



No. 13-189477-00000-0000

Fecha: 2013-08-22 16:34:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

5

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

**TITULO: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN A ESCALA
COMERCIAL DE PRRSV**

SOLICITANTE: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

DIRECCIÓN: Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein, Alemania

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 22 de Agosto de 2013

P2013/000125

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOC

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-199477-00000-0000

Fecha: 2013-08-22 16:34:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000125

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: BOEHRINGER INGELHEIM
VETMEDICA GMBH

Dirección: Binger Strasse 173, 55216
Ingelheim Am Rhein

Nacionalidad o Domicilio: Alemania

Lugar de Constitución: Alemania

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta

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/EP2012/052476 Fecha Febrero 14, 2012

Publicación Internacional No. WO 2012/110490 A1 Fecha Agosto 23, 2012

6

Título (54) PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN A ESCALA COMERCIAL
DE PRRSV.

Clasificación Internacional (51) A61K 39/12; C12N 7/00.

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Febrero 17, 2011

(31) Número de Solicitud

61/444.071

9

Comprobante de pago No. 13-

Fecha _____



ANEXOS



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



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



Poderes, si fuere el caso.



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



Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.



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



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



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



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



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



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



Arte final 12 x 12.



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



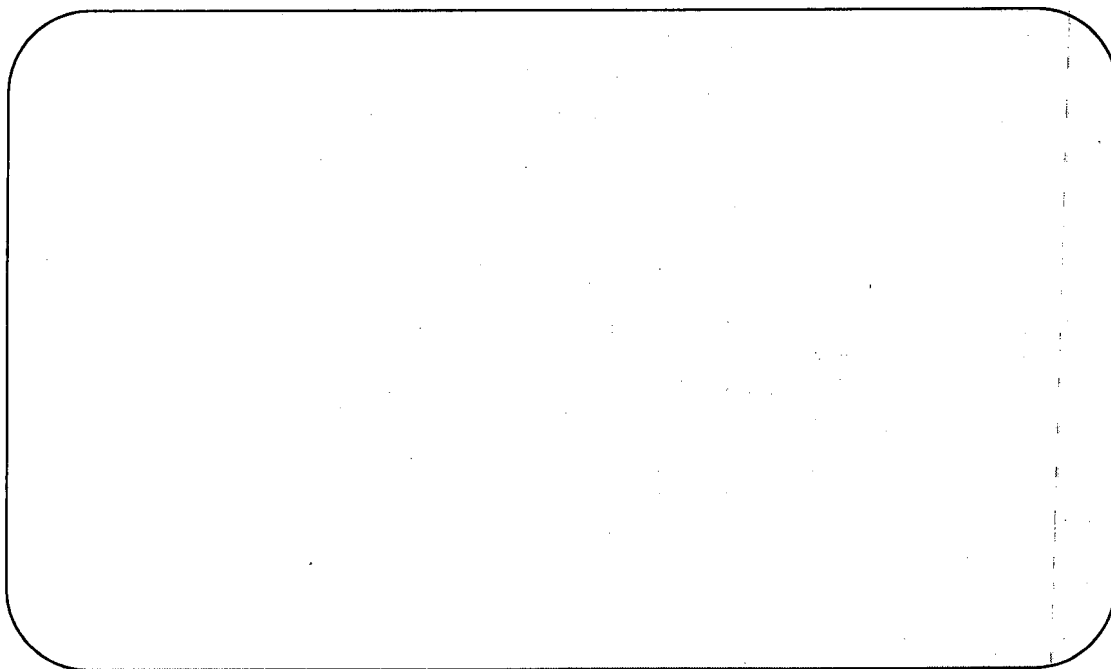
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

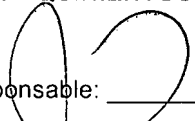
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0083192
		Bogotá D.C., Agosto 21 de 2013 - 15:53:17

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS					NI 830.122.870
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	522598823	21/08/2013	14.035.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00 500.000.00
			\$500.000.00
			=====

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

LISTA DE INVENTORES

PCT/EP2012/052476

Elizabeth Jane BERRY

2621

North Belt Highway,

St. Joseph,

Missouri 64506

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Estadounidense

Fuad Tawfiq HADDADIN

2621 North

Belt Highway, St.

Joseph, Missouri 64506

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Jordano

ALÍ KHAZRAEINAZMPOUR

2621 North

Belt Highway, St.

Joseph, Missouri 64506

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Estadounidense

Jeremy KROLL

Inc., 2621 North Belt

Highway, St.

Joseph, Missouri 64506

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Estadounidense

Sonia Regina Cantisano MALBURG

Inc., 2621 North Belt

Highway, St.

Joseph, Missouri 64506

Estados Unidos de América

Nacionalidad: Brasileño

Edgar Arnulfo SANDOVAL BASURTO

Inc., 2621 North Belt
Highway, St.
Joseph, Missouri 64506
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Mexicano

Stephen SCHEERER

Inc., 2621 North Belt
Highway, St. Joseph, Missouri 64506
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense



No. 13-199477- -00000-0000

Fecha: 2013-08-22 16:34:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO I

☐	Indicación que se solicita 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 (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

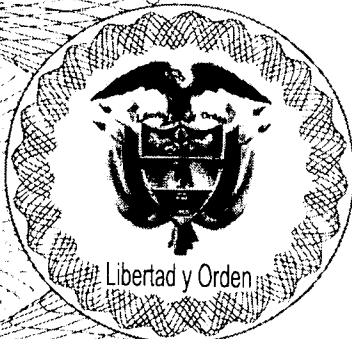
(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita 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 ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



REPÚBLICA DE COLOMBIA

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

LEGALIZACION

País: **REPUBLICA DE COLOMBIA**
(Country: - Pays:)

El presente documento público
(This public document - Le présent acte public)

Ha sido firmado por: **OLARTE GARCIA ROBERTO MARIO**
(Has been signed by: - A été signé par:)

Actuando en calidad de: **TRADUCTOR OFICIAL**
(Acting in the capacity of: - Agissant en qualité de:)

Lleva el sello/estampilla de: **TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL**
(Bears the seal/stamp of: - Est revêtu du sceau de / timbre de:)

Certificado
(Certified - Attesté)

En: **BOGOTA D.C**
(At: - À:)

El: **2/2/2012 10:54:35 a.m.**
(On: - Le:)

Por: **APOSTILLA Y LEGALIZACIÓN**
(By: The Ministry of Foreign Affairs of Colombia - Par: Ministère des Affaires Étrangères de la Colombie)

No: **LMCC105434895**
(Under Number: - Sous le numéro:)

Nombre del Titular: **2059/2011**
(Name of the holder of document: - Nom du titulaire:)

Tipo de documento: **TRADUCCION APOSTILLA**
(Type of document: - Type du document:)

Número de hojas: **3**
(Number of pages: - Nombre de pages:)

01304100116643800902

Firmado Digitalmente por: (Digitally Signed by:)
Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia
AMPARO DE LA CRUZ TAMAYO RODRIGUEZ
Reason: DOCUMENT AUTHENTICITY
BOGOTA - COLOMBIA

La autenticidad de este documento puede ser verificada en el Registro Electrónico que se encuentra en la siguiente página
The authenticity of this document may be verified by accessing the e-Register on the following web site:
L'autenticité de cette document peut être vérifiée en accédant l'e-Registre sur le site web suivant:

www.cancilleria.gov.co/legalizaciones

Este documento público es una traducción al español de un documento en idioma inglés
presentado ante mí.

ROBERTO M. OLARTE GARCÍA

Traductor e Intérprete Oficial

Ministerio de Justicia

Licencia 0041/1996

PODER

(texto en español)

Firma: **Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH**

(ilegible)

Dr. Heinz HAMMANN

(ilegible)

Dr. Heinz-Gerd KLAES

Firmas autorizadas

Fecha: 8 de octubre de 2011

Ciudad, País: Ingelheim am Rhein, Alemania

UR Nr. 2824/2011

Por medio de la presente se certifica que las anteriores rúbricas de:

- **Dr. Heinz Hammann**
nacido el 25 de noviembre de 1949,
con domicilio en 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,
- **Dr. Heinz-Gerd Kläs,**
nacido el 9 de febrero de 1952,
con domicilio en 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,

conocidos de manera personal,
fueron suscritas en presencia mía.

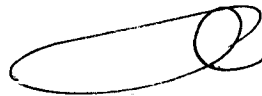
Por medio de la presente se certifica que **Boehringer Ingelheim Vetmedica Gesellschaft mit beschränkter Haftung** es una sociedad debidamente organizada y existente bajo las leyes de la República Federal de Alemania con domicilio principal en Binger Straße 173, Ingelheim am Rhein, Alemania.

La sociedad fue registrada en el Registro Comercial de la Corte Distrital de Mainz bajo el No. HR 2 21491.

Adicionalmente, certifico que el Dr. Heinz Hammann y el Dr. Heinz-Gerd Kläs estaban autorizados para suscribir el anterior documento y aún están debidamente autorizados para firmar en nombre de **Boehringer Ingelheim Vetmedica Gesellschaft mit beschränkter Haftung** como representantes autorizados.

Ingelheim am Rhein, 8 de diciembre de 2011/Ge

(firma ilegible)
Notario Público



APOSTILLA
(Convención de la Haya, del 5 de octubre de 1961)

1. País: República Federal de Alemania
Este documento público
 2. está firmado por Horst Heintskill
 3. en su calidad de Notario
 4. está provisto con el timbre/sello de Horst Heintskill – Notario en Ingelheim am Rhein
- Confirmado
5. en Mainz
 6. el 12.12.2011
 7. por la presidente de la audiencia provincial
 8. bajo el número 2059/2011
 9. sello: ilegible
 10. Firma
(ilegible)
Marliese Dicke

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Marliese Dicke', written over a horizontal line.

Cálculo de costos
Derechos para la obtención de la legalización
Valor: 50.000,00 €
JVKostO del 26.7.1957
según § 45 orden de costos
Derechos: 33,00€

Mainz, 12.12.11
(firma ilegible)
Beyer

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Carlos R. Olarte
Juan G. Moure

Alexander Agude
Carlos A. Pardo
Gina Arango
Juan Felipe Acosta
Andres Rincón
Monica Guevara
Andres Alvarado
Margarita Solórzano
Ricardo Velasco

Power of Attorney

The undersigned,

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

domiciled in

Binger Straße 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or Juan Guillermo Moure** 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, collect refunds, desist, settle, conciliate or negotiate. 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.

Poder

El suscrito,

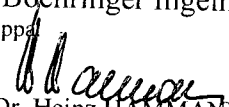
domiciliado en

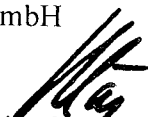
por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o Juan Guillermo Moure** poder amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las **Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, 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, transigir, 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: **Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH**

ppa.

ppa.


Dr. Heinz HAMMANN


Dr. Heinz-Gerd KLAES

Authorized Signatories

Date/Fecha: 8th of October, 2011

City/Country/Ciudad,País: Ingelheim am Rhein, Germany

UR.Nr. 2824/2011

It is herewith certified that above signatures of:

- Dr. Heinz **H a m m a n n**,
born 25th day of November 1949,
with business address at 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,
- Dr. Heinz-Gerd **K l ä s**,
born 09th day of February 1952,
with business address at 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,

personally known,
were duly given in my presence.

It is herewith certified that **Boehringer Ingelheim Vetmedica Gesellschaft mit beschränkter Haftung** is a corporation duly organized and existing under the laws of the Federal Republic of Germany having its principal place of business at Binger Straße 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany.

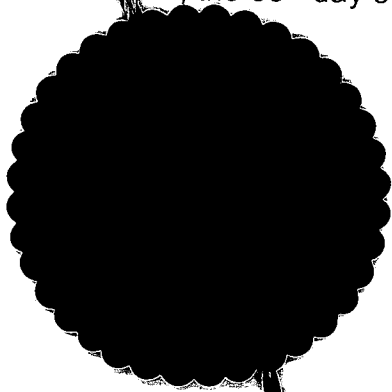
It has been entered into the Commercial Register of the District Court of Mainz under HR B 20491.

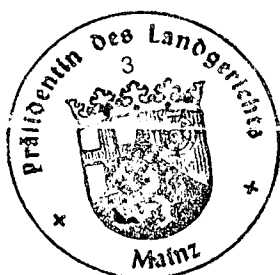
Furthermore, I certify that Dr. Heinz Hammann and Dr. Heinz-Gerd Kläs were authorized to sign the foregoing document and still are duly authorized to sign on behalf as procurists of **Boehringer Ingelheim Vetmedica Gesellschaft mit beschränkter Haftung**.

