc gggaaagtct aaatccccgg agaagcccc

39

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

&lt;400&gt; 27

gcaagggacc gggaaagaaa tcttccccgg agaagcccc

39

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

&lt;400&gt; 28

ctccggggat ttcttcttag atccccgtcc cttgcctctg gac

43

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

&lt;400&gt; 29

ctccggggat ttcttagatc ccggtccctt gcctctggac

40

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

&lt;400&gt; 30

ggggcttctc cggggattta gactttcccg gtcccttgc

39

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

cb

<400> 31

ggggcttctc cggggaagat ttctttcccg gtccattgc

39

5X

**MUTANTES DE LA PROTEÍNA N DEL VIRUS DEL SÍNDROME REPRODUCTOR Y  
RESPIRATORIO DE LOS PORCINOS**

**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona un virus PRRS modificado genéticamente y polinucleótidos que lo codifican. Se proporcionan también vacunas que comprenden el virus modificado genéticamente y los polinucleótidos.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos (PRRS) se caracteriza por abortos, partos con producto muerto, y otros problemas reproductores en las cerdas multíparas y jóvenes, así como enfermedad respiratoria en los cerdos jóvenes. El agente causal es el virus PRRS, un miembro de la familia *Arteriviridae* y el orden *Nidovirales*. Dos genotipos distintos del virus emergieron casi simultáneamente en América del Norte y en Europa a finales de los años 1980. El virus PRRS es hoy en día endémico en casi todos los países productores de puercos, y está considerado como una de las enfermedades más importantes económicamente que afectan a la industria porcina mundial.

Actualmente, las vacunas comerciales contra el PRRS incluyen vacunas vivas modificadas y vacunas muertas (desactivadas). Las vacunas muertas han sido criticadas por fallo en la inducción de una inmunidad fuerte contra las cepas heterólogas del virus PRRS. Las vacunas vivas modificadas están atenuadas por pasos en serie en cultivo de células hasta que se pierde la virulencia. Las vacunas vivas modificadas provocan una protección más amplia que las vacunas muertas, pero pueden presentar numerosos problemas de seguridad que incluyen virulencia residual, propagación a los cerdos no vacunados, y reversión genética a la virulencia. Debido a cambios antigénicos que tienen lugar durante el proceso de atenuación, tales vacunas pueden perder también algo de su capacidad para proteger contra las cepas de campo virulentas del virus PRRS. Por tanto, existe una necesidad acuciante de vacunas vivas modificadas nuevas y mejoradas para proteger contra el PRRS.

**Breve Descripción de los Dibujos**

**Figura 1. (A)** Dibujo que muestra la posición y secuencia de la mutación NLS dentro de la proteína P129 de la nucleocápsida. **(B)** Fotomicrografías de células MARK-145 infectadas falsamente, infectadas con P129, e infectadas con P129-GG. La fila superior muestra placas típicas utilizando microscopía de contraste de fases, mientras que la fila inferior muestra la tinción con anticuerpo fluorescente de los focos infectados utilizando el anticuerpo monoclonal SDOW17 conjugado con FITC. Obsérvese la au-



sencia de tinción de la nucleocápsida en los núcleos y nucleolos de las células infectadas con P129-GG.

**Figura 2. (A)** Número de cerdos virémicos los días 0 a 28 después de la infección por grupos de tratamiento (7 cerdos por grupo). **(B)** Título medio de virus en los sueros de los cerdos los días 0 a 28 después de la infección, por grupo de tratamiento. **(C)** Niveles medios de anticuerpo ELISA (relaciones S/P) en los sueros de los cerdos los días 0 a 28 después de la infección, por grupo de tratamiento. **(D)** Una retitulación de los sueros representados en la Figura 2C; todas las muestras se diluyeron en relación 1:5 antes del ensayo a fin de apreciar mejor las diferencias en las muestras con títulos altos. **(E)** Títulos medios de neutralización del suero en los cerdos infectados durante el estudio de cuatro semanas.

#### **Breve Descripción de las Secuencias**

- SEQ ID NO: 1** Residuos 41–47 de la proteína N del aislado VR2332 de PRRSV norteamericano
- SEQ ID NO: 2** Secuencia de la región NoLS de VR2332
- SEQ ID NO: 3** Secuencia de la región NoLS de Lelystad
- SEQ ID NO: 4** La región NES del aislado VR2332
- SEQ ID NO: 5** La región NES del aislado Lelystad
- SEQ ID NO: 6** Secuencia de aminoácidos de la proteína N del aislado P129
- SEQ ID NO: 7** Secuencia de nucleótidos de ORF7 (codifica la proteína N) del aislado P129
- SEQ ID NO: 8** Iniciador P-SHUTTLE-FWD
- SEQ ID NO: 9** Iniciador P-SHUTTLE-REV
- SEQ ID NO: 10** Iniciador mutágeno KK43/44GG-Fwd
- SEQ ID NO: 11** Iniciador mutágeno KK43/44GG-REV
- SEQ ID NO: 12** Mutantes de delección de la Tabla 8. Secuencia de aminoácidos de la región NLS2 de P129 ts:
- SEQ ID NO: 13** Mutantes de delección de la Tabla 8. Secuencias de nucleótidos de la región NLS2 de P129 ts:
- SEQ ID NO: 14** Mutantes de delección de la Tabla 8. Secuencia de aminoácidos de la región NLS2 de P129-GG:
- SEQ ID NO: 15** Mutantes de delección de la Tabla 8. Secuencia de nucleótidos de la región NLS2 de P129-GG:
- SEQ ID NO: 16** Mutantes de delección de la Tabla 8. Secuencia de aminoácidos de la región NLS2 de P129-d43/44:



**SEQ ID NO: 17** Mutantes de delección de la Tabla 8. Secuencia de nucleótidos de la región NLS2 de P129-d43/44:

**SEQ ID NO: 18** Mutantes de delección de la Tabla 8. Secuencia de aminoácidos de la región NLS2 de P129-d43/44/46:

5 **SEQ ID NO: 19** Mutantes de delección de la Tabla 8. Secuencia de nucleótidos de la región NLS2 de P129-d43/44/46:

**SEQ ID NO: 20** Mutantes de delección de la Tabla 8. Secuencia de aminoácidos de la región NLS2 de P129-d44/46/47:

10 **SEQ ID NO: 21** Mutantes de delección de la Tabla 8. Secuencia de nucleótidos de la región NLS2 de P129-d44/46/47:

**SEQ ID NO: 22** Mutantes de delección de la Tabla 8. Secuencia de aminoácidos de la región NLS2 de P129-d46/47/48:

**SEQ ID NO: 23** Mutantes de delección de la Tabla 8. Secuencia de nucleótidos de la región NLS2 de P129-d46/47/48:

15 **SEQ ID NO: 24** P129-d43/44F

**SEQ ID NO: 25** P129-d43/44/46F

**SEQ ID NO: 26** P129-d44/46/47F

**SEQ ID NO: 27** P129-d46/47/48F

**SEQ ID NO: 28** P129-d43/44R

20 **SEQ ID NO: 29** P129-d43/44/46R

**SEQ ID NO: 30** P129-d44/46/47R

**SEQ ID NO: 31** P129-d46/47/48R

#### **Referencias Citadas**

25 Doan, D.N.P., y Dokland T. (2003). Estructura de la proteína de la nucleocápsida del virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos. *Structure* 11(11), 1445-1451. Lee, C., Calvert, G.J., Welch, S.-K.W., y Yoo, D. (2005). Un sistema genético inverso lanzado por DNA para el virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos revela que la homodimerización de la proteína de la nucleocápsida es esencial para la infectividad del virus. *Virology* 331, 47-62.

30 Rowland, R.R., Kervin, R., Kuckleburg, C., Sperlich, A., y Benfield, D.A. (1999). La localización de la proteína de la nucleocápsida del virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos al nucleolo de las células infectadas e identificación de una secuencia señal de localización nucleolar potencial. *Virus Research* 64(1), 1-12.

35 Rowland, R.R.R., Schneider, P., Fang, Y., Wootton, S., Yoo, D., Benfield, D.A. (2003). Dominios peptídicos implicados en la localización de la proteína de la nucleocápsida.

9

cápsida del virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos en el nucleolo. *Virology* 316(1), 135–145.

Rowland, R.R.R., y Yoo, D. (2003). Transporte nucleolar–citoplásmico de la proteína de la nucleocápsida del PRRSV: un caso simple de mimetismo molecular o la  
5 regulación compleja por secuencias señal de importación nucleolar, localización nucleolar y exportación nuclear. *Virus Research* 95 (1–2), 23–33.

Wootton S.K. Rowland, R.R.R., y Yoo, D. (2002). Fosforilación de la proteína de la nucleocápsida del virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos. *Journal of Virology* 76 (20), 10569–10576.

10 Wootton S.K., y Yoo D. (2003). Homo–oligomerización de la proteína de la nucleocápsida del virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos y el papel de los enlaces disulfuro. *Journal of Virology* 77 (8), 4546–4557.

Yoo, D., Wootton, S.K., Li G., Song, C., y Rowland, R.R. (2003). Colocalización e interacción de la proteína del nucleocápsida del arterivirus de los porcinos con la  
15 proteína nuclear pequeña fibrilarina asociada al RNA. *Journal of Virology* 77 (22), 12173–12183.

Yoo, D., Welch, S.–K.W., Lee, C. y Calvert, J.G. (2004). Clones infecciosos del virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos y su potencial como vectores de vacunas. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102, 143–154.

## 20 **Sumario de la Invención**

La invención proporciona un virus PRRS modificado genéticamente que se ha modificado dentro de la región NLS–2, la región NoLS, y/o la región NES de la proteína de la nucleocápsida (N) de tal modo que el virus PRRS resultante está atenuado. La presente invención proporciona adicionalmente una molécula infecciosa de RNA  
25 que codifica el virus modificado genéticamente y una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de DNA que codifica la molécula infecciosa de RNA arriba citada.

La invención proporciona también un cultivo biológicamente activo de los virus citados (es decir esencialmente exento de otros virus) y describe un vector vírico que  
30 comprende una secuencia de DNA codificante de una molécula infecciosa de RNA que codifica un virus PRRS modificado genéticamente como se ha citado arriba.

La presente invención proporciona adicionalmente una célula hospedadora transfectada que comprende cualquiera de los virus que anteceden, moléculas infecciosas de RNA, polinucleótidos aislados o vectores víricos arriba citados.

La presente invención proporciona adicionalmente una vacuna para proteger un animal porcino contra la infección por un virus PRRS, vacuna que comprende un virus PRRS modificado genéticamente como se ha citado arriba; una molécula infecciosa de RNA como se ha citado arriba que codifica el virus PRRS modificado genéticamente; una molécula de polinucleótido aislada citada arriba (opcionalmente en forma de un plásmido), que codifica el virus PRRS modificado genéticamente; o el vector vírico arriba citado que codifica el virus PRRS modificado genéticamente; en una cantidad eficaz para producir inmunoprotección contra la infección por un virus PRRS; y un vehículo aceptable para uso veterinario.

La invención proporciona adicionalmente mutaciones de NLS-2 resistentes a la reversión. Realizaciones preferidas de la invención, especialmente para propósitos de vacuna, contendrán sustituciones y/o deleciones adicionales de nucleótidos, diseñadas para minimizar la probabilidad de reversión, y para minimizar la probabilidad de que otros residuos flanqueantes muten a residuos básicos tales como lisina y arginina y restablezcan con ello un motivo NLS funcional en la región.

La presente invención proporciona adicionalmente un método para proteger un animal porcino contra la infección por un virus PRRS, que comprende vacunar el animal con una cantidad de la vacuna arriba citada que es eficaz para producir inmunoprotección contra la infección por un virus PRRS.

La invención proporciona un método para producir un virus PRRS modificado genéticamente, método que comprende mutar la secuencia de DNA codificante de una molécula infecciosa de RNA que codifica el virus PRRS como se ha descrito arriba, y expresar el virus PRRS modificado genéticamente utilizando un sistema de expresión adecuado.

Un virus PRRS, sea de tipo salvaje o modificado genéticamente, puede expresarse a partir de una molécula polinucleotídica aislada, utilizando sistemas de expresión adecuados conocidos generalmente en la técnica, ejemplos de los cuales se describen en esta solicitud. Por ejemplo, la molécula polinucleótido aislada puede encontrarse en la forma de un plásmido capaz de expresar el virus codificado en una célula hospedadora adecuada in vitro, como se describe con mayor detalle más adelante.

Otras características de la invención serán evidentes después de la revisión.

### **Descripción Detallada de la Invención**

Se describe en esta memoria método de atenuación de un virus PRRS virulento por mutación o delección de la región NLS-2, la región NoLS, o la región NES en la

62

proteína de la nucleocápsida o proteína N (codificada por ORF7) del virus, una composición inmunógena que comprende dicho virus atenuado, y un método de protección de los puercos contra el PRRS por vacunación con dichas composiciones inmunógenas. Los virus PRRS que han sido atenuados por este método deberían retener las características antigénicas de la cepa de campo virulenta y proporcionar por tanto protección más potente que las vacunas basadas en virus atenuados por cultivo de células.

La proteína de la nucleocápsida (N) de PRRSV, que es codificada por ORF7, es una proteína básica pequeña que está fosforilada (Wootton, Rowland, y Yoo, 2002) y forma homodímeros (Wootton y Yoo, 2003). La estructura cristalina ha sido determinada recientemente (Doan y Dokland, 2003). La proteína N parece tener funciones múltiples en la célula infectada. Además de formar una estructura de cápsida esférica en la cual está empaquetado el RNA genómico, un proceso que tiene lugar en el citoplasma, una porción de proteína N es transportada al núcleo y específicamente al nucleolo de la célula infectada. La secuencia de aminoácidos de la proteína N contiene dos señales de localización nuclear (NLS), una señal de localización nucleolar (NoLS), y una señal de exportación nuclear (NES) que facilitan el transporte al núcleo y al nucleolo, y la exportación del núcleo, respectivamente (Rowland et al., 1999; Rowland et al., 2003; Rowland y Yoo, 2003). Mientras se encuentra en el nucleolo, la proteína N interacciona con la pequeña proteína fibrilarina asociada al RNA nucleolar y puede regular el procesamiento del rRNA y la biogénesis del ribosoma en la célula infectada a fin de favorecer la replicación del virus (Yoo et al., 2003). En la presente invención, se demuestra que las mutaciones y deleciones dentro de los motivos NLS, NoLS, y NES de la proteína N pueden dar como resultado virus viables con tráfico nuclear aberrante, y que los virus que contienen tales mutaciones son útiles como vacunas contra el PRRS.

Las mutaciones víricas de este tipo son valiosas, sea solas o en combinación con otras mutaciones atenuantes, para diseñar nuevas vacunas contra el PRRS.

#### Definiciones

**"Una respuesta inmunoprotectora eficaz", "Inmunoprotección",** y términos análogos, para los propósitos de la presente invención, significan una respuesta inmunológica que está dirigida contra uno o más epítopes antigénicos de un patógeno a fin de proteger contra la infección por el patógeno en un animal vacunado. Para los propósitos de la presente invención, protección contra la infección por un patógeno incluye no sólo la prevención absoluta de la infección, sino también cualquier reducción detectable en el grado o tasa de infección por un patógeno, o cualquier reducción

detectable en la gravedad de la enfermedad o cualquier síntoma o condición resultante de la infección por el patógeno en el animal vacunado en comparación con un animal no vacunado infectado. Una respuesta inmunoprotectora eficaz puede inducirse en animales que no han estado infectados previamente con el patógeno y/o no están infectados con el patógeno en el momento de la vacunación. Una respuesta inmunoprotectora eficaz puede inducirse también en un animal ya infectado por el patógeno en el momento de la vacunación.