Ingelheim am Rhein, the 08th day of December 2011 /Ge



Notary public





Kostenrechnung:

Gebühr für die Erteilung
der Legalisation

Wert: 50.000,00 €

JVKostO v. 26.7.1957

i.V.m. § 45 KostO

Gebühr: 33,00 €

Mainz, den 12.12.11

Beyer
Beyer

Justizbeschäftigte

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Horst Heintskill

3. in seiner Eigenschaft als Notar

4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel Horst Heintskill - Notar in Ingelheim am Rhein

Bestätigt

5. in Mainz 6. am 12.12.2011

7. durch die Präsidentin des Landgerichts

8. unter Nr. 2059/2011

9. Siegel/Stempel

10. Unterschrift



Marliese Dicke
Marliese Dicke

Assignment of Inventors and Priority Rights

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, the undersigned (the "Assignors")

Elizabeth Jane BERRY, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Fuad Tawfiq HADDADIN, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the Jordan
Ali KHAZRAEINAZMPOUR, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Jeremy KROLL, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Sonia Regina Cantisano MALBURG, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of Brazil
Edgar Arnulfo SANDOVAL BASURTO, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of Mexico
Stephen SCHEERER, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA

inventor/s and applicant/s of an invention related to:

"COMMERCIAL SCALE PROCESS FOR PRODUCTION OF PRRSV"

for which a first application was filed in the USA

Serial No.: US 61/444071

Filing Date: February 17, 2011

do hereby assign, and transfer all my/our rights, title and interest in and to the same to

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

residing in

Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany

to whom assignment has been made of all rights and title to the said invention for the following territories:

Argentina, Brazil, Canada, Chile, China, Colombia, Ecuador, Egypt, Georgia, India, Indonesia, Mexico, Nigeria, OAPI, Pakistan, Peru, South Africa, Taiwan, Thailand, Uruguay, Venezuela, Viet Nam, GCC Member States and the United Arab Emirates

aforesaid without any restriction whatever.

Done and signed at

(Signature Pages to Follow)

Elizabeth Jane BERRY

Date

State of Missouri)
County of Buchanan)

On this ____ day of _____ in the year 20____, before me, the undersigned notary public, personally appeared Elizabeth Jane Berry, known to me to be the person(s) whose name(s) is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that she executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Christina Ostorga, Notary Public
My Commission Expires: February 14, 2014

Fuad Tawfiq HADDADIN

Date

State of Missouri)
County of Buchanan)

On this ____ day of _____ in the year 20____, before me, the undersigned notary public, personally appeared Fuad Tawfiq Haddadin, known to me to be the person(s) whose name(s) is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Christina Ostorga, Notary Public
My Commission Expires: February 14, 2014

Ali KHAZRAEINAZMPOUR

Date

State of Missouri)
County of Buchanan)

On this ____ day of _____ in the year 20____, before me, the undersigned notary public, personally appeared, Ali Khazraeinazmpour known to me to be the person(s) whose name(s) is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Christina Ostorga, Notary Public
My Commission Expires: February 14, 2014

State of Iowa)
County of Story)

Connie L. Harris, Notary Public
My Commission Expires: 7-3-12



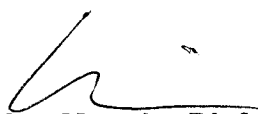
Date _____

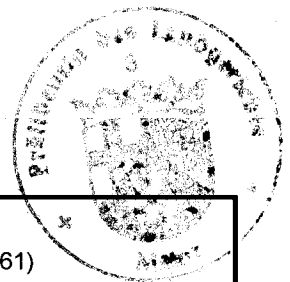
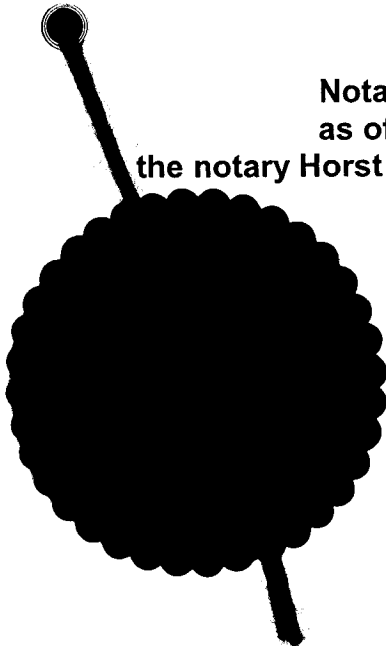
Date _____

Christina Ostorga, Notary Public
My Commission Expires: February 14, 2014

Conformity of the above copy with the original
is hereby certified.

Ingelheim am Rhein, the 04th day of June 2013 /Ge


Notary junior judge Mascha Diefenbach
as officially appointed representative of
the notary Horst Heintskill with his office in Ingelheim am Rhein



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

Diese öffentliche Urkunde

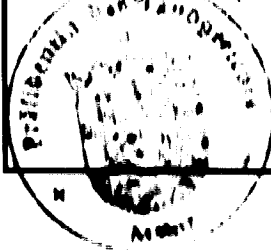
2. ist unterschrieben von Notarassessorin Mascha Diefenbach
3. in ihrer Eigenschaft als amtlich bestellte Vertreterin des Notars
Horst Heintskill mit dem Amtssitz in
Ingelheim am Rhein
4. sie ist versehen mit dem Horst Heintskill - Notar in Ingelheim am
Stempel/Siegel Rhein

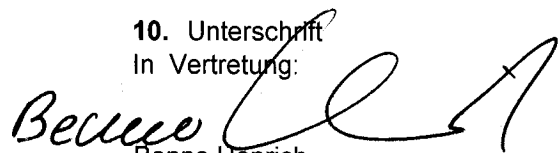
Bestätigt

5. in Mainz 6. am 11. Jun. 2013
7. durch die Präsidentin des Landgerichts
8. unter Nr. 1107/2013

9. Stempel/Siegel

10. Unterschrift
In Vertretung:




Benno Henrich
Vizepräsident

Kostenrechnung:

Gebühr für die Erteilung
der Legalisation

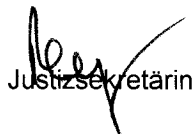
Wert: 3.000,00 €

JVKostO v. 26.7.1957

i.V.m. § 45 KostO

Gebühr: 10,00 €

Mainz, den 11. Jun. 2013


Justizsekretärin

Certified Copy

Assignment of Inventors and Priority Rights

For good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged,
the undersigned (the "Assignors")

Elizabeth Jane BERRY, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Fuad Tawfiq HADDADIN, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the Jordan
Ali KHAZRAEINAZMPOUR, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Jeremy KROLL, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA
Sonia Regina Cantisano MALBURG, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of Brazil
Edgar Arnulfo SANDOVAL BASURTO, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of Mexico
Stephen SCHEERER, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.,
2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506, USA, a citizen of the USA

inventor/s and applicant/s of an invention related to:

"COMMERCIAL SCALE PROCESS FOR PRODUCTION OF PRRSV"

for which a first application was filed in the USA

Serial No.: US 61/444071

Filing Date: February 17, 2011

do hereby assign, and transfer all my/our rights, title and interest in and to the same to

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

residing in

Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany

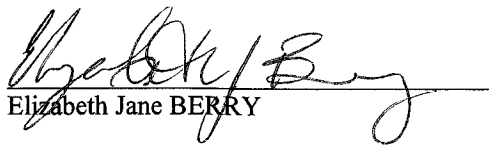
to whom assignment has been made of all rights and title to the said invention for the following territories:

Argentina, Brazil, Canada, Chile, China, Colombia, Ecuador, Egypt, Georgia, India, Indonesia, Mexico, Nigeria, OAPI, Pakistan, Peru, South Africa, Taiwan, Thailand, Uruguay, Venezuela, Viet Nam, GCC Member States and the United Arabian Emirates

aforesaid without any restriction whatever.

Done and signed at

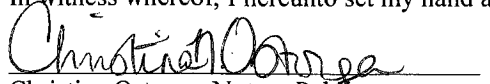
(Signature Pages to Follow)


Elizabeth Jane BERRY

1-25-12
Date

State of Missouri)
County of Buchanan)

On this 25th day of Jan in the year 20 12, before me, the undersigned notary public, personally appeared Elizabeth Jane Berry, known to me to be the person(s) whose name(s) is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that she executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.


Christina Ostorga, Notary Public
My Commission Expires: February 14, 2014

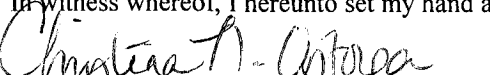
CHRISTINA N. OSTORGA
Notary Public - Notary Seal
STATE OF MISSOURI
Andrew County
My Commission Expires: 2-14-2014
Commission # 10839439


Fuad Tawfiq HADDADIN

01/05/2012
Date

State of Missouri)
County of Buchanan)

On this 5th day of Jan in the year 20 12, before me, the undersigned notary public, personally appeared Fuad Tawfiq Haddadin, known to me to be the person(s) whose name(s) is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.


Christina Ostorga, Notary Public
My Commission Expires: February 14, 2014

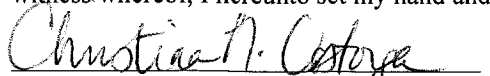
CHRISTINA N. OSTORGA
Notary Public - Notary Seal
STATE OF MISSOURI
Andrew County
My Commission Expires: 2-14-2014
Commission # 10839439


Ali KHAZRAEINAZMPOUR

23 Jan 12
Date

State of Missouri)
County of Buchanan)

On this 23 day of Jan in the year 20 12, before me, the undersigned notary public, personally appeared, Ali Khazraeinazmpour known to me to be the person(s) whose name(s) is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.


Christina Ostorga, Notary Public
My Commission Expires: February 14, 2014

CHRISTINA N. OSTORGA
Notary Public - Notary Seal
STATE OF MISSOURI
Andrew County
My Commission Expires: 2-14-2014
Commission # 10839439

Jeremy KROLL

Date

State of _____)
County of Buchanan)

On this ____ day of _____ in the year 20____, before me, the undersigned notary public, personally appeared, Ali Khazraeinazmpour known to me to be the person(s) whose name(s) is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

_____, Notary Public
My Commission Expires: _____

Sonia Regina Cantisano Malburg
Sonia Regina Cantisano MALBURG

17 Jan 2012
Date

State of Missouri)
County of Buchanan)

On this 17th day of Jan in the year 2012, before me, the undersigned notary public, personally appeared, Sonia Regina Cantisano Malburg known to me to be the person(s) whose name(s) is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that she executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Christina N. Ostorga
Christina Ostorga, Notary Public
My Commission Expires: February 14, 2014

CHRISTINA N. OSTORGA
Notary Public - Notary Seal
STATE OF MISSOURI
Andrew County

My Commission Expires: 2-14-2014
Commission # 10839439

Edgar Arnulfo SANDOVAL BASURTO
Edgar Arnulfo SANDOVAL BASURTO

1/23/12
Date

CHRISTINA N. OSTORGA
Notary Public - Notary Seal
STATE OF MISSOURI
Andrew County
My Commission Expires: 2-14-2014
Commission # 10839439

State of Missouri)
County of Buchanan)

On this 23 day of Jan in the year 2012, before me, the undersigned notary public, personally appeared, Edgar Arnulfo Sandoval Basurto known to me to be the person(s) whose name(s) is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

Christina N. Ostorga
Christina Ostorga, Notary Public
My Commission Expires: February 14, 2014

Stephen SCHEERER
Stephen SCHEERER

05 Jan 2012
Date

State of Missouri)
County of Buchanan)

On this 5th day of Jan in the year 2012, before me, the undersigned notary public, personally appeared, Stephen Scheerer known to me to be the person(s) whose name(s) is subscribed to the within Assignment of Inventors and Priority Rights and acknowledged that he executed the same for the purposes therein contained. In witness whereof, I hereunto set my hand and official seal.

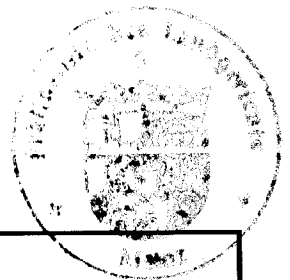
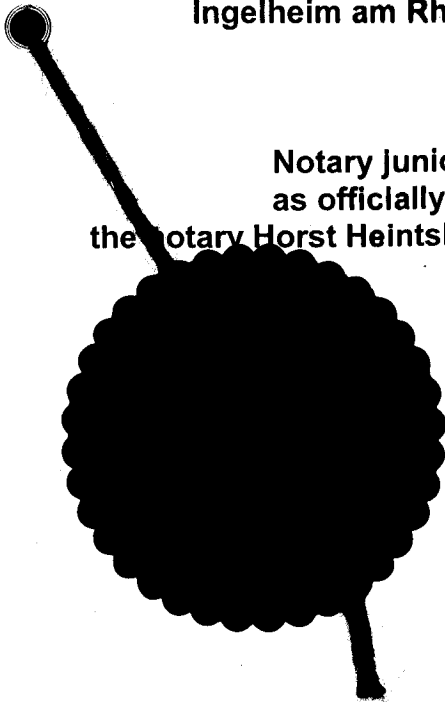
Christina N. Ostorga
Christina Ostorga, Notary Public
My Commission Expires: February 14, 2014

CHRISTINA N. OSTORGA
Notary Public - Notary Seal
STATE OF MISSOURI
Andrew County
My Commission Expires: _____
Commission # 10839439

Conformity of the above copy with the original
is hereby certified.

Ingelheim am Rhein, the 04th day of June 2013 /Ge

Notary Junior judge Mascha Diefenbach
as officially appointed representative of
the Notary Horst Heintskill with his office in Ingelheim am Rhein



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

Diese öffentliche Urkunde

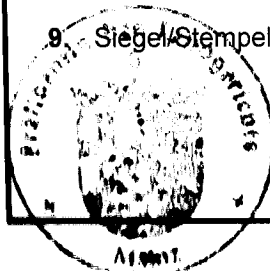
2. ist unterschrieben von Notarassessorin Mascha Diefenbach
3. in ihrer Eigenschaft als amtlich bestellte Vertreterin des Notars
Horst Heintskill mit dem Amtssitz in
Ingelheim am Rhein
4. sie ist versehen mit dem Horst Heintskill - Notar in Ingelheim am
Stempel/Siegel Rhein

Bestätigt

5. in Mainz 6. am 11. Jun. 2013
7. durch die Präsidentin des Landgerichts
8. unter Nr. 1106/2013

9. Siegel/Stempel

10. Unterschrift
In Vertretung:



Benno Henrich
Benno Henrich
Vizepräsident

Kostenrechnung:

Gebühr für die Erteilung
der Legalisation

Wert: 3.000,00 €

JVKostO v. 26.7.1957

i.V.m. § 45 KostO

Gebühr: 10,00 €

Mainz, den 11. Jun. 2013

Mascha Diefenbach
Justizsekretärin



(43) International Publication Date
23 August 2012 (23.08.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/110490 A1

- (51) **International Patent Classification:**
A61K 39/12 (2006.01) *C12N 7/00* (2006.01)
- (21) **International Application Number:**
PCT/EP2012/052476
- (22) **International Filing Date:**
14 February 2012 (14.02.2012)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
61/444,071 17 February 2011 (17.02.2011) US
- (71) **Applicant** (*for all designated States except US*):
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH [DE/DE]; Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).
- (72) **Inventors; and**
- (75) **Inventors/Applicants** (*for US only*): **BERRY, Elizabeth Jane** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **HADDADIN, Fuad Tawfiq** [JO/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **KHAZRAEINAZMPOUR, Ali** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **KROLL, Jeremy** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **MALBURG, Sonia Regina Cantisano** [BR/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **SANDOVAL BASURTO, Edgar Arnulfo** [MX/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **SCHEERER, Stephen** [US/US]; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US).
- (74) **Agents:** **HAMMANN ET AL., Heinz** et al.; Boehringer Ingelheim GmbH, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).
- (81) **Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declarations under Rule 4.17:**
- *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*
- Published:**
- *with international search report (Art. 21(3))*

(54) **Title:** COMMERCIAL SCALE PROCESS FOR PRODUCTION OF PRRSV

(57) **Abstract:** The present invention describes an efficient commercial scale production method for the preparation of PRRS virus.



WO 2012/110490 A1

COMMERCIAL SCALE PROCESS FOR PRODUCTION OF PRRSV

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention relates to commercial scale production of live attenuated Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) which
5 may be used in the production of vaccines based thereon and the use thereof in the treatment of swine.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is viewed by many as the most important disease currently affecting the pig industry worldwide.
10 The syndrome first was described in 1987 in the United States as "mystery swine disease" and rapidly spread across the globe. It causes severe reproduction losses, is associated with increased mortality due to secondary infections, and is linked to reduced feed conversion and average daily weight gain. Unfortunately, control of the virus that causes PRRS has proven to be difficult.

15 **[0003]** PRRS virus (PRRSV) is an enveloped single stranded RNA virus classified in the family Arteriviridae (Cavanaugh, 1997). It causes a widespread disease of swine that was first described as 'mystery swine disease' in the USA in 1987 (Hill, 1990). The disease manifests as respiratory illness in all age groups of swine leading to death in some younger pigs and severe reproductive problems in
20 breeding age females.

[0004] Transmission of the PRRSV can, and often does, occur through direct contact between infected and susceptible pigs. Transmission over very short distances by air or through semen also may occur. Once infected, the virus can remain in the blood of adults for about two to four weeks, and in infected pigs
25 for one to two months or more. Infected boars may shed the virus in the semen for more than 100 days. This long period of viremia significantly increases the possibility of transmission. In addition, the PRRS virus can cross the placenta during the last third of the gestation period to infect piglets in utero and cause stillbirth or weak-born piglets.

[0005] All types and sizes of herds, including those with high or ordinary health status or from either indoor or outdoor units, can be infected with PRRS virus. Infected herds may experience severe reproductivity losses, as well as, increased levels of post weaning pneumonia with poor growth. The reproductive phase typically lasts for two to three months; however, post weaning problems often become endemic. The reproductive disease is characterized by an abortion outbreak that affects both sows and gilts in the last term of gestation. Premature farrowings around 109 and 112 days of gestation occur. The number of stillbirths and weak-born piglets increases and results in a considerable increase in pre-weaning mortality.

[0006] The respiratory phase traditionally has been seen in the nursery, especially in continuous flow nurseries. However, respiratory problems caused by PRRS virus can also be seen in the finisher as part of the porcine respiratory disease complex (PRDC). A reduction in growth rate, an increase in the percentage of unmarketable pigs, and elevated post weaning mortality can occur. Diagnostic findings indicate high levels of pneumonia that associate with the PRRS virus together with a wide variety of other microbials commonly seen as secondary infectious agents. Bacterial isolates may include *Streptococcus suis*, *Haemophilus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, and *Pasteurella multocida* among others. Viral agents commonly involved include swine influenza virus and porcine respiratory corona virus. Affected pigs rarely respond to high levels of medication, and all-in/all-out systems have failed to control the disease.

[0007] PRRSV virus exists as two genotypes referred to as "US" and "EU" type which share about 50% sequence homology (Dea S et al. (2000). Arch Virol 145:659-88). These two genotypes can also be distinguished by their immunological properties. Most sequencing information on various isolates is based on the structural proteins, namely the envelope protein GP5 which accounts for only about 4% of the viral genome, while only little is known on the non-structural proteins (nsp). Isolation of PRRSV and manufacture of vaccines have

been described in a number of publications (WO 92/21375, WO 93/06211, WO93/03760, WO 93/07898, WO 96/36356, EP 0 676 467, EP 0 732 340, EP 0 835 930).

[0008] Vaccination is the key method for alleviating the burden of PRRS as
5 pigs that recover from a PRRS infection will develop an immune response, which under normal circumstances will protect them from being infected again by the same virus strain. However, PRRS virus has the ability to change because of the high rate of by mutation that often occurs in positive, single-stranded, RNA viruses; and therefore, new viral strains may arise. In such cases, cross protection
10 between strains may not exist, and new outbreaks may be observed in farms that had been infected previously. Thus there is a continuing need for additional vaccines.

[0009] The most frequently used method for producing attenuated, live-virus vaccine is to serially passage the virus in a substrate (usually cell culture with a
15 cell line that is permissive to the virus) other than the natural host (S) until it becomes sufficiently attenuated (i.e., reduced in virulence or diseases-producing ability) to be used as a vaccine. For the first passage, a cell culture is infected with the selected inoculum. After obtaining clear evidence of virus replication (e.g., virus-induced cytopathic effects [CPE] in the infected cells), an aliquot of the cell
20 culture medium, or infected cells, or both, of the first passage are used to infect a second cell culture. The process is repeated until one or more critical mutations in the viral genome cause sufficient attenuation so that the virus can be safely used as a vaccine. The degree of attenuation is usually determined empirically by exposing the natural host (S) to progressively greater passage levels of the virus.

[0010] The above procedure is fundamentally sound and has been
25 successfully used for the development of numerous vaccines for human and veterinary use. However, when it comes to industrial scale production, there remains a need to provide an efficient and cost-effective method for production of PRRSV.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0011] The present invention is related to a new method for the production of live PRRS virus for use in the manufacture of such vaccines. The methods described herein may be used in the large scale production of any PRRS virus, including but not limited to including but not limited to PRRSV 94881 PRRSV strain 94881 deposited with the European Collection of Cell Cultures (ECACC) under the Accession Numbers ECACC 11012501 and ECACC 11012502 each deposited on January 25, 2011 in accordance with the provisions of the Budapest Treaty, or any descendant or progeny of one of the aforementioned strains.

10 **[0012]** More particularly, the present invention relates to a method for the commercial scale production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) comprising:

[0013] a) concurrently seeding a large scale culture media with a mammalian cell line that is permissive to PRRSV infection into a bioreactor and
15 infecting the mammalian cells with a PRRSV.

[0014] b) propagating virus for 5 to 7 days post infection;

[0015] c) performing a first harvesting step by removing the media from the bioreactor and isolating propagated virus therefrom;

[0016] d) replenishing the media in the bioreactor and propagating virus
20 for 1 to 4 days;

[0017] e) performing a second harvesting step by removing the media from the bioreactor and isolating propagated virus therefrom;

[0018] f) replenishing the media in the bioreactor and propagating virus for 1 to 4 days and

25 **[0019]** g) performing a third harvesting step by removing the media from the bioreactor and isolating propagated virus therefrom.

[0020] In certain embodiments, the method may further comprise at least one re-feeding and harvest steps subsequent to the third harvesting step

comprising replenishing the media in the bioreactor and propagating virus for 1 to 4 days and performing a fourth harvesting step by removing the media from the bioreactor and isolating propagated virus therefrom.

[0021] Preferably, in the method of production the target multiplicity of infection (MOI) is 0.01 to 0.30 and the mammalian cells are planted at a density of about 7×10^8 to 1.0×10^9 per 300L bioreactor. More particularly, the cell planting density is about 1.0×10^9 per 300L bioreactor. In specific embodiments, the MOI is about 7×10^8 virus particles.

[0022] The method may comprise monitoring the dextrose concentration of the media wherein the first harvest step is performed on the first day when the dextrose concentration of the media decreases to less than 0.1 g/L.

[0023] In the commercial production method, the second harvest is preferably performed 1 or 2 days post-refeeding with media, and the third harvest is performed 1 to 4 days post the second refeeding with media.

[0024] In specific embodiments, the culture media is added to the bioreactor on the day prior to or on the same day prior to addition of the mammalian cell line and the PRRS. Preferably, the culture media is added to the bioreactor one day prior to the addition of the mammalian cell line and the PRRS. The temperature of the bioreactor is set at between 34°C and 38°C.

[0025] In specific embodiments, the media comprises 5% v/v irradiated fetal calf serum.

[0026] The method may be used for the commercial scale production of any PRRSV, including but not limited to PRRSV selected from the group consisting of PRRSV 94881 PRRSV strain 94881 deposited with the European Collection of Cell Cultures (ECACC) under the Accession Numbers ECACC 11012501 and ECACC 11012502 each deposited on January 25, 2011 in accordance with the provisions of the Budapest Treaty, VR 2332, Lelystad virus strain (Lelystad Agent (CDI-NL-2.91), or other strains such as those deposited under the Accession Numbers ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, CNCM

Accession No. I-1140, CNCM Accession No I-1387, CNCM Accession No I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474, and VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, or ECACC V93070108; ATCC deposit VR-2332, ATCC deposit VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385,
5 ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474, and ATCC VR 2402, , or any descendant or progeny of one of the aforementioned strains.

[0027] Also contemplated is a commercial-scale production method for the preparation of a PRRSV comprising:

a. a concurrent seeding of both mammalian cells permissive to
10 infection by the PRRSV and the PRRSV into a bioreactor containing a media suitable for the growth of the cells; and

b. performing three consecutive harvesting steps wherein PRRSV is harvested wherein after each of the first and second harvests, the media is replenished, and wherein:

15 i. the first harvest is performed on the first day that the dextrose concentration of the media decreases to less than 0.1 g/L;

ii. the second harvest is performed 1 or 2 days after addition of the media following the first harvest; and

20 iii. the third harvest is performed between 1 and 4 days after addition of the media following the second harvest. An alternative method is also contemplated that uses a concurrent roller bottle process that is equivalent to the bioreactor process described above. More particularly, the present invention relates to a method for the commercial scale production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) comprising: a) concurrently seeding
25 a large scale culture media with a mammalian cell line that is permissive to PRRSV infection into a roller bottles and infecting said mammalian cells with a PRRSV; b) propagating virus for 5 to 7 days post infection; c) performing a first harvesting step by removing the media from said roller bottle and isolating propagated virus therefrom; d) replenishing the

media in said roller bottle and propagating virus for about 2 days; e)

performing a second harvesting step by removing the media from said roller bottle and isolating propagated virus therefrom; f) replenishing the media in said roller bottle and propagating virus for about 2 days and g)

5 performing a third harvesting step by removing the media from said bioreactor and isolating propagated virus therefrom.

[0028] Another aspect of the invention relates to a PRRSV MLV comprising a PRRSV produced according to the methods described herein formulated with an acceptable adjuvant or carrier for delivery to a pig.

10 BRIEF DESCRIPTION OF SEVERAL VIEWS OF THE DRAWINGS

[0029] Figure 1: Concurrent process for large-scale production of PRRSV 94881.

[0030] Figure 2: Definition and Timelines of the concurrent process for the 300L Bioreactors

15 **[0031]** Figure 3 Viral titers and dextrose profiles for the three concurrent runs in the 300L Bioreactors.