Un virus PRRS modificado genéticamente está "**atenuado**" si es menos virulento que su cepa parental sin modificar. Una cepa es "**menos virulenta**" si exhibe una disminución estadísticamente significativa en uno o más parámetros determinantes de la gravedad de la enfermedad. Tales parámetros pueden incluir nivel de viremia, fiebre, gravedad de la dificultad respiratoria, gravedad de los síntomas reproductores, o número o gravedad de las lesiones pulmonares, etc.

"**Virus PRRS europeo**" se refiere a cualquier cepa de virus PRRS que tenga las características genéticas asociadas con el virus PRRS que fue aislado por primera vez en Europa alrededor de 1991 (véase, v.g., Wensvoort, G., et al., 1991, Vet. Q., 13:121-130). Se hace referencia a veces también en la técnica al "virus PRRS europeo" como "virus Lelystad".

"**Modificado genéticamente**", tal como se utiliza en esta memoria y a no ser que se indique otra cosa, significa mutado genéticamente por intervención humana, donde "mutado" significa el reemplazamiento de un aminoácido por otro o el reemplazamiento del nucleótido codificante por otro (v.g. C en lugar de T), es decir, una denominada "sustitución", preferiblemente de una manera que el aminoácido codificado se cambia, o cualquier otra mutación tal como "delección" o "inserción". La mutación se lleva a cabo siempre en la secuencia del nucleótido codificante.

"**Célula hospedadora capaz de soportar la replicación del virus PRRS**" significa una línea de células que es capaz de generar PRRS infeccioso cuando está infectada con un virus de la invención. Tales células incluyen células macrófagos alveolares de porcino y derivados de células macrófagos alveolares de porcino, células MA-104 y derivados de células MA-104, células MARC-145 y derivados de células MARC-145, y células transfectadas con un receptor para el virus PRRS. Para la demostración del Fenotipo de placa pequeña de la invención se prefieren especialmente las células MARC-145. La expresión "célula hospedadora capaz de soportar la replicación del virus PRRS" puede incluir también células que se encuentran en un cerdo vivo.

**"Respuesta inmunológica"**, para los propósitos de esta invención, significa la producción de anticuerpos y/o células (tales como linfocitos T) que están dirigidas contra, o favorecen la descomposición o inhibición de, un epítipo antigénico particular o epítipes antigénicos particulares.

5       **"Virus PRRS norteamericano"** significa cualquier virus PRRS que tenga las características genéticas asociadas con un aislado del virus PRRS norte-americano, tales como, pero sin carácter limitante, las del virus PRRS que fue aislado por primera vez en los Estados Unidos alrededor de principios de los años 1990 (véase, v.g., Collins, J.E, et al., 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126); el aislado MN-1b del virus  
10       PRRS norteamericano (Kwang, J. et al., 1994, J. Vet. Diagn. Invest. 6:293-296); la cepa de PRRS Quebec IAF-exp91 (Mardassi, H. et al., 1995, Arch. Virol. 140:1405-1418); y el aislado VR2385 del virus PRRS norteamericano (Meng, X.-J et al., 1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801). Las características genéticas se refieren a la semejanza de secuencia de nucleótidos genómica y semejanza de secuencia de aminoácidos com-  
15       partidas por las cepas de virus PRRS norteamericano.

**"Marco de lectura abierto"**, o "ORF", como se utiliza en esta memoria, significa la secuencia de nucleótidos mínima requerida para codificar una proteína del virus PRRS particular sin un codón de parada intermedio.

**"Porcino"** y **"puerco"** se utilizan intercambiabilmente en esta memoria y hacen  
20       referencia a cualquier animal que es un miembro de la familia Suidae tal como, por ejemplo, un cerdo. El término "virus PRRS", como se utiliza en esta memoria, a no ser que se indique otra cosa, significa cualquier cepa de los virus PRRS norteamericano o europeo.

**"PRRS"** abarca los síntomas de enfermedad en los puercos causados por una  
25       infección con el virus PRRS. Ejemplos de tales síntomas incluyen, pero sin carácter limitante, fiebre, aborto en las hembras preñadas, dificultad respiratoria, lesiones pulmonares, pérdida de apetito y mortalidad en los cerdos jóvenes. Como se utiliza en esta memoria, un virus PRRS que es "incapaz de producir PRRS" hace referencia a un virus que puede infectar un cerdo, pero que no produce ninguno de los síntomas de  
30       enfermedad asociados normalmente con una infección por PRRS en el cerdo.

**"Proteína N"** o **"ORF7" del PRRSV**, tal como se utiliza en esta memoria, se define como un polipéptido que es codificado por el ORF7 de ambos genotipos europeo y norteamericano del virus PRRS. Ejemplos de isotipos específicos de la proteína N que se conocen actualmente son el polipéptido de 123 aminoácidos del aislado VR2322  
35       del prototipo de PRRS norteamericano consignado en Genbank por el número de ac-

25

ceso PRU87392, y la proteína N de 128 residuos del aislado Lelystad del PRRS prototipo europeo consignado en Genbank con el número de acceso A26843.

**"Región NLS-1 de la proteína N de PRRSV" o "región NLS-1 del ORF7 de PRRSV"** hace referencia a una señal de localización nuclear "pat4" o "nuc1" (Nakai & Kanehisa, 1992; Rowland & Yoo, 2003) que contiene cuatro aminoácidos básicos continuos (lisina o arginina), o tres residuos básicos y una histidina o prolina, localizados dentro de aproximadamente los 15 primeros residuos N-terminales de la proteína N madura. A modo de ejemplo, la secuencia de la región NLS-1 de VL2332 es KRKK y está localizada en los residuos 9-12, mientras que la secuencia del aislado Lelystad es KKKK y está localizada en los residuos 10-13 de la proteína N.

**"La región NLS-2 la proteína N de PRRSV" o "región NLS-2 de ORF7 de PRRSV"** hace referencia a una segunda señal de localización nuclear dentro de la proteína N que puede adoptar una de dos formas. En los virus PRRS norteamericanos, NLS-2 tiene un patrón que ha sido designado por los autores de la presente invención como el motivo "pat8", que comienza con una prolina seguida dentro de tres residuos por una secuencia de cinco residuos que contiene al menos tres residuos básicos (K o R) de un total de cinco (una ligera modificación del motivo "pat7" o "nuc3" descrito por Nakai & Kanehisa, 1992; Rowland & Yoo, 2003). A modo de ejemplo, una secuencia de este tipo está localizada en los residuos 41-47 de la proteína N del aislado VR2332 de PRRSV norteamericano, y se representa por la secuencia PGKKNKKK (**SEQ ID NO: 1**). En los virus PRRS europeo, NLS-2 tiene un motivo "pat4" o "nuc1", que es un tramo continuo de cuatro aminoácidos básicos o tres residuos básicos asociados con histidina o prolina (Nakai & Kanehisa, 1992; Rowland & Yoo, 2003). La NLS-2 del aislado Lelystad de PRRSV europeo está localizada en los residuos 47-50 y se representa por la secuencia KKKK.

**"Región NoLS de la proteína N de PRRSV" o "región NoLS de ORF7 de PRRSV"** hace referencia a una señal de localización nucleolar que tiene una longitud total de aproximadamente 32 aminoácidos y que incorpora la región NLS-2 cerca de su término amino. A modo de ejemplo, la secuencia de la región NoLS de VR2332 está localizada en los residuos 41-72 y se representa por la secuencia PGKKNKKKNPEKPHFPLATEDDVRHHFTPSE (**SEQ ID NO: 2**) (Rowland & Yoo, 2003) y la secuencia del aislado Lelystad correspondiente está localizada en los residuos 42-73 y se representa por la secuencia PRGGQAKKKKPEKPHFPLAAEDDIRHHLTQTER (**SEQ ID NO: 3**).

66

"Región NES de la proteína N de PRRSV" o "región NES de ORF7 de PRRSV" hace referencia a una señal de exportación nuclear que contiene un motivo LXL localizado cerca del terminal del extremo del terminal carboxi de la proteína N. El motivo NES es X-R (2-5)-X-R2-X-R-Y donde X es leucina, isoleucina o valina, Y es leucina, isoleucina, valina o alanina y R es cualquier aminoácido. Como se muestra más adelante, los aislados de los prototipos norteamericano y Europa están de acuerdo con este esquema, teniendo ambos un espaciador de 5 residuos.

"Célula hospedadora transfectada" significa prácticamente cualquier célula hospedadora que, como se describe en la patente US 5.600.662, cuando se transfecta con RNA del virus PRRS, puede producir una primera tanda de viriones de PRRS. Si se desea infección productiva adicional, podría utilizarse una "célula hospedadora capaz de soportar la replicación del virus PRRS" como se define más adelante.

Las moléculas de polinucleótidos pueden mutarse genéticamente utilizando métodos recombinantes conocidos por quienes poseen una experiencia ordinaria en la técnica, con inclusión de mutagénesis orientada, o por mutagénesis aleatoria, por ejemplo por exposición a mutágenos químicos o a radiación, como es conocido en la técnica. Dichas mutaciones pueden llevarse a cabo por métodos estándar conocidos en la técnica, v.g., mutagénesis orientada (véase, v.g., Sambrook et al (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) de una copia infecciosa como se ha descrito (v.g. Meulenberg et al., Adv. Exp. Med. Biol, 1998, 440:199-206).

De acuerdo con ello, la presente invención proporciona adicionalmente un método para producir un virus PRRS norteamericano modificado genéticamente, método que comprende dar la secuencia de DNA codificante de una molécula de RNA infecciosa que codifica el virus PRRS como se ha descrito arriba, y expresar el virus PRRS modificado genéticamente utilizando un sistema de expresión adecuado. Un virus PRRS modificado genéticamente puede ser expresado por una molécula de polinucleótido aislada utilizando sistemas de expresión adecuados conocidos en la técnica, ejemplos de los cuales se describen en esta solicitud. Por ejemplo, la molécula de polinucleótido aislada puede encontrarse en la forma de un plásmido capaz de expresar el virus codificado en una célula hospedadora adecuada in vitro, como se describe más adelante con mayor detalle.

Las secuencias de la proteína N de PRRSV norteamericano están altamente conservadas y las secuencias consignadas tienen aproximadamente 93-100% de identidad unas con otras. Las proteínas N de PRRSV norteamericano y Europa son

6X

idénticas aproximadamente en un 57–59% y comparten motivos estructurales comunes.

A modo de ejemplo, la secuencia de la región NES de VR2332 está localizada en los residuos 106–117 y se representa por la secuencia LPTHHTVRLIRV (**SEQ ID NO: 4**) (Rowland & Yoo, 2003) y la secuencia del aislado Lelystad está localizada en los residuos 107–118 y se representa por la secuencia LPVAHTVRLIRV (**SEQ ID NO: 5**).

En el consenso que sigue, que incluye todas las secuencias contenidas en las secuencias PRRSV norteamericano incluidas en Genbank, las posiciones con un (\*) están completamente conservadas. Bajo cada posición se muestran aminoácidos alternativos.

**LPTHHTVRLIRV (SEQ ID NO: 4)**

**\*\*VAQ\*\*\*\*\*A**

Q  
V  
G

La numeración de los aminoácidos referenciados arriba está de acuerdo con las entradas en la base de datos mencionadas. En todos los restantes aislados de PRRS, que podrían numerarse de modo diferente, la identificación de las regiones apropiadas se consigue fácilmente por identificación de los aminoácidos característicos conservados en una cepa PRRS de interés y alineación de la misma con una cepa de referencia. Es un objeto de la presente invención modificar un PRRS o sus ácidos nucleicos codificantes de tal modo que una o más regiones conservadas se eliminan por sustitución, delección o inserción, dando como resultado un fenotipo atenuado.

Delecciones, inserciones, o sustituciones que eliminan el motivo NLS2 conservado, la región NoLS, o el motivo NES se introducen por modificación de nucleótidos en los virus codificantes de la invención. En una realización preferida, una delección o inserción que comprende 1, 2, 3, 4 ó 5 aminoácidos da como resultado la eliminación de un motivo conservado y conduce a un virus atenuado.

**Los aminoácidos pueden clasificarse de acuerdo con sus propiedades físicas y su contribución a la estructura secundaria y terciaria de las proteínas. Una sustitución conservadora se reconoce en la técnica como una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares. Sustituciones conservadoras ilustrativas se presentan inmediatamente a continuación en la**

200

**Tabla 1 (tomada del documento WO 97/09433, página 10, publicado el 13 de marzo de 1997 (PCT/GB96/02197, presentado en fecha 9/6/96)).**

**Tabla 1**

**Sustituciones conservadoras I**

**CARACTERÍSTICA DE LA**

**CADENA LATERAL**

**AMINOÁCIDO**

Alifática

No-polar

G A P

I L V

Polar – sin carga

C S T M

N Q

Polar: cargada

D E

K R

Aromática

H F W Y

Otras

N Q D E

5

Alternativamente, aminoácidos conservadores pueden agruparse como se describe en Lehninger [Biochemistry, 2ª Edición; Worth Publishers, Inc. Nueva York:Nueva York (1975), pp. 71–77] como se expone inmediatamente a continuación en la Tabla 2.

**Tabla 2**

**Sustituciones Conservadoras II**

**CADENA LATERAL**

**CARACTERÍSTICA**

**AMINOÁCIDO**

10

No polar (hidrófoba)

A. Alifática:

A L I V P

B. Aromática:

F W

C. Sulfurada

M

D. Límite:

G

Sin carga-polar

A. Hidroxilo:

S T Y

B. Amida:

N Q

C. Sulfhidrilo:

C

D. Límite:

G

69

Cargada positivamente (básica): K R H

Cargada negativamente (ácida): D E

Como otra alternativa adicional, sustituciones conservadoras ilustrativas se exponen inmediatamente a continuación en la Tabla 3.

**Tabla 3**

5

**Sustituciones Conservadoras III**

| <b>Residuo Original</b> | <b>Sustitución Ilustrativa</b> |
|-------------------------|--------------------------------|
| 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 PRRS Modificado Genéticamente**

10

La tecnología del DNA recombinante comprende técnicas de biología molecular extremadamente variadas y poderosas encaminadas a la modificación de ácidos nucleicos al nivel del DNA y hace posible analizar y modificar genomas al nivel molecular. A este respecto, los virus tales como el virus PRRS, debido al pequeño tamaño de su genoma, son particularmente adecuados para tales manipulaciones. Sin embargo,

la tecnología del DNA recombinante no es inmediatamente aplicable a virus de RNA no retrovéricos, dado que estos virus no incluyen un paso intermedio de DNA en su replicación. Para tales virus, tienen que desarrollarse clones de cDNA infecciosos antes de poder aplicar la tecnología del DNA recombinante a su genoma para generar virus modificados. Los clones infecciosos pueden derivarse por la construcción de cDNA de longitud total (longitud genómica) (utilizado en este caso en el sentido amplio de una copia de DNA de RNA y no sólo en el sentido estricto de una copia de DNA de mRNA) del virus objeto de estudio, después de lo cual se sintetiza in vivo un transcrito infeccioso en las células transfectadas con el cDNA de longitud total, pero pueden obtenerse también transcritos infecciosos por transcripción in vitro a partir de fragmentos de cDNA de longitud parcial ligados in vitro que comprenden el genoma completo del virus. En todos los casos, el RNA transcrito lleva todas las modificaciones que se han introducido en el cDNA y puede utilizarse para sometimiento ulterior a pasos del virus así modificado.