[0032] Figure 4: Viral titers and glutamine profiles for the three concurrent runs in the 300L Bioreactors.

20 **[0033]** Figure 5: Viral titers and DO profiles for the three concurrent runs in the 300L Bioreactors.

[0034] Figure 6: Shows RT-PCT Time PCR results depicting % viremia in animals vaccinated with PRRSV 94881.

[0035] Figure 7: Concurrent process for roller bottle production of PRRSV 94881.

25 **[0036]** Figure 8: Definition and Timelines of the concurrent process for the roller bottle process.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0037] The present invention provides methods for the large scale production of live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) for use in the production of vaccines and other compositions. In typical production methods, the virus is grown on a cell line that is permissive to PRRSV infection. However, in such general methods the cell line is grown to at or near confluence prior to infection with the PRRSV. In the present invention, the inventors have unexpectedly demonstrated that the cell line does not need to be planted and grown prior to infection with PRRSV, but rather that the PRRSV and the cell line may be added to the cell culture process concurrently. This invention thus provides the significant advantage of savings in time, cost and materials when the virus is being mass produced at commercial scale. The term commercial scale refers to volumes of cell culture in excess of 10 L. For example, commercial scale refers to a range of from 10L to 3000L production scale for live PRRSV. In more specific embodiments, the volume is from 30L to about 300L.

[0038] The methods of the present invention may be used for the production of any PRRSV strain, including but not limited to PRRSV strain deposited as ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474, and VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, or ECACC V93070108. In particularly preferred embodiments, the methods of the invention are used to produce PRRSV strain 94881 deposited by Bioscreen GmbH, Mendelstrasse 11, 48149, Muenster, Germany, in the European Collection of Cell Cultures (ECACC), Porton Down, Salisbury, 30 Wiltshire, SP4 0JG, Great Britain, under the Accession Numbers ECACC 11012501 (parental strain) and ECACC 11012502 (high passage attenuated MSV) each deposited on January 25, 2011 in accordance with the provisions of the Budapest Treaty, or any descendant or progeny of one of the aforementioned strains. The viruses grown may be any of the aforementioned viruses in their attenuated format. Alternatively, the viruses may be genetically modified to comprise one or more heterologous nucleic acids that encode further antigenic determinants of one or more swine diseases.

[0039] The skilled person will understand that there are a number of cell lines that are permissive to infection by PRRSV. Exemplary cells are cells porcine alveolar macrophage cells such as those derived from MARC-145 cells. Other cells that can be infected with the PRRSV include MA-104 cells; Baby Hamster
5 Kidney (BHK) cells; Chinese Hamster Ovary (CHO) cells; and African Green Monkey kidney cells other than MA-104 cells or MARC-145 cells, such as VERO cells; that are transfected. In addition, the cells may be primary cells from a swine animal that have been adapted for long term growth in culture. Particularly suitable host cells are the simian cell line MA-104, Vero cells, or porcine alveolar
10 macrophages. PRRSV preferentially grows in alveolar lung macrophages (Wensvoort et al., 1991). A few cell lines, such as CL2621 and other cell lines cloned from the monkey kidney cell line MA-104 (Benfield et al., 1992; Collins et al., 1992; Kim et al., 1993) are also susceptible to the virus and may be used in the large-scale production methods described herein.

[0040] In the exemplary method of the present invention shown in Example 1 below there is provided a concurrent process for the production of PRRSV 94881 MLV. While this procedure is shown for PRRSV 94881 MLV skilled person will understand that this procedure may be readily used for any PRRSV for which large scale production is required.

[0041] The viruses produced by the production method of the invention may be used for any applications for which PRRSV is currently used. In a specific embodiment, the virus produced according to the methods described herein is used to prepare a PRRSV MLV.

[0042] The virus strains grown according to the methods of the invention
25 may be virulent PRRS viruses, attenuated PRRS viruses or indeed PRRS viruses that have been modified to impart further desirable properties to them. This may be achieved by classical propagation and selection techniques, like continued propagation in suitable host cells to extend the attenuated phenotype. Alternatively, the strains may be genetically modified by directed mutation of the
30 nucleic acid sequence of the genome of these strains by suitable genetic

engineering techniques. The genome of PRRSV was completely or partly sequenced (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a, Murthaugh et al, 1995) and encodes, besides the RNA dependent RNA polymerase (ORFs 1a and 1b), six structural proteins of which four envelope glycoproteins named GP2 (ORF2), GP3 (ORF3), GP4 (ORF4) and GP5 (ORF5), a non-glycosylated membrane protein M (ORF6) and the nucleocapsid protein N (ORF7) (Meulenberg et al. 1995, 1996; van Nieuwstadt et al., 1996). Immunological characterization and nucleotide sequencing of European and US strains of PRRSV has identified minor antigenic differences within strains of PRRSV located in the structural viral proteins (Nelson et al., 1993; Wensvoort et al., 1992; Murtaugh et al., 1995).

[0043] Indeed, the exemplary virus grown in the invention is PRRSV 94881 virus. While an attenuated strain is grown using the methods described herein, the virus may easily be a PRRSV 94881 virus that is made into a chimeric virus wherein the backbone of the PRRSV 94881 virus under ECACC Accession No. 11012502 or indeed the parent strain deposited under ECACC Accession No 11012501 is modified to replace the endogenous sequence of one or more of ORF 1a, ORF 1b, ORF 2, ORF 3, ORF 4, ORF 5, ORF 6, or ORF 7 with the corresponding ORF from a different strain of PRRS virus. For example, the different strain of the PRRS virus may be a different European strain such as Lelystad virus strain (Lelystad Agent (CDI-NL-2.91), or other strains such as those deposited under the Accession Numbers ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, CNCM Accession No. I-1140, CNCM Accession No I-1387, CNCM Accession No I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474, and VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, or ECACC V93070108 or indeed may be a U.S. strain such as North American PRRS virus, pT7P129A; ATCC deposit VR-2332, ATCC deposit VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474, and ATCC VR 2402.

[0044] Recombinant techniques for preparing modified sequences are well known to those of skill in the art and usually employ construction of a full-length

complementary DNA copies (infectious clones) of the viral genome which may then be modified by DNA recombination and manipulation methods (like site-directed mutagenesis etc.). This way, for example antigenic sites or enzymatic properties of viral proteins may be modified. Infectious clones of PRRS virus strains of European and North American genotype have been reported in the literature and may be grown using the methods of the invention.

[0045] Preferably, vaccines according to the present invention are modified live vaccines comprising one or more of these strains alive in a suitable carrier, but inactivated virus may also be used to prepare killed vaccine (KV). MLV are typically formulated to allow administration of 10^1 to 10^7 viral particles per dose, preferably 10^3 to 10^5 particles per dose, more preferably 10^4 to 10^5 particles per dose (4.0 - $5.0 \log_{10}$ TCID₅₀). KV may be formulated based on a pre-inactivation titre of 10^3 to 10^{10} viral particles per dose. The vaccine may comprise a pharmaceutically acceptable carrier, for example a physiological salt-solution. The vaccine may or may not comprise an adjuvant. An example of a suitable adjuvant is α -tocopherol acetate which can be obtained under the trade name Diluvac Forte®. Alternatively, for example alum based adjuvants may be used.

[0046] Pigs can be infected by PRRSV via the oronasal route. Virus in the lungs is taken up by lung alveolar macrophages and in these cells replication of PRRSV is completed within 9 hours. PRRSV travels from the lungs to the lung lymph nodes within 12 hours and to peripheral lymph nodes, bone marrow and spleen within 3 days. At these sites, only a few cells stain positive for viral antigen. The virus is present in the blood during at least 21 days and often much longer. After 7 days, antibodies to PRRSV are found in the blood. The combined presence of virus and antibody in PRRS infected pigs shows that the virus infection can persist for a long time, albeit at a low level, despite the presence of antibody. During at least 7 weeks, the population of alveolar cells in the lungs is different from normal SPF lungs.

[0047] A vaccine may be presented in form of a freeze-dried preparation of the live virus, to be reconstituted with a solvent, to result in a solution for injection.

Thus, after the harvesting steps of the present invention, the virus may be combined and freeze dried. The solvent may e.g. be water, physiological saline, or buffer, or an adjuvanting solvent. The solvent may contain adjuvants, for example α -tocopherol acetate. The reconstituted vaccine may then be injected into
5 the a pig, for example as an intramuscular or intradermal injection into the neck. For intramuscular injection, a volume of 2 ml may be applied, for an intradermal injection it is typically 0.2 ml. In a further aspect, the present invention therefore is a vaccine product, comprising in separate containers a freeze-dried composition of the virus, and a solvent for reconstitution, and optionally further containing a leaflet
10 or label comprising instructions of use.

[0048] A vaccine prepared from a virus produced by a method of the invention may not only comprise one or more of the aforementioned strains, but may include further components active against PRRS or other porcine viral or bacterial diseases, like porcine circovirus or classical swine fever virus. Therefore,
15 the invention further relates to a vaccine as described, characterized in that it contains at least one further antigen active against a porcine disease which is not PRRS. In addition, the vaccine may comprise certain pharmaceutically or veterinary acceptable adjuvants. One such adjuvant is α -tocopherol. Thus, new vaccine compositions, in particular, PRRS virus vaccines comprising PRRSV
20 94881 may be further improved by addition of adjuvants. Such improvements comprise preparation of the vaccines in combination with adjuvants that enhance the efficacy of the vaccine such that a better clinical response/outcome is seen with the administration of the combination of the adjuvant and the vaccine as compared to administration of the vaccine alone. For example, the vaccine
25 compositions of the invention may comprise a PRRSV 94881 virus vaccine and an adjuvant selected from the group consisting of MCP-1, Haemophilus sonnus fractions, Carbapol™ and combinations thereof. In some embodiments, the virus vaccine comprising the PRRSV 94881 virus vaccine, which may be a recombinant subunit vaccine or alternatively may be a live attenuated virus vaccine. An
30 exemplary live vaccine that exists is Ingelvac®PRRS MLV and the PRRSV 94881 may be formulated in a manner similar to Ingelvac®PRRS MLV.

[0049] In addition to the above, the vaccine compositions may contain other ingredients so long as the other ingredients do not interfere with the adjuvant properties of the MCP-1, Haemophilus sonnus fractions, Carbapol™ or other carbomer or the underlying virus vaccine. Such other ingredients include, for example, binders, colorants, desiccants, antiseptics, wetting agents, stabilizers, excipients, adhesives, plasticizers, tackifiers, thickeners, patch materials, ointment bases, keratin removers, basic substances, absorption promoters, fatty acids, fatty acid ester, higher alcohols, surfactants, water, and buffer agents. Preferred other ingredients include buffer agents, ointment bases, fatty acids, antiseptics, basic substances, or surfactants.

[0050] The content or amount of the adjuvants used in the invention may vary and can be determined by taking into consideration, for example, the properties of the PRRS virus vaccine being used, and the dosage form. The adjuvant may comprise, for example, 1 to 100% by weight. The PRRSV 94881-based compositions of the invention are produced by mixing together the adjuvant component and the virus vaccine component, either alone or with various other ingredients. The compositions may be such that the virus vaccine and the adjuvant are presented as one formulation or alternatively, the adjuvant and the vaccine are presented in distinct formulations that can be administered simultaneously or sequentially.

[0051] The adjuvant component may be administered separately from the virus vaccine in the administration to organisms. Alternatively, the adjuvant according to the present invention, together with the virus vaccine, can be administered as a single vaccine composition. The virus vaccine may be any virus vaccine. More specific embodiments contemplate the use of a PRRS virus vaccine comprising PRRSV 94881. In addition such a vaccine may be combined with other vaccines such as Ingelvac® PRRS MLV and/or Porcilis® PRRS. This is merely one exemplary PRRS virus vaccine and other such vaccines can be supplemented with the adjuvants described herein.

[0052] The immunogenic compositions described herein are particularly advantageous in the induction of the production of an antibody response to PRRS virus. In particular it is shown herein that the use of these specific adjuvants, and in particular, MCP-1, enhances immune response to PRRS virus when there is a combined administration of the adjuvant and the PRRS virus vaccine as compared to administration of vaccine alone. Such administration is shown to produce a lessening of the severity of clinical symptoms, such as lung lesions, anorexia, skin discolorations, lethargy, respiratory signs, mummified piglets, coughing, diarrhea and combinations thereof, that are associated with PRRSV infection. Indeed, there is a greater lessening of the severity of the clinical symptoms associated with PRRS virus infection observed with the combination of the vaccine and adjuvant as compared to the lessening of the severity of such symptoms produced by administration of vaccine alone in the absence of said adjuvant.

[0053] The compositions thus particularly enhance the clinical outcome in a diseased animal as compared to the outcome from administration of PRRS virus vaccine alone. In specific embodiments, the enhanced clinical outcome is a reduction of the percentage of lung lesions when compared to animals not receiving the immunogenic composition in combination with said adjuvant. In other embodiments, the enhanced clinical outcome is a reduction of viremia in animals when compared to animals not receiving the immunogenic composition in combination with said adjuvant.