La preparación de un clon infeccioso de un aislado del virus PRRS europeo o virus Lelystad se describe en la patente U.S. No. 6.268.199 que se incorpora en esta memoria completamente por referencia. La preparación de un clon de cDNA infeccioso de un aislado del virus PRRS norteamericano designado P129 (Lee et al., 2005; Yoo et al., 2004) se describe en la patente US 6.500.662 que se incorpora por la presente totalmente por referencia. La secuencia de cDNA de P129 se describe en el Número de Acceso a Genbank AF494042 y en la patente US 6.500.662. El trabajo de los autores de la presente invención que sigue hace uso de un clon infeccioso de este tipo que, en el contexto de un plásmido, se expresa por el promotor temprano inmediato CMV y ha sido designado pCMV-S-P129 y se describe también en la patente US 6.500.662. Como se describe en la patente US 6.500.662, existen otros plásmidos y promotores adecuados para uso en esta invención.

Dada la secuencia completa de cualquier marco de lectura abierto de interés y la localización de un residuo de aminoácido de interés, una persona con experiencia ordinaria necesita simplemente consultar una tabla de codones para diseñar cambios en la posición particular deseada.

Una tabla de aminoácidos y sus abreviaturas, símbolos y codones representativos se expone a continuación en la **Tabla 4** siguiente.

**Tabla 4**

| 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 |
| 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 |     |     |     |     |

Los codones constituyen secuencias de tripletes de nucleótidos en mRNA y sus moléculas de cDNA correspondientes. Los codones se caracterizan por la base uracilo (U) cuando están presentes en una molécula de mRNA, pero se caracterizan por la base timidina (T) cuando están presentes en DNA. Un cambio simple en un codón para el mismo residuo de aminoácido dentro de un nucleótido no cambiará la secuencia o estructura del polipéptido codificado. Es evidente que cuando una frase indica que una secuencia particular de 3 nucleótidos "codifica" cualquier aminoácido particular, el profesional con experiencia ordinaria podría reconocer que la tabla anterior proporciona un medio para identificar los nucleótidos particulares en cuestión. A modo de ejemplo, si una secuencia particular de tres nucleótidos codifica lisina, la tabla anterior indica que las dos secuencias de tripletes posibles son AAA y AAG. La glicina es codificada por GGA, GGC, GGT (GGU si se trata de RNA) y GGG. Para cambiar un resi-

72

duo lisina a glicina en una proteína codificada, podría reemplazarse un triplete AAA o AAG con cualquiera de GGA y GGG, GGT o GGG en el ácido nucleico codificante. La secuencia codificante de la proteína N o ORF del aislado P129 se ilustra a continuación.

5

10

15

20

25

| Tabla 5 --- Secuencia codificante de la proteína N del aislado P129 |          |          |                |                |          |          |          |          |          |          |          |                |
|---------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------------|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------|
| <u>M</u>                                                            | <u>P</u> | <u>N</u> | <u>N</u>       | <u>N</u>       | <u>G</u> | <u>K</u> | <u>Q</u> | <u>Q</u> | <u>K</u> | <u>K</u> | <u>K</u> | <sup>12</sup>  |
| ATG                                                                 | CCA      | AAT      | AAC            | AAC            | GGC      | AAG      | CAG      | CAA      | AAG      | AAA      | AAG      | <sup>36</sup>  |
| <u>K</u>                                                            | <u>G</u> | <u>N</u> | <u>G</u>       | <u>Q</u>       | <u>P</u> | <u>V</u> | <u>N</u> | <u>Q</u> | <u>L</u> | <u>C</u> | <u>Q</u> | <sup>24</sup>  |
| AAG                                                                 | GGG      | AAT      | GGC            | CAG            | CCA      | GTC      | AAT      | CAG      | CTG      | TGC      | CAG      | <sup>72</sup>  |
| <u>M</u>                                                            | <u>L</u> | <u>G</u> | <u>K</u>       | <u>I</u>       | <u>I</u> | <u>A</u> | <u>Q</u> | <u>Q</u> | <u>N</u> | <u>Q</u> | <u>S</u> | <sup>36</sup>  |
| ATG                                                                 | CTG      | GGT      | AAA            | ATC            | ATC      | GCC      | CAG      | CAA      | AAC      | CAG      | TCC      | <sup>108</sup> |
| <u>R</u>                                                            | <u>G</u> | <u>K</u> | <u>G</u>       | <u>P</u>       | <u>G</u> | <u>K</u> | <u>K</u> | <u>S</u> | <u>K</u> | <u>K</u> | <u>K</u> | <sup>48</sup>  |
| AGA                                                                 | GGC      | AAG      | GGA            | CCG            | GGC      | AAG      | AAA      | AGT      | AAG      | AAG      | AAA      | <sup>144</sup> |
| <u>N</u>                                                            | <u>P</u> | <u>E</u> | <u>K</u>       | <u>P</u>       | <u>H</u> | <u>F</u> | <u>P</u> | <u>L</u> | <u>A</u> | <u>T</u> | <u>E</u> | <sup>60</sup>  |
| AAC                                                                 | CCG      | GAG      | AAG            | CCC            | CAT      | TTT      | CCT      | CTA      | GCG      | ACC      | GAA      | <sup>180</sup> |
| <u>D</u>                                                            | <u>D</u> | <u>V</u> | <u>R</u>       | <u>H</u>       | <u>H</u> | <u>F</u> | <u>T</u> | <u>P</u> | <u>G</u> | <u>E</u> | <u>R</u> | <sup>72</sup>  |
| GAT                                                                 | GAC      | GTC      | AGG            | CAT            | CAC      | TTC      | ACC      | CCT      | GGT      | GAG      | CGG      | <sup>216</sup> |
| <u>Q</u>                                                            | <u>L</u> | <u>C</u> | <u>L</u>       | <u>S</u>       | <u>S</u> | <u>I</u> | <u>Q</u> | <u>T</u> | <u>A</u> | <u>F</u> | <u>N</u> | <sup>84</sup>  |
| CAA                                                                 | TTG      | TGT      | CTG            | TCG            | TCG      | ATC      | CAG      | ACT      | GCC      | TTT      | AAC      | <sup>252</sup> |
| <u>Q</u>                                                            | <u>G</u> | <u>A</u> | <u>G</u>       | <u>T</u>       | <u>C</u> | <u>T</u> | <u>L</u> | <u>S</u> | <u>D</u> | <u>S</u> | <u>G</u> | <sup>96</sup>  |
| CAG                                                                 | GGC      | GCT      | GGA            | ACT            | TGT      | ACC      | CTG      | TCA      | GAT      | TCA      | GGG      | <sup>288</sup> |
| <u>R</u>                                                            | <u>I</u> | <u>S</u> | <u>Y</u>       | <u>T</u>       | <u>V</u> | <u>E</u> | <u>F</u> | <u>S</u> | <u>L</u> | <u>P</u> | <u>T</u> | <sup>108</sup> |
| AGG                                                                 | ATA      | AGT      | TAC            | ACT            | GTG      | GAG      | TTT      | AGT      | TTG      | CCG      | ACG      | <sup>324</sup> |
| <u>H</u>                                                            | <u>H</u> | <u>T</u> | <u>V</u>       | <u>R</u>       | <u>L</u> | <u>I</u> | <u>R</u> | <u>V</u> | <u>T</u> | <u>A</u> | <u>S</u> | <sup>120</sup> |
| CAT                                                                 | CAT      | ACT      | GTG            | CGC            | CTG      | ATC      | CGC      | GTC      | ACA      | GCA      | TCA      | <sup>360</sup> |
| <u>P</u>                                                            | <u>S</u> | <u>A</u> | <sup>123</sup> | (SEQ ID NO: 6) |          |          |          |          |          |          |          |                |
| CCC                                                                 | TCA      | GCA      | <sup>369</sup> | (SEQ ID NO: 7) |          |          |          |          |          |          |          |                |

La construcción de una secuencia de polinucleótidos mutante de la proteína N modificada en las regiones NLS-2 se demuestra a modo de ejemplo ilustrativo en el **Ejemplo 2.**

Se apreciará que mutaciones en las regiones NLS-1, NoLS o NES pueden realizarse con técnicas similares y resultados similares.

#### **Demostración de que un Virus PRRS Modificado Genéticamente está Atenuado**

Para demostrar que una cepa particular modificada genéticamente está atenuada podría utilizarse un experimento como el que se describe a continuación.

13

Se incluyen en cada prueba al menos 10 cerdas jóvenes por grupo, procedentes de una granja exenta de PRRSV. Se comprueba que los animales están exentos de anticuerpos específicos del virus PRRS y son negativos para PRRSV. Todos los animales incluidos en la prueba son de la misma procedencia y raza. La asignación de los animales a los grupos es aleatoria.

Se realiza el enfrentamiento el día 90 de la preñez con aplicación intranasal de 1 ml de PRRSV con  $10^5$  TCID<sub>50</sub> en cada orificio nasal. Hay al menos tres grupos por cada disposición de ensayo. Un grupo para enfrentamiento a P129; un grupo de ensayo para enfrentamiento con el virus posiblemente atenuado; y un grupo de control estricto.

El estudio se considera válido cuando los controles estrictos se mantienen negativos a PRRSV durante todo el desarrollo del estudio y nacen como mínimo 25% menos de lechones vivos sanos en el grupo enfrentado a P129 en comparación con los controles estrictos.

La atenuación, o dicho de otro modo menor virulencia, se define como el cambio estadísticamente significativo de uno o más parámetros que determinan la eficiencia reproductora u otra sintomatología:

Reducción significativa en al menos uno de los parámetros siguientes para el grupo de ensayo (virus posiblemente atenuado) en comparación con el grupo infectado con la cepa parental sin modificar sería una indicación de atenuación:

- a) frecuencia de nacidos muertos
- b) aborto en o antes del día 112 de la preñez
- c) número de lechones momificados
- d) número de lechones menos vivaces y débiles
- e) mortalidad antes del destete

Adicionalmente, se prefiere un aumento significativo en uno de los parámetros siguientes para el grupo de ensayo comparado con el grupo infectado con la cepa parental sin modificar:

- f) número de lechones destetados por cerda
- g) número de lechones sanos vivos nacidos por cerda

Como alternativa, podrían examinarse los síntomas respiratorios y otros síntomas de la infección por PRRSV para establecer la atenuación como se describe en el Ejemplo 3 más adelante.

### **Vacunas**

Una cepa atenuada es valiosa para formulación de vacunas.

La vacuna presente es eficaz si la misma protege un cerdo contra la infección por un virus PRRS. Una vacuna protege un cerdo contra la infección por un virus PRRS si, después de la administración de la vacuna a uno o más cerdos no afectados, un enfrentamiento subsiguiente con un aislado biológicamente puro del virus (v.g., VR2385, VR2326, P129, etc.) da como resultado una menor gravedad de cualesquiera cambios evidentes o histopatológicos (v.g., lesiones en el pulmón) y/o de síntomas de la enfermedad, en comparación con los cambios o síntomas causados típicamente por el aislado en cerdos similares que no están protegidos (es decir, con relación a un control apropiado). Más particularmente, puede demostrarse que la presente vacuna es eficaz por administración de la vacuna a uno o más cerdos adecuados que se encuentran en necesidad de ello, y luego, después de un período de tiempo apropiado (v.g., 3 semanas), enfrentamiento con una muestra grande ( $10^{(3-7)}$  TCID<sub>(50)</sub>) de un aislado de PRRSV biológicamente puro. Se extrae luego una muestra de sangre del cerdo sometido al enfrentamiento al cabo de aproximadamente una semana, y se realiza después un intento de aislar el virus de la muestra de sangre (v.g., véase el procedimiento de aislamiento de virus ilustrado en el Experimento VIII más adelante). El aislamiento de una gran cantidad del virus es una indicación de que la vacuna puede no ser eficaz, mientras que el aislamiento de cantidades reducidas del virus (o la ausencia de virus) es una indicación de que la vacuna puede ser eficaz.

Así pues, 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 (v.g., aislamiento de PRRSV de la sangre, detección de antígeno de PRRSV en una muestra de tejido de pulmón, amígdala o ganglio linfático por un inmunoensayo). Los síntomas de la enfermedad reproductora y respiratoria de los porcinos pueden evaluarse cuantitativamente (v.g., temperatura/fiebre), semi-cuantitativamente (v.g., gravedad de la dificultad respiratoria [explicada en detalle más adelante], o cualitativamente (v.g., la presencia o ausencia de uno o más síntomas o una reducción en la gravedad de uno o más síntomas, tales como cianosis, neumonía, lesiones pulmonares, etc.).

Un cerdo no afectado es un cerdo que o bien no ha estado expuesto a un agente infeccioso de la enfermedad reproductora y respiratoria de los porcinos, o que ha estado expuesto a un agente infeccioso de la enfermedad reproductora y respiratoria de los porcinos pero no presenta síntomas de la enfermedad. Un cerdo afectado es uno que exhibe síntomas de PRRS o del cual puede aislarse PRRSV.



Las vacunas de la presente invención pueden formularse siguiendo el convenio aceptado para incluir vehículos aceptables para animales, con inclusión de humanos (en su caso), tales como tampones, estabilizadores, diluyentes, conservantes y/o solubilizadores estándar, y puede formularse también para facilitar liberación prolongada.

5 Los diluyentes incluyen agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, y análogos. Los aditivos para isotonicidad incluyen cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol, y lactosa, entre otros. Los estabilizadores incluyen albúmina, entre otros. Otros vehículos y aditivos de vacunas adecuados, con inclusión de aquéllos que son particularmente útiles en la formulación de vacunas vivas modificadas, son conocidos o serán  
10 evidentes para los expertos en la técnica, véase, v.g., Remington's Pharmaceutical Science, Edición 18ª, 1990, Mack Publishing, que se incorpora en esta memoria por referencia.

Las vacunas de la presente invención pueden comprender además uno o más componentes inmunomoduladores adicionales tales como, v.g., un adyuvante o cito-  
15 quina, entre otros. Ejemplos no limitantes de adyuvantes que pueden utilizarse en la vacuna de la presente invención incluyen el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), alumbre, geles minerales tales como gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite-en-agua, emulsiones de agua-en-aceite tales como, v.g., los adyuvantes completo e incompleto de Freund, copolímero Block (CytRx, Atlanta, Ga.),  
20 QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge, Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville, Calif.), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A u otra fracción de saponina, el monofosforil-lípido A, y el adyuvante lípido-amina, Avridina. Ejemplos no limitantes de emulsiones de aceite-en-agua útiles en la vacuna de la invención incluyen las formulaciones modificadas SEAM 62 y SEAM 1/2. SEAM 62 modificada es una emulsión de  
25 aceite-en-agua que contiene 5% (v/v) de escualeno (Sigma), 1% (v/v) de detergente SPAN® 85 (ICI Surfactants), 0,7% (v/v) de detergente Tween® 80 (ICI Surfactants), 2,5% (v/v) de etanol, 200 µg/ml de Quil A, 100 µg/ml de colesterol, y 0,5% (v/v) de lecitina. SEAM 1/2 modificada es una emulsión de aceite-en-agua que comprende 5% (v/v) de escualeno, 1% (v/v) de detergente SPAN® 85, 0,7% (v/v) de detergente Tween  
30 80, 2,5% (v/v) de etanol, 100 µg/ml de Quil A, y 50 µg/ml de colesterol. Otros agentes inmunomoduladores que pueden incluirse en la vacuna incluyen, v.g., una o más interleuquinas, interferones, u otras citoquinas conocidas.