[0054] Thus, in one aspect, the invention relates to an improved vaccine, more particularly an improved PRRS virus vaccine, wherein the improvement comprises admixing with the virus vaccine an adjuvant selected from the group consisting of MCP-1, Haemophilus sonnus fractions, carbapol and combinations thereof. The vaccine composition of the invention may further comprise a pharmaceutically acceptable carrier. In addition, the vaccines may comprise other active ingredients including HS, ORF 5, INF alpha, Poly ICLC, IL-12 for further enhancing the function of the PRRS vaccine. Such adjuvants may be added alone or in combination with MCP-1.

[0055] The vaccine compositions of the invention may be formulated by any method known in the art of formulation, for example, into liquid preparations, suspensions, ointments, powders, lotions, W/O emulsions, O/W emulsions, emulsions, creams, cataplasms, patches, and gels and is preferably used as medicaments. Thus, according to another aspect of the present invention, there is provided a pharmaceutical composition comprising the above vaccine composition. The vaccine composition according to the present invention, when dermally administered, can significantly induce antibody production. Accordingly, in another preferred embodiment of the present invention, the vaccine composition can be provided as a transdermal preparation.

[0056] Further, as described above, the virus and adjuvant in the present invention may be administered, to an organism, together as a single vaccine composition, or as an adjuvant preparation separate and distinct from the antigenic PRRS virus component of the vaccine, whereby the adjuvant acts in a manner such that amount of an antibody produced in the organism in response to the PRRS virus vaccine can be significantly increased as compared to administration of the PRRS virus vaccine alone. Thus, according to a still another aspect of the present invention, there is provided a method for increasing the amount of an antibody produced against PRRS virus, the method comprising administering an immunologically effective amount of the PRRS virus vaccine, and an adjuvant selected from the group consisting of MCP-1, Haemophilus sonnus fractions, carbapol and combinations thereof either alone or in combination with a further component selected from the group consisting of HS, ORF 5, INF alpha, Poly ICLC, IL-12 and combinations thereof, in an amount effective as an immunoadjuvant simultaneously or successively into the organism.

[0057] When the adjuvant and the PRRS virus vaccine are administered to an organism, the clinical outcome of the animal is enhanced. The effective amount of the adjuvant and the immunologically effective amount of the PRRS virus vaccine may be properly determined by a person having ordinary skill in the art by taking into consideration, for example, the type and properties of the antigenic

substance, the species of organisms, age, body weight, severity of diseases, the type of diseases, the time of administration, and administration method and further using the amount of an antibody produced against the antigenic substance in the organism as an index.

5 **[0058]** The PRRS virus vaccine, the adjuvant, or combinations thereof can be administered to organisms by any suitable method selected depending, for example, upon the condition of patients and properties of diseases. Examples of such methods include intraperitoneal administration, dermal administration (for example, subcutaneous injection, intramuscular injection, intradermal injection, 10 and patching), nasal administration, oral administration, mucosa administration (for example, rectal administration, vaginal administration, and corneal administration). Among them, intramuscular administration is preferred.

[0059] An exemplary therapeutic dose of PRRSV MLV is about two milliliters (2 mLs). Skilled artisans will recognize that the dosage amount may be 15 varied based on the breed, size, and other physical factors of the individual subject, as well as, the specific formulation of PRRSV MLV and the route of administration. Preferably, the PRRSV MLV is administered in a single dose; however, additional doses may be useful. Again, the skilled artisan will recognize through the present invention that the dosage and number of doses is influenced 20 by the age and physical condition of the subject pig, as well as, other considerations common to the industry and the specific conditions under which the PRRSV MLV is administered.

[0060] In certain other embodiments, the vaccine may be a multivalent vaccine that comprises two or more PRRS viruses where at least one of the PRRS 25 viruses is the attenuated 94881 virus deposited under ECACC Accession No. 11012502. The other PRRS viruses may be one or more selected from the group consisting of PRRSV strain deposited under the Accession Numbers Lelystad virus strain (Lelystad Agent (CDI-NL-2.91), or other strains such as those deposited under the Accession Numbers ECACC 04102703, ECACC 04102702, 30 ECACC 04102704, CNCM Accession No. I-1140, CNCM Accession No I-1387,

CNCM Accession No I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474, and VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, or ECACC V93070108 or indeed may be a U.S. strain such as North American PRRS virus, pT7P129A; ATCC deposit VR-2332, ATCC deposit VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474, and ATCC VR 2402.

[0061] The vaccines based on PRRS viruses may be used to vaccinate both piglets and sows. In one aspect of the invention, a particular dose regimen is selected based on the age of the pig and antigen selected for administration. This will permit pigs of any age to receive the most efficacious dose based on the present invention's discovery that PRRSV infection (from both wild type exposure and vaccination) is cleared much more quickly in older animals. Thus, in some respects, vaccination of older animals is preferred but that vaccination of younger pigs, including those three weeks of age and younger helps to induce active immunity and is still very beneficial. Animal age may be an important factor in PRRS control and may be a factor that impacts vaccination and development of an effective immune response. Thus, age, disease management, animal husbandry, innate, and active immunity are important and need to be considered in control strategies.

[0062] The PRRSV 94881 vaccine can be administered in any conventional fashion and in some preferred methods the administration is nasally. It is preferred that the administered PRRSV vaccine provide its benefits of treating or reducing the severity of or incidence of PRRSV infection after a single dose, as with Ingelvac®, however, if other antigens or combination or multivalent vaccines are selected, it should be understood that they can be administered in their conventional fashion, which may include one or more booster doses after the initial administration. Those of skill in the art will be able to determine appropriate dosing levels based on the PRRSV vaccine selected and the age range of the animal to which the antigen will be administered.

[0063] Example 1:

[0064] Exemplary Scale-Up for Production of PRRSV 94881 MLV

[0065] The 300L bioreactor process scale up for PRRSV 94881 used MA104 cells that were between 64-84 passage. These cells were expanded in 850cm² Roller bottles (Corning). The cells were cultured concurrently with virus infection in 300L air-lift Bioreactors. Throughout the culture process the media dextrose/lactate concentrations were monitored in g/L. At harvest of the fluids were discarded and the virus samples were retained.

[0066] The media compositions was as shown in the following table:

Component	Quantity
Fetal Bovine Serum Gamma irradiated	5%
MEM without Phenol Red Powder	9.6g/L
Neomycin Sulfate	30mg/L
Sodium Bicarbonate	1.4g/L
Hydrochloric acid	To adjust pH

10

[0067] The MEM without Phenol Red medium, neomycin and 1.4g/L sodium bicarbonate were prepared and filtered. The FBS was added to the media concurrently with the media being placed in the bioreactor. The amount of neomycin added is calculated by: vol(L) x 30mg/L ÷ Potency (mg/g base).

15 **[0068]** The concurrent process for the growth of PRRSV 94881 is comprises of planting AK MA104 cells into the bioreactor and concurrently infecting the cells with the PRRSV 94881 viral seed. Figure 1 outlines the concurrent process. In Figure 2 there is provided timelines for the concurrent process outlined in Figure 1.

[0069] In the concurrent process, a volume of 270L of media was sterile filtered into the bioreactor. The media was added to the vessel on the same day or the day before the cell and serum addition. If the media is added to the bioreactor the day before the addition of the cells and serum, it is recommended that the temperature control be activated such that the media is maintained at 35°C, the pH in the control mode with the pH maintained 7.25 $\pm$ 0.1 and DO monitor mode and agitation set at 35 rpm. At the day of the addition of the cells and irradiated fetal bovine serum (IFBS), the temperature control is set at 36°C. The IFBS is added to the bioreactor after addition of the media and before seeding of the cells. The target concentration of the IFBS is 5% v/v, which in the 270L volume is a 14.0L volume of IFBS per bioreactor.

[0070] Three 300L bioreactor rounds were performed. The bioreactor parameters were: temperature set point at 36°C, pH set point at 7.25 in control mode, DO monitor and agitator at 35 rpm. Tables 3, 4, and 5 show data recorded for DO % from the OIT, dextrose and lactate from YSI, and pH and L -Glutamine from NOVA. PD titers are for reference only. QC titers are the official titers.

Table 3: Results for lot 00IPD-X run in 300L bioreactor								
days	pH	DO %	Dextrose g/L	Lactate g/L	Gln mmol/L	Titer		Comments
						PD	QC	
			YSI	YSI	NOVA	TCID50	TCID50	
-1	7.24	168	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Media only
0PI	7.2	92	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1PI	7.26	168	1	0.073	2.63	3.67	N/A	N/A
2PI	7.25	83	0.95	0.12	2.36	4.9	N/A	N/A
3PI	7.23	74	0.742	0.262	2.14	5.88	N/A	N/A
4PI	7.24	63	0.408	0.58	1.72	6.45	7.0	N/A
5PI	7.06	30	0.044	0.921	1.19	6.50	7.3	DO control
6PI	7.25	30	0.011	0.902	0.74	6.38	6.7	clear
7PI	7.24	30	0	0.855	0.49	7.40	7.4	cloudy

[0071] Table 3 shows results from lot 001PD-X during 7 days of infection. Samples were taken daily and the run was terminated on day 7PI. pH was set at 7.25 and it was constant during run except on day 4PI when it dropped below 7.0. On day 4PI, glucose dropped to 0.4 from 0.74 the day before, glutamine started to

- be consumed and the titer started to go up about one log. The peak titer was observed on day 5PI when glucose was totally consumed (≤ 0.1 g/L). Also on day 5PI, DO dropped to 30% and Control was started to avoid DO drop to zero overnight. Day 6PI titer dropped and then increased to 7.4. on day 7PI. The sample was cloudy on day 7 PI.

Table 4: Results for lot 002PD-X run in 300L bioreactor								
days	pH	DO %	Dextrose g/L	Lactate g/L	Gln mmol/L	titer PD	Titer QC	comments
			YSI	YSI	NOVA	TCID50	TCID50	
-1	7.27	116	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Added media
0PI	7.2	83	1.04	0	N/A	N/A	N/A	Added cells/serum/seed
1PI	7.25	75	1.01	0.073	1.64	3.88	n/a	N/A
2PI	7.25	74	0.954	0.105	1.73	5.5	n/a	N/A
3PI	7.24	70	0.762	0.223	1.41	5.93	6	N/A
4PI	7.19	60	0.409	0.561	1.25	6.62	6.5	N/A
5PI	7.21	30	0.005	0.881	0.9	6.79	7.5	HARVEST-I
R0PI (re-fed)	7.24	116	0.001	0.858	0.64	N/A	N/A	DO probe failed
R1PI	6.99	116	0.247	0.726	1.38	7.13	7.5	N/A
R2PI	7.15	116	0.0	0.894	0.95	7.06	7.0	dextrose was zero
R3PI	7.13	116	0.0	0.865	0.66	6.69	7.5	clear
R4PI	7.13	116	0.0	0.819	0.21	7.52	7.5	clear
R5PI	7.13	116	0.0	N/A	0.1	7	7.3	Some cloudiness

[0072] Table 4 shows results from lot 002PD-X(R0P1 is the point at which the culture is re-fed). Based on titer results from lot 001PD-X, harvest day was set at day 5PI. Lot 002PD-X days 1 PI through 5 PI were consistent with lot 001PD-X. The bioreactor was harvested and then re-fed on day 5 PI. The growth curve for harvest-II was established. Samples were taken on daily basis for 5 days. Dextrose was completely consumed by day R2PI. Titer was at peak for 5 days (0.5 logs variation is within the assay error). Glutamine was totally consumed by day R5PI. The DO probe failed after re-feed. The DO level couldn't be measured (most likely close to zero). On day R4PI cells were still attached, since sample in bottle was clear. . On day R5PI, some cloudiness was observed on the sample bottle indicating that cells might have started to come off springs.