Las vacunas de la presente invención pueden formularse opcionalmente para liberación prolongada del virus, la molécula infecciosa de RNA, el plásmido o el vector  
35 vírico de la presente invención. Ejemplos de tales formulaciones de liberación prolon-

76

gada incluyen virus, molécula infecciosa de RNA, plásmido, o vector vírico en combinación con composiciones de polímeros biocompatibles, tales como, v.g., poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, colágeno y análogos. La estructura, selección y uso de polímeros degradables en vehículos de suministro de fármacos han sido revisados en varias publicaciones, que incluyen A. Domb et al., 1992, *Polymers for Advanced Technologies* 3: 279-292, que se incorpora en esta memoria por referencia. Orientación adicional en la selección y utilización de polímeros en formulaciones farmacéuticas pueden encontrarse en textos conocidos en la técnica, por ejemplo M. Chasin y R. Langer (compiladores), 1990, "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems" en: *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Vol. 45, M. Dekker, N.Y., que se incorpora también en esta memoria por referencia. Como alternativa, o adicionalmente, el virus, plásmido, o vector vírico puede estar microencapsulado para mejorar la administración y eficacia. Métodos para microencapsulación de antígenos son bien conocidos en la técnica, e incluyen métodos descritos, v.g., en los documentos 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; y la Publicación de Patente Internacional WO 95/28227, todos los cuales se incorporan en esta memoria por referencia.

También pueden utilizarse liposomas para proporcionar la liberación prolongada de virus, plásmido, o vector vírico. Detalles concernientes al modo de producir y utilizar formulaciones de liposomas pueden encontrarse, entre otros lugares, en los documentos U.S. Pat. No. 4.016.100; U.S. Pat. No. 4.452.747; U.S. Pat. No. 4.921.706; U.S. Pat. No. 4.927.637; U.S. Pat. No. 4.944.948; U.S. Pat. No. 5.008.050; y U.S. Pat. No. 5.009.956, todos los cuales se incorporan en esta memoria por referencia.

Una cantidad eficaz de cualquiera de las vacunas arriba descritas puede determinarse por medios convencionales, comenzando con una dosis baja de virus, plásmido o vector vírico, y aumentando luego la dosificación al tiempo que se observan los efectos. Una cantidad eficaz puede obtenerse después de una sola administración de una vacuna o después de administraciones múltiples de una vacuna. Factores conocidos pueden tomarse en consideración cuando se determina una dosis óptima por animal. Éstos incluyen la especie, el tamaño, la edad y el estado general del animal, la presencia de otros fármacos en el animal, y análogos. La dosificación real se selecciona preferiblemente después de la consideración de los resultados a partir de otros estudios con animales.

Un método para detectar si se ha conseguido una respuesta inmune adecuada consiste en determinar la seroconversión y el título de anticuerpos en el animal después de la vacunación. El momento oportuno de la vacunación y el número de refuerzos, en su caso, serán determinados preferiblemente por un médico o veterinario basándose en el análisis de todos los factores relevantes, algunos de los cuales se han descrito arriba.

La cantidad de dosis eficaz de virus, molécula infecciosa de RNA, plásmido, o vector vírico, de la presente invención puede determinarse utilizando técnicas conocidas, tomando en consideración factores que pueden ser determinados por una persona con experiencia ordinaria en la técnica tales como el peso del animal a vacunar. La cantidad de dosis de virus de la presente invención en una vacuna de la presente invención es con preferencia desde aproximadamente  $10^1$  a aproximadamente  $10^9$  pfu (unidades formadoras de placas), de modo más preferible desde aproximadamente  $10^2$  a aproximadamente  $10^8$  pfu, y de modo muy preferible desde aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^7$  pfu. La cantidad de dosis de un plásmido de la presente invención en una vacuna de la presente invención es con preferencia desde aproximadamente 0,1  $\mu$ g a aproximadamente 100 mg, de modo más preferible desde aproximadamente 1  $\mu$ g a aproximadamente 10 mg, y de modo todavía más preferible desde aproximadamente 10  $\mu$ g a aproximadamente 1 mg. La cantidad de dosis de una molécula infecciosa de RNA de la presente invención en una vacuna de la presente invención es con preferencia desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg, de modo más preferible desde aproximadamente 1  $\mu$ g a aproximadamente 10 mg, y de modo todavía más preferible desde aproximadamente 10  $\mu$ g a aproximadamente 1 mg. La cantidad de dosis de un vector vírico de la presente invención en una vacuna de la presente invención es con preferencia desde aproximadamente  $10^1$  pfu a aproximadamente  $10^9$  pfu, de modo más preferible desde aproximadamente  $10^2$  pfu a aproximadamente  $10^8$  pfu, y de modo todavía más preferible desde aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^7$  pfu. Un tamaño de dosificación adecuado es desde aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 10 ml, y de modo más preferible desde aproximadamente 1 ml a aproximadamente 5 ml.

A modo de ejemplo, las vacunas pueden administrarse por vía oral, parenteral, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intranasal o intravenosa. El suministro oral puede comprender, por ejemplo, añadir las composiciones a la comida o la bebida de los animales. Factores que influyen en la dosificación de la vacuna incluyen, por ejemplo, el peso y la edad del cerdo.

La presente invención proporciona adicionalmente un método de preparación de una vacuna que comprende un virus PRRS, molécula infecciosa de RNA, plásmido, o vector vírico descrito en esta memoria, método que comprende combinar una cantidad eficaz de uno del virus PRRS, la molécula infecciosa de RNA, el plásmido, o el vector vírico de la presente invención, con un vehículo aceptable para uso farmacéutico o veterinario.

Adicionalmente, la vacuna viva atenuada de la presente invención puede modificarse como se describe en la patente US 6.500.662 para codificar un epítipo heterólogo antigénico que se inserta en el genoma vírico del PRRS utilizando técnicas recombinantes conocidas. Epítopes antigénicos útiles como epítopes antigénicos heterólogos para la presente invención incluyen epítopes antigénicos de un patógeno del puerco distinto del virus PRRS que incluyen, pero sin carácter limitante, un epítipo antigénico de un patógeno del puerco seleccionado del grupo constituido por parvovirus porcino, circovirus porcino, un rotavirus porcino, gripe del puerco, virus de la pseudorrabia, virus de la gastroenteritis transmisible, coronavirus respiratorio porcino, virus de la fiebre clásica del puerco, virus de la fiebre africana del puerco, virus de la encefalomiocarditis, paramixovirus de los porcinos, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Bacillus anthraci*, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium haemoliticum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Haemophilus parasuis*, *Leptospira spp.*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynovia*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus equismilis*, y *Streptococcus suis*. Secuencias de nucleótidos que codifican epítopes antigénicos de los patógenos del puerco mencionados anteriormente se conocen en la técnica y pueden obtenerse de bases de datos públicas de genes tales como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Genbank/index.html>) proporcionada por NCBI.

Características y variaciones adicionales de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la totalidad de esta solicitud, con inclusión de la descripción detallada, y la totalidad de dichas características deben considerarse como aspectos de la invención. Análogamente, características de la invención descritas en esta memoria pueden recombinarse en realizaciones adicionales que deben considerarse también como aspectos de la invención, con indiferencia de si la combinación de características se ha mencionado específicamente arriba como un aspecto o realización de la invención. Asimismo, únicamente aquellas limitaciones que se describen en esta memoria como críticas para la invención deben considerarse como tales; las va-

riaciones de la invención que carezcan de limitaciones que no hayan sido descritas en esta memoria como críticas deben considerarse como aspectos de la invención. Estará claro que la invención puede practicarse de modo distinto al que se ha descrito particularmente en la descripción que antecede y los ejemplos.

5           Numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención son posibles a la vista de la doctrina anterior y, por consiguiente, están dentro del alcance de la invención.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos siguientes, pero sin limitarse a los mismos.

10       **Ejemplo 1: Construcción del plásmido lanzadera pTB-shuttle-PRRSV-3997**

Se construyó un plásmido lanzadera a fin de facilitar la introducción de modificaciones específicas en un clon de cDNA genómico del virus PRRS de longitud total. Un fragmento de 3.997 pb, que representaba el final del extremo 3' del genoma vírico (posiciones de nucleótidos 11.504 a 15.416, con inclusión de una cola de poliadenosina de 21 residuos) y 84 pb de secuencias vectoras de aguas abajo, se amplificó por PCR. La reacción PCR incluía 5 ng del DNA plasmídico pCMV-S-P129 (documento US 6.500.662 B1), 300 ng del iniciador directo P-shuttle-Fwd (5' ACTCAGTC-TAAGTGCTGGAAAGTTATG-3') (**SEQ ID NO: 8**): posiciones 11.504 a 11.530), 300 ng del iniciador inverso P-shuttle-Rev (5'-ATCTTATCATGTCTGGATCCCCGCGGC-3') (**SEQ ID NO: 9**): posiciones 15.500 a 15.475), 1 mM de cada uno de dCTP, dGTP, dATP, y dTTP, 1 x tampón PCR [KCl 10 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8,8), MgSO<sub>4</sub> 2 mM, 0,1% de Triton X-100], y 2,5 U de DNA-polimerasa de *Pfu* (Stratagene), utilizando el sistema PCR GeneAmp 2400 (Perkin Elmer). La mezcla de reacción se calentó durante 5 min a 95°C y se sometió a 35 ciclos de amplificación en las condiciones siguientes: desnaturalización a 95°C durante 30 s, reasociación de iniciadores a 55°C durante 1 min, y extensión a 72°C durante 3 min. El producto PCR se clonó en el vector pTrueBlue utilizando el kit de clonación PCR TrueBlue MicroCartridge™ XL (Genomics One; Buffalo, Nueva York) para crear pTB-shuttle-PRRSV-3997.

25       **Ejemplo 2: Modificación de la secuencia NLS-2 para generar el virus P129-GG**

30           Se utilizó mutagénesis orientada basada en PCR para modificar el motivo de la señal de localización nuclear 2 (NLS-2) localizado en las posiciones de aminoácidos 41 a 47 de la proteína de la nucleocápsida (N). Entre los virus PRRS del genotipo norteamericano, este motivo NLS es generalmente PGKKNKK (como en el aislado prototipo VR-2332 o el aislado de Canadá PA-8), o un derivado del mismo, tal como PGKSKKK (encontrado en los aislados P129 y 93-47324). Se cree que la presencia

35



de residuos múltiples cargados positivamente lisina (K) o arginina (R) es importante para una señal NLS totalmente funcional. Los residuos lisina en las posiciones 43 y 44 de N (posiciones de nucleótidos 14.999–15.004 del genoma de P129) se reemplazaron por residuos glicina utilizando el plásmido lanzadera y el par de iniciadores mutá-

5 genos KK43–44GG–Fwd (5'–  
GGCAAGGGACCGGGAGGGGGAAATAAGAAGAAAAAC–3') (SEQ ID NO: 10)–: po-  
siciones del genoma 14.984 a 15.019) y KK43–44 GG–Rev (5'–  
GTTTTTCTTCTTATTTCCCCCTCCCGGTCCCTTGCC–3') (SEQ ID NO:11)–: posicio-  
10 nes del genoma 14.984 a 15.019), donde los subrayados indican cambios de codón  
para sustituciones de aminoácidos de KKS a GGN. Se llevaron a cabo amplificaciones  
PCR utilizando 5 ng del DNA plasmídico de pTB–shuttle–PRRSV–3997, 300 ng de  
cada uno de los iniciadores directo e inverso; concentraciones 1 mM de cada uno de  
dCTP, dGTP, dATP, y dTTP, 1 x tampón PCR [KCl 10 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, Tris–  
HCl 20 mM (pH 8,8), MgSO<sub>4</sub> 2 mM, 0,1% de Triton X–100]; y 2,5 U de DNA–  
15 polimerasa de *Pfu* (Stratagene). Las muestras se sometieron a 16 ciclos de amplifica-  
ción en las condiciones siguientes: desnaturalización a 94°C durante 30 s, reasocia-  
ción de iniciadores a 55°C durante 1 min, y extensión de iniciadores a 68°C durante 12  
min 30 s. Después de sometimiento a los ciclos PCR, el producto PCR se digirió con  
10 U de *Dpn I* para eliminar el molde de DNA plasmídico metilado. Se transformaron  
20 células XL1–Blue de *E. coli* por choque térmico con 4 µl de la mezcla de reacción PCR  
digerida con *Dpn I* que contenía los plásmidos mutados y se extendieron sobre una  
placa de agar LB que contenía ampicilina. Se seleccionaron aleatoriamente colonias y  
se cultivaron durante una noche. Se preparó DNA plasmídico utilizando un kit Spin  
Miniprep QIAprep (Qiagen). Se comprobó la presencia de la mutación deseada  
25 (PGGGNKK) por secuenciación de nucleótidos, y el plásmido resultante se designó  
pTB–shuttle–N–GG.

El plásmido lanzadera que llevaba la mutación GG (pTB–shuttle–N–GG) y el clon genómico de tipo salvaje de longitud total (pCMV–S–P129) contienen cada uno sitios singulares *BsrG I* y *Spe I* (en las posiciones 1.192 y 3.963, y las posiciones 12.692 y

30 15.463, respectivamente). Después de digestión con estas dos enzimas, el fragmento  
*BsrG I*–*Spe I* de 2.772 pb se purificó en gel de pTB–shuttle–N–GG, y el fragmento  
*BsrG I*–*Spe I* de 16.120 pb se purificó en gel de pCMV–S–P129. Estos dos fragmentos  
se ligaron utilizando DNA–ligasa T4 (Invitrogen) para construir un clon de cDNA ge-  
nómico de longitud total modificado con GGN. Se transformó la cepa DH5–α de *E. coli*  
35 con 10 µl de la mezcla de reacción de ligación. Se seleccionaron colonias bacterianas

81

de placas LB que contenían ampicilina y se prepararon DNAs plasmídicos. Basándose en los patrones de digestión con *Xma* I, se seleccionaron clones de longitud total. Los clones seleccionados se secuenciaron para confirmar la presencia de la modificación GGN en el clon de cDNA genómico de longitud total. Uno de los plásmidos resultantes se designó pCMV-S-P129-GG.

Se cultivaron células MARC-145 en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con 8% de suero de bovino fetal (FBS; Gibco BRL), penicilina (100 U/ml), y estreptomycin (50 µg/ml) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se sembraron las células en cápsulas de 35 mm de diámetro y se cultivaron hasta 70% de confluencia. Las células se transfectaron durante 24 h con 2 µg de DNA plasmídico pCMV-S-P129-GG utilizando Lipofectina (Invitrogen). Las células transfectadas se incubaron a 37°C en DMEM complementado con 8% de FBS durante 5 días. Se observó el efecto citopático (CPE) específico de PRRSV durante 3 días después de la transfección y se observó la propagación ulterior a las células vecinas durante 5 días después de la transfección. La especificidad del CPS se confirmó por tinción de inmunofluorescencia de las células utilizando un antisuero de conejo para las proteínas no estructurales nsp2 y nsp3, y el MAb SDOW17 específico de N (véase la Figura 1). Los sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas se cosecharon 5 días después de la transfección y se designaron 'P129-GG paso 1' (P1). El virus del paso-1 se utilizó para inocular células Marc-145 nuevas y la cosecha de 5 días se designó 'paso-2' (P2). Se preparó el virus 'paso-3' (P3) del mismo modo que P2. Cada paso del virus se guardó en partes alícuotas de 1 ml a -80°C hasta su utilización. Cada paso del virus P129-GG se tituló por ensayo de placas, y se determinó que los títulos eran  $1 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^2$ , y  $5 \times 10^3$  pfu/ml para los pasos 1, 2, y 3, respectivamente. Se generó el virus P129 de tipo salvaje a partir de pCMV-S-P129 y se tituló en paralelo, obteniéndose títulos de  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  y  $5 \times 10^5$  pfu/ml para los pasos 1, 2, y 3 respectivamente.