Table 5: Results for lot 003PD-X run in 300l bioreactor								
days	pH	DO %	Dextrose g/L	Lactate g/L	Glutamine mmol/L	Titer PD	Titer QC	comments
			YSI	YSI	NOVA	TCID 50	TCID 50	
0PI	7.49	78	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1PI	7.25	69	0.987	0.078	2.05	4.38	4.7	DO monitor/pH control
2PI	7.23	66	0.935	0.107	1.9	5.13	5.7	N/A
3PI	7.22	60	0.783	0.221	1.71	6.2	6.5	N/A
4PI	7.29	53	0.453	0.519	1.45	6.36	6.6	N/A
5PI	7.1	30	0.049	0.899	1.17	6.36	7.0	HARVEST-I
0PI (refeed)	7.19	71	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	DO Monitor
R1PI	6.98	18	0.305	0.702	2.69	7.26	7.3	N/A
R2PI	7.23	7	0.0	0.917	1.82	6.85	7.5	HARVEST-II
0PI 2 nd refeed	7.21	74	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2R1PI	6.91	13	0.097	0.853	1.69	7.0	7.5	DO control at 10%
2R2PI	7.19	3	0.0	0.883	0.82	7.2	7.3	DO monitor
2R3PI	7.17	2	N/A	N/A	0.42	7.46	7.5	cloudy
2R4PI	7.24	18	N/A	N/A	0.22	7.0	7.5	DO is going up

2R5PI	7.24	47	N/A	N/A	0.13	6.68	7.0	cloudy
2R6PI	7.22	62	N/A	N/A	0.06	6.5	7.0	cloudy
2R7PI	7.24	68	N/A	N/A	0.04	6.36	6.2	cloudy

- [0073]** Table 5 shows results from lot 003PD-X. Based on titer results from lot 002PD-X, Harvest-II day was set at day 1PI or 2PI. It was decided to harvest fluids on day 2PI to give flexibility for Production. A growth curve for Harvest-III was established for 7 days. Samples were taken on daily basis. Dextrose was consumed completely by day 2R2PI. The titer was at peak for 4 days and then dropped to 7.0 for 2 days (0.5 logs variation was within the assay error), then dropped to 6.2 on day 7PI. Glutamine was totally consumed by day 2R5PI. DO was taken out of Control on day 2R2PI to monitor cell death.
- [0074] Harvest-I phase for virus propagation in the 300L scale:** The growth curve for Harvest-I (lot 001PD-X) showed that viral particles continued growing till day 7PI despite of dextrose being completely consumed (≤ 0.1 g/l) by day 5 PI. Glutamine consumption started when dextrose was about half of the initial concentration of 1 g/L (day 4PI), and then after dextrose was consumed, glutamine seemed to be the primary source of energy. The inconsistency in the glutamine readings for the first 2-3 days could be attributed to fluctuations in the NOVA instrument since the medium only contains 2mmol/L. The DO levels were consistently declining during the dextrose/glutamine metabolism and the virus propagation.
- [0075]** The virus propagation kinetics suggested harvesting the virus 5-7 days PI. The variation in QC titers between day 4 PI and 7 PI were within the variation of the assay (± 0.71 logs/ml). The Harvest-I criterion was the time when dextrose was completely consumed (≤ 0.1 g/l) which was consistent with 30L data (Study# 6127-1310-09K-198). Therefore, the offline measurements of dextrose starting from day 4 PI would be necessary to track the dextrose levels. Table 3 showed that PRRSV 94881 virus was stable for 3 days (5-7days PI) in the 300L bioreactor after dextrose was depleted. However, if a second harvest is to be performed, based on results from table 4 and 5, it is recommended that Harvest-I

be performed on the first day dextrose concentration is <0.1 g/L (using YSI measurement) to ensure cells' adherence to the springs (carriers) in the bioreactor.

[0076] Harvest-II phase for virus propagation in the 300L scale: For Lot 002PD-X and 003PD-X, after Harvest-I was performed on day 5PI, Fresh medium and 5% serum were added to generate the second harvest viral fluids (Tables 4 and 5). The MEM Medium (270-280L) with IFBS (5% v/v) were added to the bioreactor following the same procedures as stated for setting up the first harvest material. A growth curve for harvest-II was conducted for 5 days on lot 002PD-X and the peak titer was achieved on day 1days post re-feed (See Table 4). The titer was stable for 4 days. The virus titer at day 1 post-refeed was comparable to the titer of the first harvest Table 2). Dextrose level was completely consumed on day 2 PI. A range of four days post-refeed could be used for the second harvest criterion. However, performing the second harvest on day 4PI could have an effect on the third harvest since some cloudiness was observed on fluid samples that were taken on day 4 PI indicating cell death or detachment from springs. So for lot 003PD-X harvest-II was performed on day 2PI. Based on data from lot 003PD-X it is recommended that Harvest II target days be 1-2PI if a second reefed and a third harvest is going to be performed.

[0077] Harvest-III phase for Virus propagation in the 300L scale: For lot 003PD-X (Table 5) after Harvest II that was performed on day 2PI, additional medium and serum was added to the vessel for generation of third harvest viral fluids (Table 5). The MEM Media (270-280L) with IFBS (5% v/v) were added to the bioreactor following the same procedures as stated for setting up the first harvest material. A growth curve for harvest-III was conducted for 7 days and the peak titer was achieved on day 1 post re-feed (See Table 5). The titer was stable for 4 days. The virus titer at day 1 post-refeed was comparable to the titer of the second harvest (Tables 4 and 5). Dextrose was completely consumed on day 1 PI. A range of four days post-refeed could be used for the third harvest criterion.

[0078] The three graphics below represent the dextrose, glutamine and DO profiles, and the titers for the three runs performed in the 300L bioreactor. The purpose of the graphics is to show the consistency of the three runs.

[0079] Figure 3 shows a summary of all three runs performed in the 300L scale for dextrose consumption and virus titers. Harvest-I profile for the three runs were very consistent, dextrose was totally consumed (≤ 0.1 g/l) by day 5PI and it coincided with peak titer on the three runs performed. After the first refeed, dextrose was below 0.3g/l for lots 002PD and 003PD on day 1PI and the titer was already at peak. On day 2PI, dextrose was completely consumed and virus titer stayed at peak. For harvest III in lot 003PD, when second refeed was performed on day R2PI, dextrose was down to less than 0.1 g/L by day 2R1PI and the titer was at peak.

[0080] Figure 4 shows a summary of all three runs performed in the 300L scale for glutamine consumption and virus titers. As can be seen for harvest-I profile for the three runs were very consistent. Glutamine dropped to half its initial concentration of 2 mmol/L by day 5PI and it coincided with peak titer on the three runs performed. After the first re-feed, glutamine dropped to half of its initial concentration by day 2 PI for lots 002PD and 003PD and titer was already at peak since day 1 PI. For harvest III in lot 003PD, when second re-feed was performed on day R2PI. Glutamine was slowly being consumed to 0 by day 5 PI and virus titer was consistent, then cells started to die and titer dropped by day 7PI.

[0081] As can be seen for harvest-I profile, the three runs were very consistent, DO down to 30% by day 5 PI and it coincided with the peak titers on the three runs performed. After first re-feed, DO probe failed for lot 002PD-X, so data is not available, on lot 003PD-X DO dropped on day 1 PI, coinciding with peak titer. For harvest-III in lot 003PD, when second re-feed was performed on day R2PI DO was rapidly decreasing until day 3 PI when cells started to die and DO was consumed to 0 by day 5 PI and virus titer was consistent, then cells started to die and titer dropped by day 7PI.

Table 6: Summary of the conditions and results of concurrent process in 300L bioreactor runs*.

Lot	PCD	MOI	TOH1	Titer H1	TOH2	Titer H2	TOH3	Titer H3
001PD-X	7.0×10^9	0.1	5	7.3	N/A	N/A	N/A	N/A
002PD-X	7.0×10^9	0.1	5	7.5	1-4	7.5	N/A	N/A
003PD-X	7.0×10^9	0.1	5	7.0	2	7.5	1-4	7.5

5 *Target conditions (0.1MOI, 7.0×10^9 total cells per 300L bioreactor, pH 7.25, and 36°C)

(H1): Denotes the first harvests in days post infection.

(H2): Denotes the second harvest in days post infection.

(H3): Denotes the third harvest in days post infection.

10 **[0082]** The viral fluids from Lot 001PD-X were bleached and discarded. One liter from Lot 002PD-X harvest-I was kept and SGS added (25% v/v) for research purposes, the rest of fluids were bleached and discarded. Two liters from lot 003PD-X Harvest II were kept frozen for concentration purposes, the rest of fluids were bleached and discarded

15 **[0083] Range of Planting Cell Density (PCD) for 300L scale:** The target planting cell density (PCD) is 7.0×10^9 total cells per 300L bioreactor with a working volume of 270-280L. Based on the data from 30L Final Process Transfer Report (6127-1310-09K-198), the total cell planting range is between 7.0×10^8 - 1.0×10^9 per 30-L bioreactor. Due to time constraints only target cell planting
20 density was evaluated.

[0084] Range of the Multiplicity of Infection (MOI) for 300L scale: The target MOI of 0.1 is ideal for propagation of PRRSV 94881 within this growth system. Low and high MOI level of 0.01 and 0.3, respectively, were examined in the 30L bioreactors.

25 **[0085] Risk Analysis:** The recommended 300 L bioreactor concurrent process parameters are outlined in Table 11. Only target parameters were tested

and considered for whether they were critical or non-critical to the process. Ranges were evaluated at the 30L scale. The definitions are as follows:

- Critical parameters are those parameters that are critical to quality attributes of the final product;
- 5 • Non critical parameters are those parameters that can either be controlled directly within the defined range or have a wide operational range so a deviation from the set-point is non-critical. Non-critical parameters aid in controlling the critical parameters within the defined range
- 10 • "For Information Only" parameters are parameters that are monitored to gain additional information about the process, but have no direct correlation to the attributes of the final product.

Table 7 : Summary of 300L bioreactor Concurrent Process parameters for PRRSV 94881 MLV

Parameter	*Lower Limit Tested	*Upper Limit Tested	*Accepted Range	Accepted Target	Critical/Non-Critical
MOI	0.01	n/a	0.01-0.30	0.10	NC*
Cell Planting Density	7.0×10^9 cells	1.0×10^{10} cells #	7.0×10^8 cells to 10×10^9 cells	7.0×10^9 cells	NC*
Time of 1 st Harvest (Days post infection)	Day 4	Day 7	Day 5 – Day 7 PI	Day 5 – 7 PI	Critical **
Temperature	35°C	38°C	36±1°C	36°C	NC*
pH	6.5	7.9	6.9 – 7.9	7.2	NC*
Time of 2 nd Harvest (Days post re-feed)	Day 1	Day 5	Day 1 – Day 4	1-2	Critical***
Time of 3 rd Harvest (Days post re-feed)	Day 1	Day 7	Day 1 – Day 4	1-4	Critical

15 * Non critical within the examined range at the 30L scale.

** First-Harvest criterion is decided by the time of the complete consumption of dextrose within the period of 5-7 days PI. However if a second harvest is to be performed Harvest-I should be on the first day dextrose is 0.1g/L

*** Fluids are stable for 5 days. However if a third harvest is to be performed
5 harvest should be between days 1 and 2

Based on 30L data for scale-up

[0086] Conclusions and Process Recommendations: The concurrent process scale up from 30L to 300L bioreactor was successfully achieved. Harvest-I was within the range of 30L bioreactor for days of harvest and titer. Harvest-II
10 was also successful with titers comparable of Harvest-I. The titer of the 2nd harvest was stable for 4 days. An additional (third) harvest was achieved with titers comparable to harvest-I and II. The titer of the third harvest was stable for at least 4 days.

[0087] The recommendations for a preferred 300L bioreactor concurrent
15 process for PRRSV 94881 MLV are as follows:

[0088] Virus propagation, HARVEST-I: The media composition was MEM without Phenol Red, 30mg/L Neomycin and 1.4 g/L Sodium bicarbonate. MA104 cells were planted at a density of 7×10^9 / 300L spring bioreactor in 270 - 280L of media supplemented with 14.0L of Fetal Bovine Serum 5% v/v (range: 7×10^9 - 1×10^{10} /300L spring bioreactor). The temperature of the bioreactor was controlled at
20 $36 \pm 1^\circ\text{C}$. DO is set at "Monitor Mode". Activate DO Control at Set Point of 10% once DO level drops to 10 - 30%. pH 7.2 is set at Control Mode. PID parameters used for pH High (CO2 addition) were:

25	Gain	300.00
	Reset mins per repeat	2.20
	Rate, minutes	0.50
	Fine valve spam pH units	0.03
	Fine valve CV limit	5%

[0089] The air flow flow rate is set at 2.0 SLPM; the CO₂ flow rate at 2.0
30 SLPM; the O₂ flow rate at 2.0 SLPM; the N₂ flow rate set at at 2.0 SLPM and total gas sparge rate should be at 2.0 SLPM.

[0090] The target MOI is 0.1 (range 7×10^8 - 1×10^9 virus particles/300L spring bioreactor).

[0091] For harvest-I criterion, the offline sampling of dextrose measurements are taken starting on day 4 PI. DO trend could be used as indicator. Harvest-I should be performed when dextrose is ≤ 0.1 g/L (range 2 days +/-) which usually occurs between 5-7 days PI. However if a second harvest is to be performed Harvest-I is recommended on the first day dextrose concentration is ≤ 0.1 g/L.

[0092] First Re-Feed - HARVEST-II: After the first Harvest, re-feed the bioreactor with 270 - 280L of media composition MEM without Phenol Red, Neomycin and 1.4 g/L Sodium bicarbonate supplemented with 14.0 L of Fetal Bovine Serum (5% v/v). The re-feed is performed under same conditions as the first harvest media set-up (see First Harvest parameters above). pH control is to remain at a set point of 7.2. PID parameters used for pH High (CO₂ addition) were:

Gain	300.00
Reset mins per repeat	2.20
Rate, minutes	0.50
Fine valve spam pH units	0.03
Fine valve CV limit	5%

[0093] Temperature control remains on at a set point of $36 \pm 1^\circ\text{C}$. DO control is set at Monitor Mode.