### **Ejemplo 3: Infección de los cerdos con el virus P129-GG y el virus parental P129 (Demostración de que el virus P129-GG está Atenuado)**

Veintiún cerdos sanos cruzados sin historia de enfermedad causada por o vacunación contra PRRSV y *Mycoplasma hyopneumoniae* se asignaron aleatoriamente a 3 grupos de tratamiento de 7 cerdos cada uno. Aproximadamente a las 6 semanas de edad, los cerdos T01 recibieron un placebo, mientras que los cerdos T02 y T03 se sometieron a un enfrentamiento intranasal con 2,0 ml de stock de virus diluido a  $2,5 \times 10^4$  pfu/ml ( $5,0 \times 10^4$  pfu/dosis) del virus P129-GG modificado genéticamente (generado a partir del plásmido pCMV-S-P129-GG) o el virus PRRS parental P129 (genera-

02

do a partir del plásmido pCMV-S-P129), respectivamente. Se observaron todos los cerdos diariamente respecto a signos clínicos que incluían estado general, depresión, pérdida del apetito, estornudos, tos, y dificultad respiratoria. Se registraron las temperaturas rectales y los pesos corporales. Se tomaron muestras de sangre los días 0, 4, 7, 10, 14, 21, y 28 para aislamiento de PRRSV y serología. Se realizaron necropsias los días 14 (2 cerdos/grupo) y 28 (5 cerdos/grupo) y se recogieron muestras de tejido (pulmón y amígdalas). Se realizaron estimaciones de gravedad de las lesiones pulmonares y porcentaje de consolidación de cada lóbulo pulmonar. Los cerdos de los grupos T02 y T03 desarrollaban signos de una infección moderada con el virus PRRS; difundían virus en el suero, y experimentaban seroconversión. Los cerdos de control no infectados (T01) permanecían negativos en cuanto a viremia del suero y negativos en cuanto a anticuerpos para el virus PRRS.

Comparados con los cerdos infectados por el virus parental P129 (T03), los cerdos infectados con el virus P129-GG (T02) difundían menos virus en su suero (Figuras 2A y 2B) y producían niveles mayores de anticuerpo ELISA anti-PRRS (Figuras 2C y 2D), y anticuerpos neutralizantes (Figura 2E).

| Tabla 6 — Niveles de Anticuerpos ELISA (S/P) |       |       |       |        |        |        |        |
|----------------------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
|                                              | día 0 | día 4 | día 7 | día 10 | día 14 | día 21 | día 28 |
| <b>P129-ts</b>                               |       |       |       |        |        |        |        |
| cerdo 28                                     | 0,000 | 0,000 | 0,061 | 0,283  | 0,527  | 0,689  | 1,025  |
| cerdo 30                                     | 0,006 | 0,000 | 0,044 | 0,178  | 0,527  | 0,731  | 0,672  |
| cerdo 35                                     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,027  | 0,157  | 0,241  | 0,197  |
| cerdo 40                                     | 0,004 | 0,021 | 0,030 | 0,208  | 0,575  | 0,723  | 0,890  |
| cerdo 43                                     | 0,000 | 0,000 | 0,049 | 0,354  | 0,419  | 1,760  | 2,006  |
| valor medio                                  | 0,002 | 0,004 | 0,037 | 0,210  | 0,441  | 0,829  | 0,958  |
|                                              |       |       |       |        |        |        |        |
|                                              |       |       |       |        |        |        |        |
| <b>P129-GG</b>                               |       |       |       |        |        |        |        |
| cerdo 33                                     | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,356  | 0,873  | 1,377  | 1,705  |
| cerdo 36                                     | 0,000 | 0,000 | 0,019 | 0,383  | 1,038  | 1,536  | 1,604  |
| cerdo 38                                     | 0,000 | 0,000 | 0,034 | 0,248  | 0,383  | 0,723  | 1,398  |
| cerdo 45                                     | 0,004 | 0,000 | 0,090 | 0,288  | 0,416  | 0,371  | 0,386  |
| cerdo 46                                     | 0,000 | 0,000 | 0,066 | 0,627  | 1,154  | 1,438  | 1,676  |
| valor medio                                  | 0,001 | 0,000 | 0,042 | 0,380  | 0,773  | 1,089  | 1,354  |
|                                              |       |       |       |        |        |        |        |

| Valores medios | 0     | 4     | 7     | 10    | 14    | 21    | 28    |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| P129-ts        | 0,002 | 0,004 | 0,037 | 0,210 | 0,441 | 0,829 | 0,958 |
| P129-GG        | 0,001 | 0,000 | 0,042 | 0,380 | 0,773 | 1,089 | 1354  |

Se determinaron los títulos de neutralización del suero en ambos grupos T02 y T03 los días 7, 14, 21 y 28 después de la infección. Los títulos de neutralización se determinaron por TCID<sub>50</sub> en placas de 96 pocillos por duplicado. En cada pocillo, se combinaron 200 pfu de virus P129 de tipo salvaje en un volumen de 100 µl con 100 µl de una dilución de 2 veces en serie de los sueros (desactivados previamente por calentamiento durante 30 min a 56°C). Se incubó la mezcla durante 1 h a 37°C, seguido por infección de las células. Las células infectadas se incubaron durante 5 días y se determinaron los valores CPE. Los datos se presentan a continuación y muestran que los cerdos infectados con el virus mutante desarrollaban títulos de neutralización medios mayores que los infectados con el virus parental de tipo salvaje.

**Tabla 7–Títulos de Neutralización Durante las Cuatro Semanas de Infección (valores duplicados)**

| P129-ts            | Día 7        | Día 14     | Día 21     | Día 28     |
|--------------------|--------------|------------|------------|------------|
| Cerdo 28           | <2, <2       | <2, <2     | 4, 4       | 3,5        |
| Cerdo 30           | <2, <2       | 2, 8       | 2, 2       | 4          |
| Cerdo 35           | <2, <2       | 4, 4       | 8, 4       | 7,5        |
| Cerdo 40           | <2, <2       | 4, 4       | 2, 8       | 8          |
| Cerdo 43           | <2, <2       | <2, 4      | <2, 8      | 3,5        |
| <b>Valor medio</b> | <b>&lt;2</b> | <b>3,2</b> | <b>4,2</b> | <b>5,3</b> |

**P129-GG**

|                    |              |            |             |             |
|--------------------|--------------|------------|-------------|-------------|
| Cerdo 33           | <2, <2       | 4, 8       | 8, 16       | 16          |
| Cerdo 36           | <2, <2       | 2, 2       | 16, 16      | 16          |
| Cerdo 38           | <2, <2       | 8, 4       | 8, 4        | 36          |
| Cerdo 45           | <2, <2       | 2, 2       | 4, 4        | 6           |
| Cerdo 46           | <2, <2       | 8, 8       | 16, 16      | 48          |
| <b>Valor medio</b> | <b>&lt;2</b> | <b>4,8</b> | <b>10,8</b> | <b>24,4</b> |

Uno de los sellos de la infección con PRRSV es la persistencia de virus en las amígdalas. Por esta razón, se recogieron las amígdalas de todos los cerdos infectados y dos cerdos de control infectados falsamente a la terminación del estudio (4 semanas después de la infección) y se examinaron respecto a persistencia vírica por RT-PCR.

5 El gen N era detectable por RT-PCR en todos los cerdos infectados con el virus GG o el virus P129, mientras que las amígdalas de los cerdos infectados falsamente se mantenían negativas. Esto indica que todos los cerdos infectados difundían el virus a las 4 semanas después de la infección. Para desarrollar posibles mutaciones en la NLS del gen N, se secuenciaron los productos PCR de las amígdalas.

10 En los cinco cerdos, se encontró que el virus GG persistente en las amígdalas estaba mutado en la secuencia NLS-2 por la introducción de una arginina en las posiciones 43 ó 44. El virus P129 de tipo salvaje de las amígdalas no mutaba y retenía la secuencia de tipo salvaje NLS-2.

#### **Ejemplo 4: Mutaciones de NLS-2 resistentes a la reversión**

15 Se creó la mutación P129-GG descrita en el **Ejemplo 2** por cambio de seis nucleótidos. Como se ve en el **Ejemplo 3**, este virus es susceptible de reversión parcial o total y puede recuperar el fenotipo parental NLS-negativo con una frecuencia relativamente alta debido a mutación aleatoria y selección natural. Realizaciones preferidas de la invención, especialmente para propósitos de vacuna, contendrían sustituciones y/o deleciones adicionales de nucleótidos, diseñadas para minimizar la probabilidad de reversión, y minimizar la probabilidad de que otros residuos flanqueantes muten a residuos básicos tales como lisina y arginina y restablezcan con ello un motivo funcional NLS en la región. Se prefieren codones que requieren dos o tres cambios separados de nucleótidos a fin de mutar a codones codificantes de un residuo básico respecto a aquéllos que requieren un solo cambio. Las mutaciones de delección tienen muy poca probabilidad de reversión, dado que se ha eliminado una porción de la región. Pueden seleccionarse codones alternativos para aminoácidos flanqueantes, a fin de reducir las probabilidades de readquirir un motivo pat7, pat4, u otro motivo NLS por mutación. Ejemplos de tales mutaciones "resistentes a la reversión" se muestran en la **Tabla 6**, y deben considerarse como representativas más bien que limitantes. Dada esta información, otros ejemplos de mutaciones resistentes a la reversión pueden ser ideados por una persona con experiencia ordinaria en la técnica.

35 En la **Tabla 8**, el virus mutante P129-d43/44 es una delección de los aminoácidos 43 y 44. Adicionalmente, el codón serina en la posición 45 ha cambiado de AGT a TCT para reducir la probabilidad de que el mismo mute a un codón lisina o arginina. Asi-

mismo, el codón asparagina de la posición 49 (AAC) ha cambiado a un codón serina (TCC) por la misma razón. La serina se encuentra en la posición 49 en algunos aislados de campo existentes naturalmente, por lo que debería ser bien tolerada. Un motivo NLS pat 7 mínimo (PGSKKSS) persiste en este mutante, y puede tener actividad parcial de NLS. Se predice que los virus con actividad parcial de NLS tienen fenotipos que son intermedios entre el virus de tipo salvaje (parental) y los mutantes completos con NLS desactivados ("knockout"). Tales virus pueden ser especialmente útiles como vacunas.

10

**Tabla 8 --- Mutantes de delección contemplados**

15

20

25

**Tabla 8 --- Mutantes de delección contemplados**

96

Iniciadores Directos (5'-3')

**P129-d43/44 F (SEQ ID NO: 24)**

**GTCCAGAGGCAAGGGACCGGGATCTAAGAAGAAATCCCCGGAG**

**P129-d43/44/46F (SEQ ID NO: 25)**

**GTCCAGAGGCAAGGGACCGGGATCTAAGAAGAAATCCCCGGAG**

**P129-d44/46/47F (SEQ ID NO: 26)**

**GCAAGGGACCGGGAAAGTCTAAATCCCCGGAGAAGCCCC**

**P129-d46/47/48F (SEQ ID NO: 27)**

**GCAAGGGACCGGGAAAGAAATCTTCCCCGGAGAAGCCCC**

Iniciadores Inversos (5'-3')

**P129-d43/44 R (SEQ ID NO: 28)**

**P129-d43/44/46R (SEQ ID NO: 29)**

AC

**CTCCGGGGATTTCCTTAGATCCCGGTCCCTTGCCTCTGGAC**

**P129-d44/46/47R (SEQ ID NO: 30)**

**GGGGCTTCTCCGGGGATTAGACTTCCCGGTCCCTTGC**

**P129-d46/47/48R (SEQ ID NO: 31)**

**GGGGCTTCTCCGGGGAAGATTCTTTCCCGGTCCCTTGC**

Las descripciones y ejemplos anteriores demuestran que la región NLS-2 no se requiere para multiplicación del virus, pero es un factor importante de virulencia para PRRSV, como se demuestra por el hecho de que el único virus persistente en las amígdalas ha mutado. Se demuestra también que la NLS en la proteína N de PRRSV está correlacionada positivamente con mayor contenido de anticuerpos neutralizantes y títulos ELISA más altos. Así pues, se ha establecido que las mutaciones que eliminan el motivo de la secuencia NLS-2 dan como resultado una cepa de PRRSV atenuada.

**Descripción Numerada de la Invención**

1. Una composición que comprende un agente infeccioso de PRRS seleccionado del grupo constituido por: a.) un virus PRRS modificado genéticamente que comprende una proteína N que se ha modificado al menos en una región conservada seleccionada del grupo constituido por la región NLS-2, la región NoLS y la región NES de tal modo que la región conservada se ha eliminado, y en la cual el virus PRRS modificado genéticamente está atenuado; b.) una molécula infecciosa de RNA que codifica el virus PRRS modificado genéticamente de a.); y c.) una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de DNA que codifica la molécula infecciosa de RNA de b.). 2. La composición de la reivindicación 1 que se ha modificado ulteriormente para dar como resultado la eliminación de la región NLS-1 conservada. 3. La composición de la reivindicación 1, en la cual la región conservada se ha eliminado por la introducción de una sustitución de aminoácido no conservadora. 4. La composi-

ción de la reivindicación 1 ó 2 en la cual la región conservada se ha delecionado al menos parcialmente. 5. La composición de la reivindicación 1, en la cual la región conservada es la región NoLS. 6. La composición de la reivindicación 1, en la cual la región conservada es la región NLS-2. 7. La composición de la reivindicación 1, en la cual la región conservada es la región NES. 8. La composición de la reivindicación 1, en la cual el virus PRRS es un virus PRRS norteamericano. 9. La composición de la reivindicación 1, en la cual el virus PRRS es un virus PRRS europeo. 10. La composición de la reivindicación 8, en la cual la región conservada es la región NLS-2. 11. La composición de la reivindicación 10, en la cual los residuos 42 y 43 de la proteína N son glicinas. 12. La composición de la reivindicación 10, en la cual los residuos 42 y 43 de la proteína N son glicina y el residuo 44 es asparagina. 13. La composición de la reivindicación 10, en la cual la región NLS-2 se ha delecionado al menos parcialmente. 14. La composición de la reivindicación 13, en la cual al menos uno de los residuos 43 a 48 de la proteína N se ha delecionado. 15. La composición de la reivindicación 14, en la cual ambos residuos 43 y 44 de la proteína N se han delecionado. 17. La composición de la reivindicación 14, en la cual los residuos 43, 44, y 46 de la proteína N se han delecionado. 18. La composición de la reivindicación 14, en la cual los residuos 44, 46, y 47 de la proteína N se han delecionado. 19. La composición de la reivindicación 14, en la cual los residuos 46, 47, y 48 de la proteína N se han delecionado. 20. La composición de las reivindicaciones 1-19 que contiene mutaciones, sustituciones y/o delecciones adicionales de nucleótidos, diseñadas para minimizar la probabilidad de reversión.

21. Una vacuna para proteger un animal porcino contra la infección por un virus PRRS, que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-20 en una cantidad eficaz para producir inmunoprotección contra la infección por un virus PRRS; y un vehículo aceptable para uso veterinario. 22. Un método para proteger un animal porcino contra la infección por un virus PRRS, que comprende vacunar el animal con una cantidad de la vacuna de la reivindicación 20 que es eficaz para producir inmunoprotección contra la infección por un virus PRRS. 23. Una célula hospedadora transfectada que comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20.

24. Un método para producir un virus PRRS modificado genéticamente y atenuado, método que comprende: a.) mutar una secuencia de DNA codificante de una molécula infecciosa de RNA que codifica un virus PRRS, para producir un virus PRRS modificado genéticamente que comprende una proteína N que se ha modificado al

- menos en una región conservada seleccionada del grupo constituido por la región NLS-2, la región NoLS y la región NES de tal modo que la región conservada se ha eliminado; b.) introducir el virus PRRS modificado genéticamente en una célula hospedadora capaz de soportar la replicación del PRRS. 25. Un método de la reivindicación
- 5 24 en el cual el virus PRRS modificado genéticamente es un virus PRRS norteamericano. 26. Un método de la reivindicación 24, en el cual el virus PRRS modificado genéticamente es un virus PRRS europeo. 27. El método de la reivindicación 24, en el cual la célula hospedadora capaz de soportar la replicación de PRRS es una célula MARC-145. 28. El método de la reivindicación 24, en el cual la célula hospedadora
- 10 capaz de soportar la replicación del PRRS se encuentra en un animal porcino vivo.
29. Cualquiera de las invenciones descritas en esta memoria o cualquiera de las combinaciones de reivindicaciones descritas anteriormente.
-

### **REIVINDICACIONES**

1.- Una composición que comprende un agente infeccioso del PRRS seleccionado del grupo constituido por:

- 5 a.) un virus PRRS modificado genéticamente que comprende una proteína N que se ha modificado al menos en una región conservada seleccionada del grupo constituido por la región NLS-2, la región NoLS y la región NES de tal modo que la región conservada se ha eliminado, y en donde el virus PRRS modificado genéticamente está atenuado;
- 10 b.) una molécula infecciosa de RNA que codifica el virus PRRS modificado genéticamente de a.); y
- c.) una molécula de polinucleótido aislada que comprende una secuencia de DNA que codifica la molécula infecciosa de RNA de b.).

2.- La composición de la reivindicación 1, que se ha modificado ulteriormente para dar como resultado a) la eliminación de la región NLS-1 conservada, o la región conservada se ha eliminado por la introducción de una sustitución de aminoácido no conservadora, o la región conservada se ha delecionado al menos parcialmente

15

3.- La composición de la reivindicación 1, en la cual la región conservada se selecciona de cualquiera de o de una combinación de las siguientes: a) la región NoLS, la región NLS-2, y/o la región NES.

20 4.- La composición de las reivindicaciones 1-3, en la cual el virus PRRS se selecciona de cualquiera de o de una combinación de los siguientes: virus PRRS norteamericano o un virus PRRS europeo.

5.- La composición de la reivindicación 3, en la cual el virus PRRS es un virus PRRS norteamericano y en la cual la región conservada es la región NLS-2.

25 6.- La composición de la reivindicación 5 seleccionada del grupo constituido por estas composiciones:

donde los residuos 43 y 44 de la proteína N son glicinas,

donde los residuos 43 y 44 de la proteína N son glicina y el residuo 45 es asparagina,

30 donde la región NLS-2 se ha delecionado al menos parcialmente,

donde al menos uno de los residuos 43 a 48 de la proteína N se ha delecionado,

donde ambos residuos 43 y 44 de la proteína N se han delecionado,

donde los residuos 43, 44 y 46 de la proteína N se han delecionado,

90

donde los residuos 44, 46 y 47 de la proteína N se han deletado, y/o donde los residuos 46, 47 y 48 de la proteína N se han deletado.

7.- La composición de las reivindicaciones 1-6 que contiene mutaciones, sustituciones y/o deletas adicionales de nucleótidos, diseñadas para minimizar la probabilidad de reversión.

8.- Una vacuna para proteger un animal porcino contra la infección por un virus PRRS, que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en una cantidad eficaz para producir inmunoprotección contra la infección por un virus PRRS; y un vehículo aceptable para uso veterinario.

9.- Un método para proteger un animal porcino contra la infección por un virus PRRS, que comprende vacunar el animal con una cantidad de la vacuna de la reivindicación 8 que es eficaz para producir inmunoprotección contra la infección por un virus PRRS.

10.- Una célula hospedadora transfectada que comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

11.- Un método para producir un virus PRRS modificado genéticamente y atenuado, método que comprende:

a.) mutar una secuencia de DNA codificante de una molécula infecciosa de RNA que codifica un virus PRRS, para producir un virus PRRS modificado genéticamente que comprende una proteína N que se ha modificado al menos en una región conservada seleccionada del grupo constituido por la región NLS-2, la región NoLS y la región NES de tal modo que la región conservada se ha eliminado;

b.) introducir el virus PRRS modificado genéticamente en una célula hospedadora capaz de soportar la replicación del PRRS.

12.- Un método de la reivindicación 11, en el cual el virus PRRS modificado genéticamente se ha modificado ulteriormente con una o más mutaciones, sustituciones y/o deletas adicionales de nucleótidos, que minimizan la posibilidad de reversión.

13.- Un método de la reivindicación 11, en el cual el virus PRRS modificado genéticamente es un virus PRRS norteamericano o un virus PRRS europeo.

14.- El método de las reivindicaciones 11-13, en el cual la célula hospedadora capaz de soportar la replicación del PRRS es una célula MARC-145.

15.- El método de las reivindicaciones 11-13, en el cual la célula hospedadora capaz de soportar la replicación del PRRS se encuentra en un animal porcino vivo.

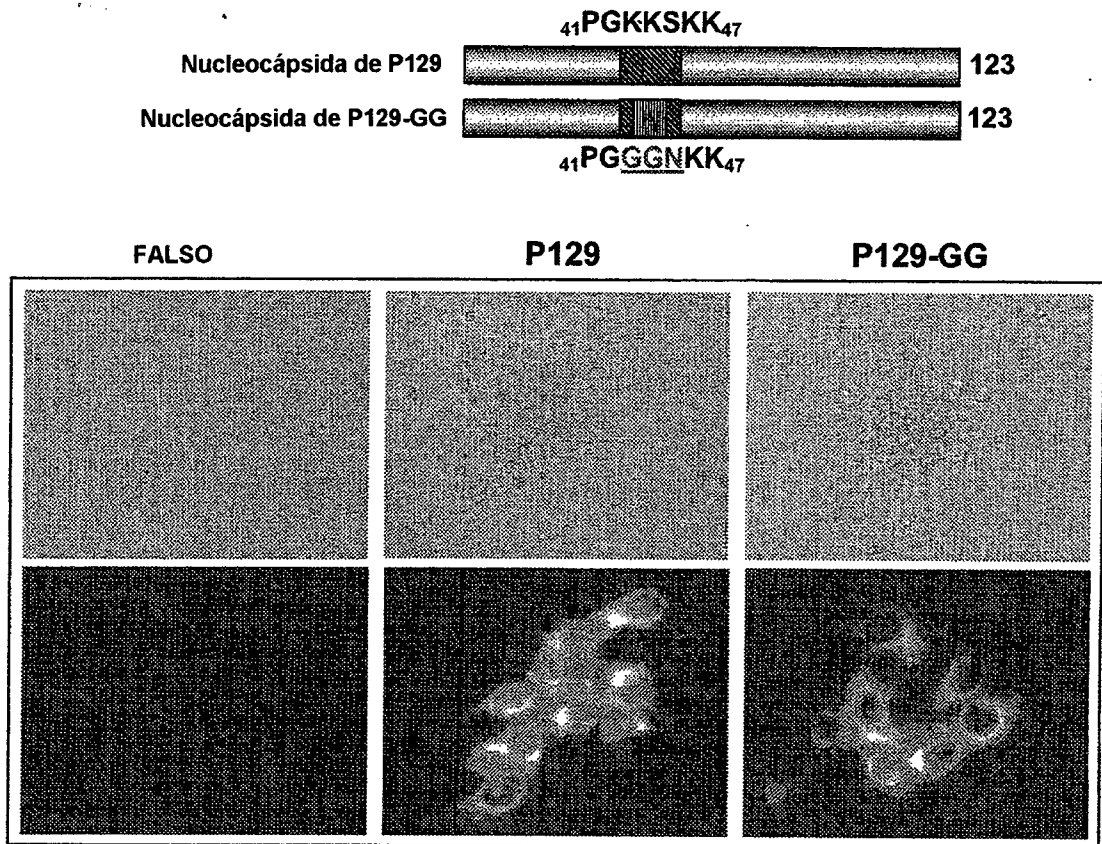
al

### **RESUMEN**

La presente invención proporciona un virus PRRS modificado genéticamente y polinucleótidos que lo codifican. Se proporcionan también vacunas que comprenden el virus modificado genéticamente y los polinucleótidos.