[0094] Second Re-Feed - HARVEST-III: Immediately after the second harvest, re-feed the bioreactor with 270 - 280L of media composition MEM without Phenol Red, Neomycin and 1.4 g/L Sodium bicarbonate supplemented with 1.40 L of Irradiated Fetal Bovine Serum (5% v/v). The re-feed is performed under same conditions as the first harvest media set-up (see second harvest parameters above). pH control is to remain at a set point of 7.2. PID parameters used for pH High (CO₂ addition) were:

Gain	300.00
Reset mins per repeat	2.20
Rate, minutes	0.50
Fine valve spam pH units	0.03
Fine valve CV limit	5%

[0095] Temperature control is to remain on at a set point of $36 \pm 1^\circ\text{C}$. DO is set at Monitor Mode. Current test results show that the optimal time is between days 1 - 4 post re-feed for third Harvest viral fluids.

[0096] It should be understood that the above process is exemplary and
5 may be further modified to increase yield and/or decrease costs of running the bioprocessor. For example, changes in parameters may include, but are not limited to: Reducing the serum concentration for second and third harvests, reducing cell planting density, adding cells and seed in the same bottle and let it stir, so virus propagation can be shorten for harvest I. Also, the virus yield may be
10 further improved by one more re-feed for a possible Harvest IV. Feeding spent media components, such as, but not limited to, glucose and glutamine

[0097] EXAMPLE 2

[0098] In a specific example the PRRSV 94881 produced according to the method described above was used to determine the efficacy of the PRRSV 94881
15 in vaccinating pigs. In this study, Piglets from 4 to 13 days old were vaccinated intramuscularly with a composition comprising $10^{7.6}$ TCID₅₀ in 2 ml (day 0 of study). At day 13, the piglets were weaned and were monitored for various disease parameters through to day 90. Study parameters included monitoring viremia, presence of virus in tissues and secretions, clinical observations, lung
20 lesions and weight gain.

[0099] Each of the study groups: the vaccinates, the sentinels and the controls were weighed on study day 0, 14, 28, 56 and 90. Blood was sampled every alternate day between days 0 and 14 and once a week to day 90 for both the vaccinated group and the sentinels and once a week throughout the study
25 periods for the controls up to day 90.

[0100] Nasal, oral and faecal swabs were taken every alternate day between days 0 and 14 and once a week to day 56 for both the vaccinated group and the sentinels and once a week throughout the study periods for the controls up to day 56.

[0101] Necropsy was assessed in the vaccinated group in two pigs every other day from Day 0 to 14 and one a week day 14 to day 90 with remaining pigs at day 90. In the sentinel group 5 pigs at day 56 with remaining at Day 90. Control group 2 pigs every other day between Day 0 to day 14, once a week
5 between day 14 and day 56 and remaining pigs at day 90.

[0102] Clinical observations were taken every day.

[0103] Quantitative RT-PCR was performed using PRRSV European specific primers for samples from blood, oral, faecal, and nasal swab, as well as lung lavages.

10 **[0104]** From these studies data showed that the piglets showed normal health except for a few pigs that were lame. Post-mortem there were no abnormalities at necropsy except that 1-2 animal showed signs of mildly enlarged inguinal lymph nodes. Importantly, it was seen that there were no lung lesions observed with the vaccinated group.

15 **[0105]** Figure 6 shows the percentage of viremic animals in the sentinel group as compared to the group vaccinated with a composition containing the attenuated PRRS virus strain deposited at ECACC Accession No. 11012502 showing efficacy of the PRRS virus produced according to the methods of the invention in providing protective immunity to pigs.

20 **[0106]** EXAMPLE 3

[0107] The following equipment and reagents (Table 8) were used in the development of the concurrent roller bottle process for EU PRRS 94881:

Table 8: Equipment

Process Step	Procedure	Equipment
MA104 (passages 58-78) and AK- MA104 (passages 64-84) cell maintenance. Same cell line, different passages	Maintenance and scale-up, according to process records BPF-777 and BPF-778	850cm ² Roller Bottles (CORNING)
Cell count	Automated count	Vi-Cell
Cell Culture	Cell growth	850cm ² Roller Bottles (CORNING) Roller rack and incubator
Virus Production	Infection	
	Dextrose/Lactate Conc. g/L (± 5% assay variation)	YSI 2700
	Sampling	pipettes

[0108] MEM with Phenol Red medium and 1.4 g/L Sodium Bicarbonate was obtained from SAFC. Table 9 describes the Medium composition, plus serum concentration. This medium was used to propagate the virus including all roller bottle re-feeds.

Table 9: MEM Media Composition.

Catalog/Item #	Component	Lot number	Quantity per roller bottle
700754	Fetal Bovine Serum Gamma irradiated, US	10D837	20 mL (5% v/v)
62892-1000M3056	MEM with Phenol Red	10L259	400mL

[0109] Concurrent Process with three harvests:

[0110] The concurrent process added media with serum, AK- MA104 cells and EU PRRS 94881 virus seed in a container. Then, the contents of the container were mixed and dispensed into the roller bottles (TOI equals zero days PP). Figure 7 illustrates the concurrent process method and Figure 8 illustrates the process definition and timelines.

[0111] Roller Bottle and Media Preparation:

[0112] The experiment presented here was a batch of 5 roller bottles. Actual batch size may vary.

[0113] Under aseptic conditions, 2000mL of MEM media and 100mL of Irradiated Fetal Bovine Serum were added to a container. Then 5×10^7 AK-MA104 cells and EU PRRS virus seed at a MOI of 0.1 were added. These materials were mixed and under aseptic conditions, An approximately 400mL per 850cm² Corning roller bottle was dispensed. The roller bottles were then incubated at 37°C in a roller rack at a speed of 0.5 rpm. Up to three harvests were performed with two media re-feeds.

[0114] Criteria for Harvest and Acceptable Potency:

[0115] The criteria for harvest the roller bottles was based on the set point/target for the critical parameters from the validated 300L bioreactor process of Examples 1 and 2, as shown in Table 10 below.

[0116] Harvest-I was performed on days 5 -7 PI and dextrose level $\leq 0.1\text{g/L}$. Harvest II occurred on day 2PI after re-feed and Harvest III on day 2PI after second re-feed.

[0117] The potency of all three roller bottle harvests should be $\geq 10^{5.5}$ TCID₅₀/mL.

Table 10: Harvest Criteria/acceptable potency for EU PRRS 94881 MLV

Parameter	Acceptable Target
Time of 1 st Harvest (Days post infection)	Day 5-7 PI
Dextrose level at 1 st harvest	$\leq 0.1\text{g/L}$
Time of 2 nd Harvest (Days post re-feed)	2
Time of 3rd Harvest (Days post re-feed)	2
Potency	$\geq 10^{5.5}$ TCID ₅₀ /mL

[0118] *Critical parameters are those parameters that are critical to quality attributes of the final product

[0119] ROLLER BOTTLE RUNS**Table 11:** Initial experiment for the development of the EU PRRS 94881 concurrent roller bottle process and titer results

Roller bottle code	Cell planting density per RB	MOI	H- I + refeed	Dextr ose g/L	TCID ₅₀ per mL	H-II + refeed	TCID ₅₀ per mL	H-III final	TCID ₅₀ per mL
A	3.5 x 10 ⁶	0.1	5PI	0.304	≤5.5	7PI	6.5	9PI	≤6.0
B	3.5 x 10 ⁶	0.1	6PI	0.048	6.5	8PI	6.6	10PI	≤5.7
C	3.5 x 10 ⁶	0.1	7PI	0.006	≤5.5	9PI	≤6.3	11PI	6.7
D	3.5 x 10 ⁶	0.005	5PI	N/A	≤5.6	7PI	6.5	9PI	≤5.5
E	3.5 x 10 ⁶	0.005	6PI	0.057	≤5.5	8PI	≤5.5	10PI	7.4
F	3.5 x 10 ⁶	0.005	7PI	0.0	≤5.5	9PI	≤5.5	11PI	≤5.5
G	7 x 10 ⁶	0.1	5PI	0.066	6.6	7PI	6.9	9PI	≤6.3
H	7 x 10 ⁶	0.1	6PI	0.009	6.5	8PI	7.3	10PI	6.7
I	7 x 10 ⁶	0.1	7PI	0	≤6.2	9PI	7.0	11PI	6.6
J	1 x 10 ⁷	0.1	5PI	0.095	6.9	7PI	6.6	9PI/10PI	≤6.3/6.7
K	1 x 10 ⁷	0.1	6PI	0	7.3	8PI	7.5	10PI/11PI	6.5/6.6
L	1 x 10 ⁷	0.1	7PI	0	7.7	9PI	≤5.5	11PI/12PI	7.2/6.6
M	1 x 10 ⁷	0.005	5PI	0.118	≤5.6	7PI	7.5	9PI	≤6.0
N	1 x 10 ⁷	0.005	6PI	0.014	7.0	8PI	6.7	10PI	6.7
O	1 x 10 ⁷	0.005	7PI	0	6.7	9PI	7.3	11PI	6.7
Control experiment: Roller bottle conventional process for EU PRRS 94881									
Roller bottle code	Cell planting density	TOI	MOI	Harvest I + refeed	TCID ₅₀ per mL	Harvest II + refeed	TCID ₅₀ per mL	Harvest III final	TCID ₅₀ per mL
P	2 x 10 ⁷	3days	0.005	3PI	6.7	6PI	7.4	9PI	6.9
Q	2 x 10 ⁷	3days	0.005	4PI	6.7	7PI	7.7	10PI	6.7
R	2 x 10 ⁷	3days	0.005	5PI	7.0	8PI	7.2	11PI	6.6
S	2 x 10 ⁷	After 3days, cells were counted for MOI calculation for RBs P,Q and R							

[0120] Table 11 shows the initial experiment designed to define the concurrent roller bottle process based on the following parameters from the

process described in Examples 1 and 2 and working seed virus reports showed on Table 12a.

Table 12a: Parameters evaluated to define concurrent roller bottle process

parameters	range	information
Cell planting density per 850cm ² RB	3.5 x 10 ⁶	low cell planting range
	7.0 x 10 ⁶	Middle cell planting range
	1.0 x 10 ⁷	Equivalent to 300L BR based on cells/mL
MOI	0.005	RB conventional process
	0.1	[00100] Target MOI for 300L BR process

- 5 **[0121]** Fifteen roller bottles were planted with MA-104 cells at cell planting densities that ranged from 3.5 x 10⁶ to 1 x 10⁷ (see Table 11 column 2). The roller bottles were labeled in alphabetical order. Sets of three roller bottles had the same cell planting density and same MOI that ranged from 0.005 to 0.1 (Table 11, third column).
- 10 **[0122]** Three cell planting densities and two MOIs were evaluated (Table 12). Sets of three roller bottles had same cell planting density and same MOI (Table 4 column 1). Roller bottles were set up according to roller bottle and media preparation described above and incubated in a roller rack at a speed of 0.5RPM at 37°C walk in incubator.
- 15 **[0123]** Roller bottles A, D, G, J and M harvest I occurred on day 5PI, and then they were re-fed and incubated for two days. H-II was then performed, roller bottles were re-fed and incubated and a third and final harvest was performed two days later.

[0124] Roller bottles B, E, H, K and N H- I occurred on day 6PI, and then they were re-fed and incubated for two days. H-II was then performed; roller bottles were re-fed one more time and re-incubated. A third and final harvest was performed two days later.

- 5 **[0125]** Finally, roller bottles C, F, I, L and O H- I occurred on day 7PI, and then they were re-fed and incubated for two days. H-II was then performed, roller bottles were re-fed and re-incubated and a third and final harvest was performed two days later.

- [0126]** The roller bottle conventional process (roller bottles P, Q, R and S)
10 was utilized as a control for this experiment. This process was developed with two harvests. The third harvest was added to the process in these experiments as well as the harvest-I range up to 5 daysPI.

- [0127]** MA104 cells were planted on 850cm² roller bottles at 2×10^7 and incubated for 3 days (roller bottles P, Q, R and S). After three days, roller bottle S
15 was trypsinized and cells were counted by Vi-cell. Cell count was used for virus MOI calculation for RB's P, Q and R. Calculated amount of virus were added to roller bottles that are incubated, at 37°C in a roller rack. After 3 days harvest-I is performed on roller bottle P, which was then re-fed and incubated at 37C. After 3 days, a second harvest was obtained, and re-fed a second time, and incubated an
20 additional 3 days for a third and final harvest.

[0128] Roller Bottles Q and R followed the same procedure after H-I, on day 4PI for RB Q and 5PI for RB R.

- [0129]** The conventional roller bottle process is longer than the concurrent process described in Examples 1 and 2 and requires more labor, since cells need
25 to grow for 3 days, before they are infected with virus. Also, it requires double cell planting density when compared with the concurrent process but lower MOI. This process yielded high consistent titers for the three harvests.

[0130] It was decided that the H-I time of harvest (TOH) for the concurrent process be based on target days only, regardless of dextrose consumption. Samples were taken for dextrose measuring and titer at harvest days.

[0131] Based on the criteria for potency acceptable titer (Table 10), Roller Bottles A, B, C, D, E and F showed inconsistent titers for harvests I, II and III.

[0132] Roller bottles G, H and I with cell planting density of 7×10^6 and target MOI of 0.1 had dextrose level at first harvest within target of $\leq 0.1\text{g/L}$. Titer results for roller bottles G and H were acceptable. For harvest-II, all roller bottles G, H and I had titers in the high 6 and low 7 logs. For harvest-III, roller bottles G and H were acceptable with titers of 6.6 and 6.5, respectively. For most harvests set G, H and I were acceptable.