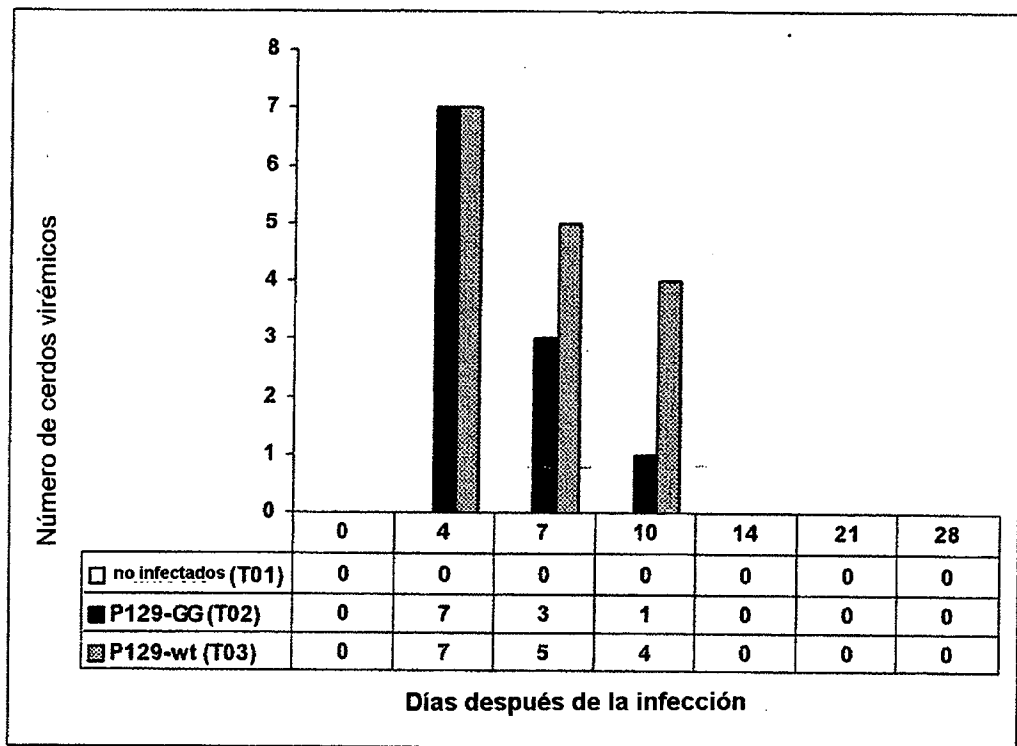
92

Figura 1



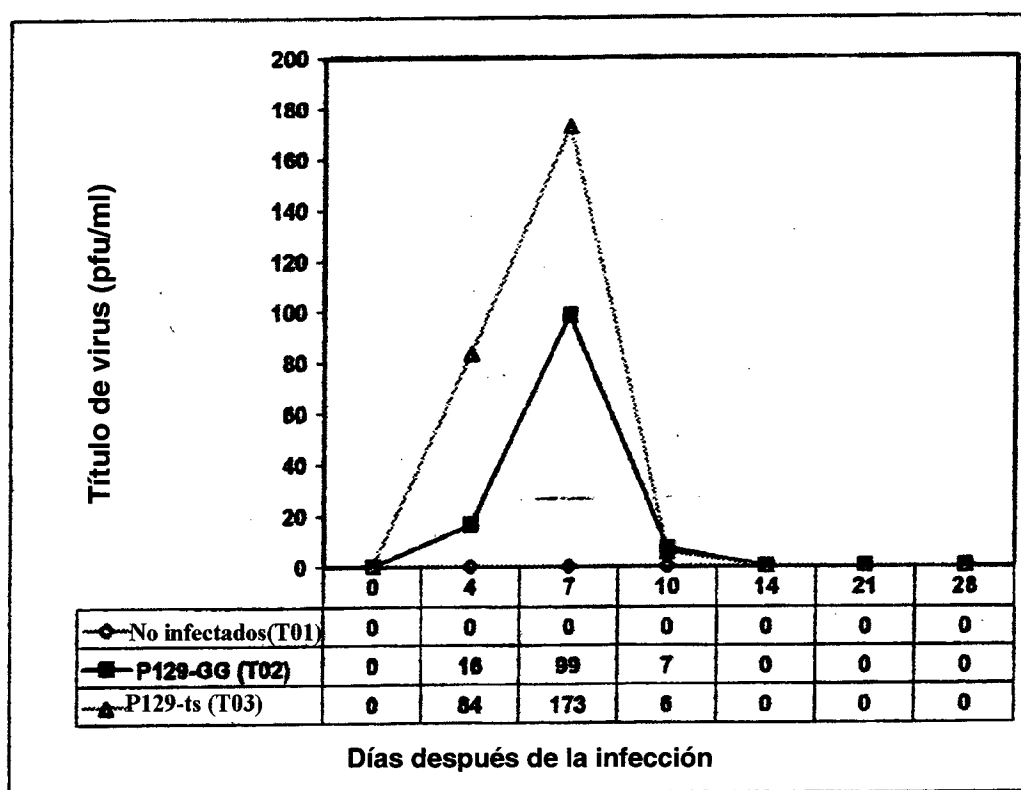
03

**Figura 2A**



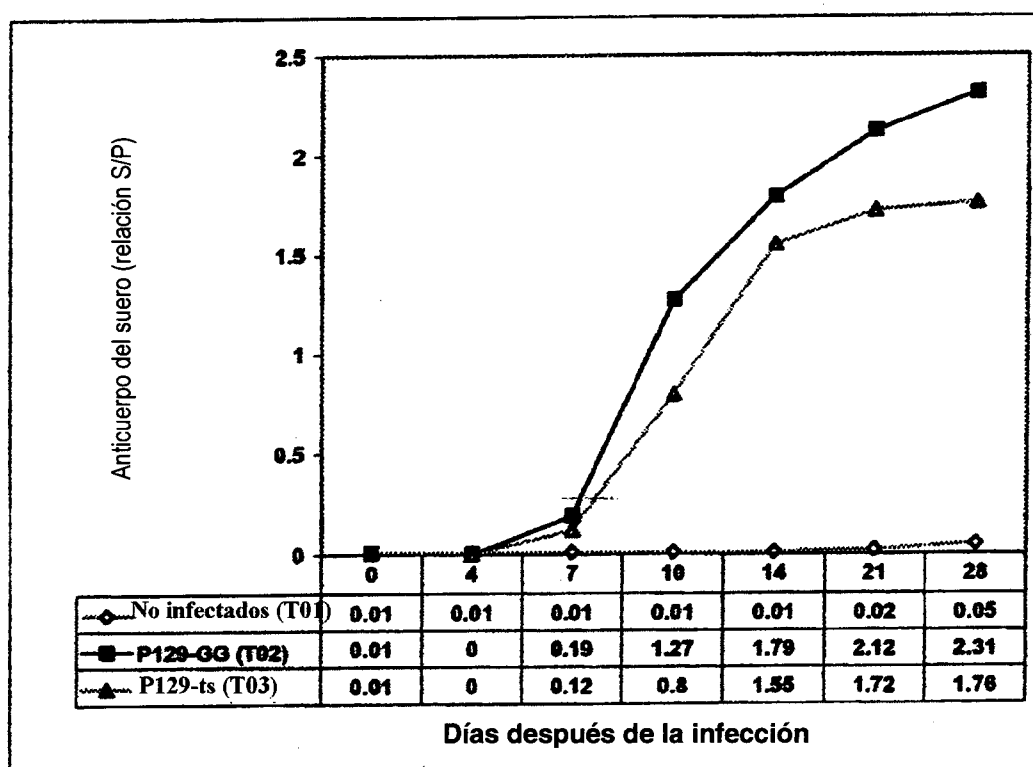
98

Figura 2B



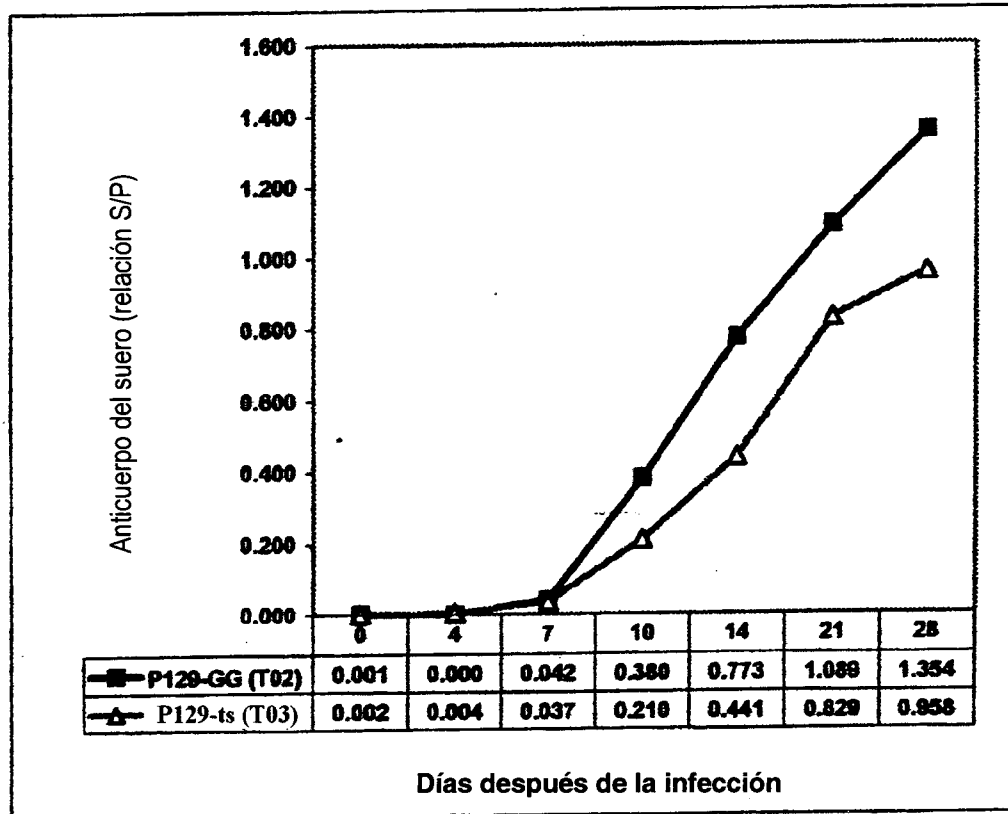
95

Figura 2C



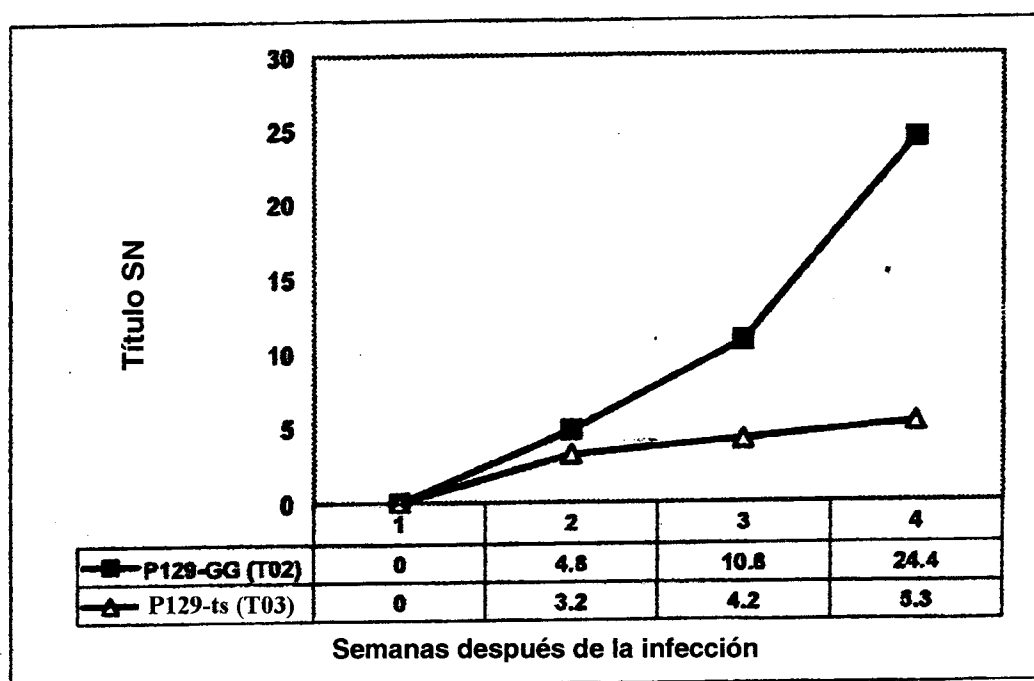
96

Figura 2D



ax

Figura 2E



9/8

# LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Pfizer Inc.  
Yoo, Dongwan  
Lee, Changhee  
Calvert, Jay G.  
Welch, Siao-Kun W.

<120> VIRUS MUTANTE DEL SÍNDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO DE LOS PORCINOS

<130> PC32632

<160> 23

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 1

Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys  
1 5

<210> 2

<211> 32

<212> PRT

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 2

Pro Gly Lys Lys Asn Lys Lys Lys Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro  
1 5 10 15

Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg His His Phe Thr Pro Ser Glu Arg  
20 25 30

<210> 3

<211> 33

<212> PRT

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 3

Pro Arg Gly Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Pro Glu Lys Pro His Phe  
1 5 10 15

Pro Leu Ala Ala Glu Asp Asp Ile Arg His His Leu Thr Gln Thr Glu  
20 25 30

Arg

99

<210> 4  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 4

Leu Pro Thr His His Thr Val Arg Leu Ile Arg Val  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 5

Leu Pro Val Ala His Thr Val Arg Leu Ile Arg Val  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 6

Met Pro Asn Asn Asn Gly Lys Gln Gln Lys Lys Lys Lys Gly Asn Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Gln Leu Cys Gln Met Leu Gly Lys Ile Ile Ala Gln  
 20 25 30

Gln Asn Gln Ser Arg Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Ser Lys Lys Lys  
 35 40 45

Asn Pro Glu Lys Pro His Phe Pro Leu Ala Thr Glu Asp Asp Val Arg  
 50 55 60

His His Phe Thr Pro Gly Glu Arg Gln Leu Cys Leu Ser Ser Ile Gln  
 65 70 75 80

Thr Ala Phe Asn Gln Gly Ala Gly Thr Cys Thr Leu Ser Asp Ser Gly  
 85 90 95

Arg Ile Ser Tyr Thr Val Glu Phe Ser Leu Pro Thr His His Thr Val  
 100 105 110

Arg Leu Ile Arg Val Thr Ala Ser Pro Ser Ala  
 115 120

100

<210> 7  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 7  
 atgccaaata acaacggcaa gcagcaaaag aaaaagaagg ggaatggcca gccagtcaat 60  
 cagctgtgcc agatgctggg taaaatcatc gccagcaaa accagtocag aggcaaggga 120  
 ccgggcaaga aaagtaagaa gaaaaacccg gagaagcccc attttcctct agcgaccgaa 180  
 gatgaegtca ggcatactt cacccttggg gagcggaat tgtgtctgtc gtcgatccag 240  
 actgccttta accagggcgc tggaaacttg accctgtcag attcaggag gataagttac 300  
 actgtggagt ttagtttgcg gacgcataat actgtgcgc tgatcegegt cacagcatca 360  
 cctcagca 369

<210> 8  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 8  
 actcagtcta agtgctggaa agttatg 27

<210> 9  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 9  
 atctttatcat gtctggatcc cggggc 27

<210> 10  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 10  
 ggcaaggac cgggaggggg aataagaag aaaaac 36

<210> 11  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 11  
 gtttttcttc ttatttcccc ctcccggtcc ctgtgc 36

<210> 12  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

107

<400> 12

Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Ser Lys Lys Lys Asn Pro Glu Lys Pro  
1 5 10 15

<210> 13

<211> 48

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 13

ggcaagggac cgggcaagaa aagtaagaag aaaaacccgg agaagccc

48

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 14

Gly Lys Gly Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Lys Asn Pro Glu Lys Pro  
5 10 15

<210> 15

<211> 48

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 15

ggcaagggac cgggaggggg aaataagaag aaaaacccgg agaagccc

48

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 16

Gly Lys Gly Pro Gly Ser Lys Lys Lys Ser Pro Glu Lys Pro  
1 5 10

<210> 17

<211> 42

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 17

ggcaagggac cgggctctaa gaagaaatcc cgggagaagc cc

42

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

102

<400> 18

Gly Lys Gly Pro Gly Ser Lys Lys Ser Pro Glu Lys Pro  
1 5 10

<210> 19

<211> 39

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 19

ggcaagggac cgggctctaa gaaatccccg gagaagccc

39

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 20

Gly Lys Gly Pro Gly Lys Ser Lys Ser Pro Glu Lys Pro  
1 5 10

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 21

ggcaagggac cgggcaagtc taaatccccg gagaagccc

39

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 22

Gly Lys Gly Pro Gly Lys Lys Ser Ser Pro Glu Lys Pro  
1 5 10

<210> 23

<211> 39

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 23

ggcaagggac cgggcaagaa atcttccccg gagaagccc

39

<210> 24

<211> 43

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 24

203

gtccagaggc aagggaccgg gatctaagaa gaaatccccg gag 43

<210> 25

<211> 40

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 25

gtccagaggc aagggaccgg gatctaagaa atccccggag 40

<210> 26

<211> 39

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 26

gcaagggacc gggaaagtct aaatccccgg agaagcccc 39

<210> 27

<211> 39

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 27

gcaagggacc gggaaagaaa ttttccccgg agaagcccc 39

<210> 28

<211> 43

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 28

ctccggggat ttctttcttag atccccgtcc cttgcctctg gac 43

<210> 29

<211> 40

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 29

ctccggggat ttcttagatc ccgggccctt gcctctggac 40

<210> 30

<211> 39

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

<400> 30

ggggcttctc cggggattta gactttcccg gtcccttgc 39

<210> 31

<211> 39

<212> DNA

<213> Virus del síndrome reproductor y respiratorio de los porcinos

104

<400> 31  
ggggcttctc cggggaagat ttctttcccg gtccttgc

39

**Ítem III**

**No formulación de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial**

**III.1 Con respecto a las reivindicaciones 9 y 11- 15**

Las reivindicaciones 9 y 11- 15 se relacionan con materia considerada por esta Autoridad cubierta por provisiones de la Regla 67.1( iv) del PCT, ver la declaración en la página 7 líneas 32- 33 de la solicitud, es decir, ‘El término “célula hospedera capaz de soportar la replicación viral de PRRS” también podrá incluir células en un cerdo vivo’. De manera que no se formulará ningún concepto con respecto a la aplicación industrial de la materia en estas reivindicaciones (Artículo 34( a) ( i) del PCT) .

**Ítem V**

**Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial; citas y explicaciones sustentando dicha declaración**

**V.1 Se hace referencia a los siguientes documentos**

D1: WO0053787 (J. MEULENBERG ET AL) 14 de septiembre de 2000

**V.2 Novedad (Artículo 33(2) del PCT)**

**V.2.1 Con respecto a las reivindicaciones 1- 15**

La materia de las reivindicaciones 1- 15 parece no estar divulgada en el estado de la técnica anterior disponible. Por ende, dichas reivindicaciones se consideran novedosas a la luz del Artículo 33(2) del PCT.

**V.3 Nivel Inventivo (Artículo 33(3) del PCT)**

**V.3.1 Con respecto a las reivindicaciones 1- 15**

El antecedente D1 describe la creación de vacunas PRRSV que comprenden una eliminación parcial de ORF7. Una región de 44 nucleótidos entre los nucleótidos 14642 y 14686 (o 14643 y 14687, o 14644 y 14687) en el gen ORF7 fue identificada en ser esencial para la replicación de ARN de PRRSV (página 6 líneas 3- 26, página 8 líneas 1- 6, página 14 línea 29, página 15 línea 6, página 25 líneas 24- 34, página 31 línea 22- 25). ORF7 está ubicado entre los nucleótidos 14588 y 14971. Por lo tanto, los nucleótidos esenciales codifican los residuos de aminoácidos 16 al 30. Las regiones restantes de la secuencia ORF7 puede eliminarse, por ejemplo los primeros 55 nucleótidos de ORF7 fueron eliminados que comprendían los nucleótidos que codificaban NLS- 1 (figura 2). La materia de las reivindicaciones 1- 5 difiere del antecedente más cercano D1 en que la región de secuencia eliminada/modificada está identificada como la región NLS- 2, región NoLS o la región NES en vez de efectuar la eliminación de todas las regiones o regiones no definidas con la excepción de los 44 nucleótidos mencionados. El problema técnico por resolverse puede considerarse como el de proporcionar una vacuna mejorada del virus PRRS atenuado. A la luz de D1, parece ser obvio el eliminar cualquier subsecuencia de la secuencia mencionada en D1.

Adicionalmente, solo podría reconocerse un nivel inventivo para aquellas partes de las reivindicaciones que resolvieran el problema técnico planteado. La solicitud demuestra la exitosa creación de un virus atenuado mejorado que comprende las secuencias enumeradas en la Tabla 8, las cuales no están sugeridas en el estado de la técnica anterior para la resolución del problema planteado. Sin embargo, la solicitud no proporciona ningunos datos experimentales los cuales soportaran por ejemplo la eliminación de la totalidad de la región NLS- 2, región NoLS ó región NES. Así las cosas, la materia de las reivindicaciones 1- 5 y 7- 15 no es considerada inventiva a la luz del Artículo 33(3) del PCT mientras que la materia de la reivindicación 6 si cumple con los requisitos del Artículo 33(3) del PCT.

106

#### **V.4 Aplicación Industrial (Artículo 33(4) del PCT)**

##### **V.4.1 Con respecto a las reivindicaciones 1- 8 y 10- 14**

La materia de las reivindicaciones 1- 8 y 10- 14 parecen ser susceptibles de aplicación industrial.

##### **V.4.2 Con respecto a las reivindicaciones 9 y 11- 15**

Se considera que la materia de las reivindicaciones 9 y 11- 15 es un método de tratamiento por terapia del cuerpo humano o animal. (Ver la declaración en la página 7 líneas 32- 33 de la solicitud, es decir, ‘El término “célula hospedera capaz de soportar la replicación viral de PRRS” también podrá incluir células en un cerdo vivo’).

Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 9 y 11- 15 sobre la cuestión de si son industrialmente aplicables, no existen criterios unificados entre los Estados pertenecientes al PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La Oficina de Patentes Europea, EPO, por ejemplo, no reconoce como cumplimiento del requisito de la aplicación industrial, un contenido de reivindicaciones con respecto al uso de un compuesto en un tratamiento médico, pero si permite sin embargo, reivindicaciones con respecto a un compuesto para primer uso en un tratamiento médico y el uso de tal compuesto para la producción de un medicamento para un tratamiento médico nuevo.

#### **V.5 Observaciones adicionales**

##### **V.5.1 Con respecto a las reivindicaciones 1- 15**

Se considera que la expresión “la región conservada ha sido removida” tiene el mismo significado que “la región conservada ha sido eliminada”, es decir los aminoácidos de la región NLS- 2 son eliminados. Sin embargo, la materia de la reivindicación 2 se refiere a la sustitución de un aminoácido o a la eliminación parcial de la región NLS- 1. Adicionalmente, la reivindicación 6 se refiere a dos o tres aminoácidos o a la eliminación parcial de la región NLS- 2. Por lo tanto, la materia de las reivindicaciones 1- 15 no cumple con los requisitos del Artículo 6 del PCT.

##### **V.5.2 Con respecto a la reivindicación 3**

La materia de la reivindicación 3 no parece sumarle algo a la materia de la reivindicación 1. Por lo tanto, la reivindicación 3 pareciera que sobrara.

##### **V.5.3 Con respecto a la reivindicación 10**

La materia de la reivindicación 10 divulga una célula hospedera transfectada que comprende una composición haciendo referencia a las reivindicaciones 1- 9. Sin embargo, la reivindicación 9 reivindica un método. Por lo tanto, la reivindicación 10 no cumple con los requisitos del Artículo 6 del PCT.

10X

**V.5.4** Parece estar errónea la referencia a la Tabla 6 en la página 26 línea 20.

**V.5.5 Con respecto a la numeración de los residuos de los aminoácidos**

Parece ser que según la entrada de la Base de Datos EMBL con el número de acceso M96262 ó A26843, la región NLS- 1 del aislado Lelystad está ubicada sobre los residuos 9- 12 en lugar de los residuos 10- 13 tal como se indica en la solicitud en la página 9 línea 9. Según la misma fuente, la región NoLS del aislado Lelystad está ubicada sobre los residuos 41- 73 en lugar de los residuos 42- 73 tal como se indica en la solicitud en la página 9 línea 30.

# PATENT COOPERATION TREATY

EUROPEAN PHARMA  
PATENT DEPARTMENT

22 JAN 2007

From the  
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Grover F. Fuller Jr. c/o Drouin  
PFIZER GLOBAL RESEARCH and  
DEVELOPMENT  
Ramsgate Road  
Sandwich, Kent, CT13 9NJ  
GRANDE BRETAGNE

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF  
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY  
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing  
(day/month/year)

18.01.2007

Applicant's or agent's file reference  
PC32632A

## IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.  
PCT/IB2006/000376

International filing date (day/month/year)  
13.02.2006

Priority date (day/month/year)  
25.02.2005

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 inventions 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.

**DOCKETED**

Due Date \_\_\_\_\_

Name and mailing address of the International  
preliminary examining authority:



European Patent Office  
D-80298 Munich  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer \_\_\_\_\_

Moreno, Ramon

Tel. +49 89 2399 2388

BY LDH

Site: Sandwich



# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

107

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |                                                                                                                                                                         |                                              |                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>PC32632A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  | <b>FOR FURTHER ACTION</b>                                                                                                                                               |                                              | See Form PCT/PEAA16 |
| International application No.<br>PCT/IB2006/000376                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  | International filing date (day/month/year)<br>13.02.2006                                                                                                                | Priority date (day/month/year)<br>25.02.2005 |                     |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>INV. C07K14/08                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |                                                                                                                                                                         |                                              |                     |
| Applicant<br>PFIZER PRODUCTS INC. et al.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |                                                                                                                                                                         |                                              |                     |
| <p>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.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.</p> <p>3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:</p> <p>a. <input type="checkbox"/> sent to the applicant and to the International Bureau a total of sheets, as follows:</p> <p><input type="checkbox"/> 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 607 of the Administrative Instructions).</p> <p><input type="checkbox"/> 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.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> (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).</p> |  |                                                                                                                                                                         |                                              |                     |
| <p>4. This report contains Indications relating to the following items:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. I Basis of the report</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. II Priority</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. IV Lack of unity of invention</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VI Certain documents cited</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VII Certain defects in the international application</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VIII Certain observations on the international application</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |                                                                                                                                                                         |                                              |                     |
| Date of submission of the demand<br><br>21.04.2006                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  | Date of completion of this report<br><br>18.01.2007                                                                                                                     |                                              |                     |
| Name and mailing address of the international preliminary examining authority:<br> European Patent Office<br>D-80298 Munich<br>Tel. +49 89 2399 - 0 Tlx 523656 epmu d<br>Fax: +49 89 2399 - 4465                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  | Authorized officer<br><br>Irion, Andrea<br><br>Telephone No. +49 89 2399- 3174<br> |                                              |                     |

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY**

International application No. **110**  
PCT/IB2006/000376

**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
  - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
    - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
    - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
    - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
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**

1-29 as originally filed

**Sequence listings part of the description, Pages**

1-7 as originally filed

**Claims, Numbers**

1-15 as originally filed

**Drawings, Sheets**

1/6-6/6 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."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY**

International application No. **PCT/IB2006/000376**

**Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 9,11-15 (IA)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 9, 11-15 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

**see separate sheet**

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*).

☐ no international search report has been established for the said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY**

112  
International application No.  
PCT/IB2006/000376

---

**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 | 1-5      |
|                               | No: Claims  |          |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims | 6        |
|                               | No: Claims  | 1-5,7-15 |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | 1-8, 10  |
|                               | No: Claims  |          |

**2. Citations and explanations (Rule 70.7):**

**see separate sheet**

**Item III**

**III.1 With respect to claims 9 and 11-15**

Claims 9 and 11-15 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT, see the statement on p. 7 I. 32-33 of the application, i.e. 'The term "host cell capable of supporting PRRS virus replication" may also include cells within a live pig'. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(I) PCT).

**Item V**

**V.1 Reference is made to following documents**

D1: WO0053787 (J. MEULENBERG ET AL.) 14 September 2000 (2000-09-14)

**V.2 Novelty (Article 33(2) PCT)**

**V.2.1 With respect to claims 1-15**

The subject-matter of claims 1-15 does not appear to be disclosed in the available prior art. Therefore, said claims are considered novel in the sense of Article 33(2) PCT.

**V.3 Inventive step (Article 33(3) PCT)**

**V.3.1 With respect to claims 1-15**

Document D1 describes the creation of PRRSV vaccines comprising a partial deletion of ORF7. A region of 44 nucleotides between nucleotides 14642 to 14686 (or 14643 to 14687, or 14644 to 14687) in the ORF7

519

gene was identified as being essential for replication of RNA of PRRSV (p. 6 l. 3-26, p. 8 l. 1-6, p. 14 l. 29 - p. 15 l. 6, p. 25 l. 24-34, p. 31 l. 22-25). ORF7 is located between nucleotides 14588-14971. Therefore, the essential nucleotides code for the amino acids residues 16 to 30. The remaining regions of the ORF7 sequence may be deleted, e.g. the first 55 nucleotides of ORF7 were deleted comprising the nucleotides encoding for NLS-1 (Figure 2). The subject-matter of claims 1-5 differs from the closest prior art document D1 in that the deleted/modified sequence region is identified as the NLS-2 region, NoLS region or the NES region instead of performing the deletion of all or undefined regions with the exception of the 44 nucleotides mentioned. The technical problem to be solved may be regarded as providing an improved attenuated PRRS virus vaccine. In view of D1 it appears to be obvious to delete any subsequence of the sequence mentioned in D1. Furthermore, an inventive step can only be acknowledged for those parts of the claims which solve the technical problem posed. The application shows the successful creation of an improved attenuated virus comprising the sequences listed in Table 8, which are not suggested in the prior art to solve the problem posed. However, the application does not provide any experimental data supporting e.g. the deletion of the entire NLS-2 region, NoLS region or NES region. Therefore, the subject-matter of claims 1-5 and 7-15 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT whereas the subject-matter of claim 6 meets the requirements of Article 33(3) PCT.

#### **V.4 Industrial applicability (Article 33(4) PCT)**

##### **V.4.1 With respect to claims 1-8 and 10-14**

The subject-matter of claims 1-8 and 10-14 appear to be susceptible of

industrial application.

#### **V.4.2 With respect to claims 9 and 11-15**

The subject-matter of claims 9 and 11-15 is considered to be a method of treatment by therapy of the human or animal body. (See the statement on p. 7 I. 32-33 of the application, i.e. 'The term "host cell capable of supporting PRRS virus replication" may also include cells within a live pig')

For the assessment of the present claims 9 and 11-15 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

#### **V.5 Further remarks**

##### **V.5.1 With respect to claims 1-15**

The expression "the conserved region has been eliminated" is considered having the same meaning as "the conserved region has been deleted", i.e. the amino acids of the NLS-2 region are deleted. However, the subject-matter of claim 2 refers to the substitution of one amino acid or to the partial deletion of NLS-1 region. Furthermore, claim 6 refers to two or three amino acids or the partial deletion of the NLS-2 region. Therefore, the subject-matter of claims 1-15 does not meet the requirements of

Article 6 PCT.

**V.5.2 With respect to claim 3**

The subject-matter of claim 3 does not appear to add something to the subject-matter of claim 1. Therefore, claim 3 appears to be superfluous.

**V.5.3 With respect to claim 10**

The subject-matter of claim 10 discloses a transfected host cell comprising a composition referring to claims 1-9. However, claim 9 is claiming a method. Therefore, claim 10 does not meet the requirements of Article 6 PCT.

**V.5.4** The reference on p. 26 l. 20 to Table 6 appears to be erroneous.

**V.5.5 With respect to the numbering of the amino acid residues**

It appears that according to the EMBL Database entry with the Accession no. M96262 or A26843, the NLS-1 region of the Lelystad isolate is located at residues 9-12 instead of 10-13 as it is stated in the application on p. 9 l. 9. According to the same source the NoLS region of the Lelystad isolate is located at residues 41-73 instead of 42-73 as it is stated in the application on p. 9 l. 30.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2006/000376

119

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/08

C12N7/00

C12N7/04

A61K39/12

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)

C07K A61K C12N

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, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, PAJ, 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         | WO 00/53787 A (STICHTING DIENST<br>LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK; MEULENBERG,<br>JANNEKE; VAN NI)<br>14 September 2000 (2000-09-14)<br>page 6, line 3 - line 26<br>page 8, lines 1-6<br>page 14, line 29 - page 15, line 6<br>page 25, line 24 - line 34<br>page 31, line 22 - line 25<br>figure 2 | 1-5, 7-15             |
| A         | WO 02/095040 A (ID-LELYSTAD, INSTITUUT<br>VOOR DIERHOUDERIJ EN DIERGEZONDHEID B.V;<br>VERHEI) 28 November 2002 (2002-11-28)<br>the whole document<br><br>-----<br>-/--                                                                                                                        | 1-15                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 May 2006

Date of mailing of the international search report

01/06/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Irion, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2006/000376

7/10

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | EP 1 018 557 A (PFIZER PRODUCTS INC)<br>12 July 2000 (2000-07-12)<br>the whole document                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1-15                  |
| A         | WO 01/55353 A (BOEHRINGER INGELHEIM<br>VETMEDICA GMBH; ELBERS, KNUT; PESCH,<br>STEFAN; DREI) 2 August 2001 (2001-08-02)<br>the whole document                                                                                                                                                                                                                                  | 1-15                  |
| A         | WO 02/072802 A (BOEHRINGER INGELHEIM<br>VETMEDICA GMBH; ELBERS, KNUT; PESCHKE,<br>STEFAN; SC) 19 September 2002 (2002-09-19)<br>the whole document                                                                                                                                                                                                                             | 1-15                  |
| A         | ROWLAND R R R ET AL: "Peptide domains<br>involved in the localization of the<br>porcine reproductive and respiratory<br>syndrome virus nucleocapsid protein to the<br>nucleolus"<br>VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US,<br>vol. 316, no. 1,<br>10 November 2003 (2003-11-10), pages<br>135-145, XP004471040<br>ISSN: 0042-6822<br>the whole document                        | 1-15                  |
| A         | ROWLAND R R ET AL: "The localization of<br>porcine reproductive and respiratory<br>syndrome virus nucleocapsid protein to the<br>nucleolus of infected cells and<br>identification of a potential nucleolar<br>localization signal sequence"<br>VIRUS RESEARCH,<br>vol. 64, no. 1, October 1999 (1999-10),<br>pages 1-12, XP002380309<br>ISSN: 0168-1702<br>the whole document | 1-15                  |
| T         | LEE C ET AL: "Mutations within the<br>nuclear localization signal of the porcine<br>reproductive and respiratory syndrome<br>virus nucleocapsid protein attenuate virus<br>replication"<br>VIROLOGY 01 MAR 2006 UNITED STATES,<br>vol. 346, no. 1,<br>1 March 2006 (2006-03-01), pages 238-250,<br>XP005291557<br>ISSN: 0042-6822 1096-0341<br>the whole document              | 1-15                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IB2006/000376

119

## 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:  
  
Although claims 9 and 11-15 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2006/000376

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                                                                                                                                                                                                                                                                      | Publication<br>date                                                                                                                                                                                                                        |
|-------------------------------------------|---|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WO 0053787                                | A | 14-09-2000          | AU 3198200 A<br>CA 2366072 A1<br>JP 2002537845 A<br>PL 351486 A1<br>US 2003049274 A1                                                                                                                                                                                                            | 28-09-2000<br>14-09-2000<br>12-11-2002<br>22-04-2003<br>13-03-2003                                                                                                                                                                         |
| WO 02095040                               | A | 28-11-2002          | NONE                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                            |
| EP 1018557                                | A | 12-07-2000          | AT 309364 T<br>AU 769841 B2<br>AU 6173399 A<br>BR 9905902 A<br>CA 2290220 A1<br>CN 1263945 A<br>DE 69928209 D1<br>DK 1018557 T3<br>ES 2251162 T3<br>HK 1029140 A1<br>JP 2000189178 A<br>JP 2001224384 A<br>JP 2001218591 A<br>JP 2004081218 A<br>MX PA03009354 A<br>NZ 501264 A<br>ZA 9907289 A | 15-11-2005<br>05-02-2004<br>29-06-2000<br>12-12-2000<br>22-06-2000<br>23-08-2000<br>15-12-2005<br>05-12-2005<br>16-04-2006<br>01-04-2005<br>11-07-2000<br>21-08-2001<br>14-08-2001<br>18-03-2004<br>02-03-2004<br>28-09-2001<br>24-05-2001 |
| WO 0155353                                | A | 02-08-2001          | AU 2850201 A<br>BR 0107827 A<br>CA 2396454 A1<br>CN 1406277 A<br>CZ 20022554 A3<br>EP 1254213 A2<br>HU 0204176 A2<br>JP 2003520601 T<br>MX PA02007198 A<br>PL 356274 A1<br>SK 10932002 A3                                                                                                       | 07-08-2001<br>05-11-2002<br>02-08-2001<br>26-03-2003<br>16-10-2002<br>06-11-2002<br>28-04-2003<br>08-07-2003<br>09-12-2002<br>28-06-2004<br>06-11-2002                                                                                     |
| WO 02072802                               | A | 19-09-2002          | BR 0207988 A<br>CA 2439254 A1<br>CZ 20032743 A3<br>EP 1421184 A2<br>HU 0303431 A2<br>JP 2004534522 T<br>MX PA03007751 A<br>SK 11282003 A3                                                                                                                                                       | 26-10-2004<br>19-09-2002<br>18-02-2004<br>26-05-2004<br>28-01-2004<br>18-11-2004<br>12-11-2004<br>03-02-2004                                                                                                                               |



No. 07-086498- -00000-0000

Fecha: 2007-08-23 16:14:06 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 120

**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE  
PCT**

PATENTE DE INVENCION [ ]

MODELO DE UTILIDAD [ ]

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

COMPLETA [ ]

INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

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

COMPLETA [ ]

INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

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

COMPLETA [ ]

INCOMPLETA [ ]

Feder Naranjo  
Firma Responsable

Fecha 23-08-07

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](mailto:Info@sic.gov.co)  
[www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co)  
Bogotá, D.C., Colombia