[0133] The next set experiment J, K and L was the most promising one in terms of titers. Dextrose was consumed at H-I for all RBs and titer within acceptable criteria based on Table 10. On second and third harvests the titers also met criteria on Table 3 except for two roller bottles. H-III for RBs J, K and L were extended for one more day showing that titers were still acceptable. (Table 11)

[0134] Last roller bottles M, N and O, had high cell planting density, and low MOI showed consistent titer results for roller bottles N and O.

Table 12b: Comparison of parameters between the concurrent roller bottle process and the bioreactor process

Parameter	300L bioreactor	Roller Bottle set J,K and L
Media plus serum working volume in mL	283500	400
Cell planting density/mL	2.53×10^4	2.5×10^4
MOI	0.1	0.1

[0135] Based on on Table 10, the roller bottles J, K and L TCID₅₀/mL results shown on Table 11, met all the criteria for harvests I, II and III. The ratio of cell planting density per mL in the roller bottles J, K and L are equivalent to the bioreactor cell planting density per mL (Table 6) for the 300L. Based on these data, the parameters for roller bottles J, K and L were the chosen for a confirmation run (Table 13).

Table 13: Concurrent roller bottle process development confirmation run set up and dextrose concentration at harvest-I

Roller bottle code	Cell planting density/ RB	MOI	Harvest I + refeed	dextrose g/L at TOH	H II + refeed	H III Final
J1	1 x 10 ⁷	0.1	5PI	0.080	7PI	9PI
J2	1 x 10 ⁷	0.1	5PI	0.128	7PI	9PI
J3	1 x 10 ⁷	0.1	5PI	0.066	7PI	9PI
J4	1 x 10 ⁷	0.1	5PI	0.076	7PI	9PI
J5	1 x 10 ⁷	0.1	5PI	0.128	7PI	9PI
K1	1 x 10 ⁷	0.1	6PI	0.137	8PI	10PI
K2	1 x 10 ⁷	0.1	6PI	0.058	8PI	10PI
K3	1 x 10 ⁷	0.1	6PI	0.100	8PI	10PI
K4	1 x 10 ⁷	0.1	6PI	0.088	8PI	10PI
K5	1 x 10 ⁷	0.1	6PI	0.087	8PI	10PI
L1	1 x 10 ⁷	0.1	7PI	0.005	9PI	11PI
L2	1 x 10 ⁷	0.1	7PI	0.006	9PI	11PI
L3	1 x 10 ⁷	0.1	7PI	0.0	9PI	11PI
L4	1 x 10 ⁷	0.1	7PI	0.013	9PI	11PI
L5	1 x 10 ⁷	0.1	7PI	0.004	9PI	11PI

10

[0136] Table 13 shows the confirmation run for the chosen concurrent process evaluated on Table 10.

[0137] A total of 15 roller bottles were set up at cell planting density of 1 x 10⁷ each in 400mL of media with serum and EU PRRS 94881 MSV+4 seed at MOI of 0.1. Roller bottles were divided and 3 groups of 5. Harvest-I was performed on day 5PI for J1 to J5 RBs, on day 6PI for K1 to K5 and day 7PI for L1 to L5.

Dextrose was measured for each roller bottle. Then harvests were pooled and samples were taken for titer. Subsequent re-feeds and harvests II and III final were performed.

[0138] At harvest-I, on average, all fifteen roller bottles had dextrose within harvest criteria of $\leq 0.1\text{g/L}$ set for the bioreactor process (Table 3), which confirmed that the process is consistent in roller bottles.

Table 14: Summary of the conditions and TCID₅₀ results of concurrent roller bottle process

Lot (pool of 5 roller bottles)	PCD	MOI	TOH 1	Dextrose g/L at TOH1	TCID ₅₀ / mL H1	TOH2	TCID ₅₀ / mL H2	TOH3	TCID ₅₀ /mL H3
J	1.0×10^7	0.1	5PI	0.092	6.5	7PI	7.3	9PI	6.5
K	1.0×10^7	0.1	6PI	0.084	6.7	8PI	7.6	10PI	6.7
L	1.0×10^7	0.1	7PI	0.000	6.5	9PI	7.7	11PI	7.4

10

[0139] Table 14 shows a summary of the conditions and the virus titers in TCID₅₀ /mL for the pool of roller bottles J, K and L for H-I, H-II and H-III for the concurrent roller bottle process of the present invention.

[0140] To mimic the roller bottle process, samples from each individual roller bottle for set J (Table 13) were pooled and the pooled sample for titer. Same procedure was applied to roller bottles K and L for H-I, H-II and H-III.

[0141] Dextrose for H-1 pool samples were 0.0g/L for J, K and L. Titers for H-I, H-II and H-III range from 6.5 to 7.7 which is comparable to the 300L bioreactor process. (Table 15)

20

Table 15: Summary of the conditions and TCID₅₀/mL results of concurrent 300L BR validated process*

Lot	PCD	MOI	TOH1	Dextrose g/L at TOH1	TCID ₅₀ /mL H1	TOH2	TCID ₅₀ /mL H2	TOH3	TCID ₅₀ /mL H3
02161 0PD	7.2 x 10 ⁹	0.1	5PI	0.0	7.5	7PI	7.5	9PI	6.7
03011 0PD	7.2 x 10 ⁹	0.1	6PI	0.0	7.3	8PI	7.4	10PI	7.4
03151 0PD	7.2 x 10 ⁹	0.1	7PI	0.0	7.5	9PI	6.7	11PI	7.4

*samples contain SGS as stabilizer

[0142] Table 15 shows the parameters and titers in TCID₅₀/mL for the three Validation runs performed under cGMP conditions. All three lots had the same planting cell density, same MOI. Dextrose was 0.0g/L on harvest I for all three lots. All harvests had results within acceptance criteria.

[0143] Range of Planting Cell Density (PCD) for roller bottle:

[0144] The target planting cell density (PCD) is 1.0×10^7 total cells per roller bottle with a working volume of 400mL. For the low range 7×10^6 was evaluated (Table 4) with acceptable titers as well. The high range was evaluated on the conventional process (Table 11).

[0145] Range of the Multiplicity of Infection (MOI) for roller bottle:

[0146] The target MOI of 0.1 is ideal for propagation of EU PRRS 94881 within this growth system. Low and high MOI level of 0.01 and 0.3, respectively, were examined in the 30L bioreactors. In the roller bottle due to time constraints only target 0.1 MOI and 0.005 MOI were evaluated (Table 10).

[0147] Analysis

[0148] The recommended roller bottle concurrent process parameters are outlined in Table 16. Only target parameters were tested and considered for whether they were critical or non-critical to the process. The definitions are as follows: Critical parameters are those parameters that are critical to quality attributes of the final product and non critical parameters are those parameters

that can either be controlled directly within the defined range or have a wide operational range so a deviation from the set-point is non-critical. Non-critical parameters aid in controlling the critical parameters within the defined range

- 5 **Table 16:** Summary of Concurrent roller bottle Process parameters for EU PRRS 94881 MLV.

Parameter	Lower Limit Tested	Upper Limit Tested	Acceptable Range	Target	Critical/N on-Critical
MOI	0.005	0.1@	0.005 -0.3&	0.10	NC
Cell Planting Density per Roller Bottle	7 X 10 ⁶ cells	2.0 X 10 ⁷ cells #	7.0 X 10 ⁶ cells to 2.0 X 10 ⁷ cells	1.0 X 10 ⁷ cells	NC
Time of 1st Harvest (Days post infection)	Day 5	Day 7	Day 5 - Day 7 PI	Day 5-7 PI	Critical **
Temperature	NT	37°C	36 + 1°C	36°C	NC
Time of 2nd Harvest (Days post re-feed)	Day 2	Day 2	NT	2	Critical
Time of 3rd Harvest (Days post re-feed)	Day 2	Day 2	2-3	2	Critical

** First-Harvest criterion is decided by the time of the complete consumption of dextrose within the period of 5-7 days PI.

based on conventional roller bottle process

- 10 @ tested at 30L, 300L bioreactor scale and roller bottle
& tested at 30L bioreactor scale

[0149] Conclusions

- [0150] The concurrent roller bottle process development was successfully achieved and it is equivalent to the bioreactor process described above in terms of
15 potency measured as TCID₅₀/mL. Critical parameters for H-I, H-II and H-III at target were successfully reproduced in the concurrent roller process.

[0151] The preferred embodiments for the roller bottle concurrent process for EU PRRS 94881 MLV are as follows for virus propagation, HARVEST-I: Media composition MEM with 1.4 g/L Sodium bicarbonate; Plant cells at 1 x10⁷ / 850cm²

Corning Roller bottle with 400mL of media supplemented with 20mL of Fetal Bovine Serum 5% v/v (range: 7×10^6 - 2×10^7 /roller bottle); Temperature controlled at $36 \pm 1^\circ\text{C}$; Roller bottle rack speed is 0.5 RPM; and Target MOI is 0.1.

5 **[0152]** For harvest-I criterion, start sampling for offline dextrose measurements on day 5 PI. Harvest-I should be performed when dextrose is $\leq 0.1\text{g/}$ which usually occurs between 5-7 days PI. However, if a second harvest is to be performed, first re-feed HARVEST II.

[0153] II. First Re-Feed – HARVEST-II

10 **[0154]** Re-Feed with 400mL of media composition MEM, and 1.4 g/L Sodium bicarbonate supplemented with 20mL of Fetal Bovine Serum (5% v/v). Perform Re-Feed under same conditions as the first harvest media set-up (see first harvest parameters above). Temperature control is to remain on at a set point of $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Roller bottle rack speed is 0.5 RPM. Second Harvest of viral fluids occurs on day 2 post re-feed.

15 **[0155] III. Second Re-Feed – HARVEST-III**

20 **[0156]** Re-Feed with 400mL of media composition MEM, Neomycin and 1.4 g/L Sodium bicarbonate supplemented with 20 mL of Irradiated Fetal Bovine Serum (5% v/v). Perform Re-Feed under the same conditions as the first harvest media set-up (see second harvest parameters above). Temperature control is to remain on at a set point of $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Roller bottle rack speed is 0.5 RPM. Third Harvest of viral fluids occurs on day 2 post re-feed.

CLAIMS

1. A method for the commercial scale production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) comprising:
- a) concurrently seeding a large scale culture media with a mammalian cell line that is permissive to PRRSV infection into a bioreactor and infecting said mammalian cells with a PRRSV.
 - b) propagating virus for 5 to 7 days post infection;
 - c) performing a first harvesting step by removing the media from said bioreactor and isolating propagated virus therefrom;
 - d) replenishing the media in said bioreactor and propagating virus for 1 to 4 days;
 - e) performing a second harvesting step by removing the media from said bioreactor and isolating propagated virus therefrom;
 - f) replenishing the media in said bioreactor and propagating virus for 1 to 4 days and
 - g) performing a third harvesting step by removing the media from said bioreactor and isolating propagated virus therefrom.
2. The method of claim 1, further comprising at least one re-feeding and harvest steps subsequent to the third harvesting step comprising replenishing the media in said bioreactor and propagating virus for 1 to 4 days and performing a fourth harvesting step by removing the media from said bioreactor and isolating propagated virus therefrom
3. The method of claim 1, wherein the target multiplicity of infection (MOI) is 0.01 to 0.30 and the cell planting density.
4. The method of claim 1, wherein said mammalian cells are planted at a density of about 7×10^8 to 1.0×10^9 per 300L bioreactor.

5. The method of claim 4, wherein said cell planting density is about 1.0×10^9 per 300L bioreactor.

6. The method of claim 5, wherein said MOI is about 7×10^8 virus particles.

5 7. The method of claim 1, comprising monitoring the dextrose concentration of said media wherein said first harvest step is performed on the first day when the dextrose concentration of the media decreases to less than 0.1 g/L.

8. The method of claim 1, wherein said second harvest is performed 1 or 2 days post-refeeding with media.

10 9. The method of claim 1, wherein said third harvest is performed 1 to 4 days post the second refeeding with media.

10. The method of claim 1, wherein the culture media is added to the bioreactor on the day prior to or on the same day prior to addition of said mammalian cell line and said PRRS.

15 11. The method of claim 1, wherein the culture media is added to the bioreactor one day prior to the addition of said mammalian cell line and said PRRS.

12. The method of claim 1, wherein the temperature of said bioreactor is set at between 34°C and 38°C.

20 13. The method of claim 1, wherein said media comprises 5% v/v irradiated fetal calf serum.

14. The method of claim 1, wherein said PRRSV is selected from the group consisting of PRRSV strain 94881, VR 2332, Lelystad virus strain (Lelystad Agent (CDI-NL-2.91), or other strains such as those deposited under the
25 Accession Numbers ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, CNCM Accession No. I-1140, CNCM Accession No I-1387, CNCM Accession No I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474, and VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, or ECACC

V93070108; ATCC deposit VR-2332, ATCC deposit VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474, and ATCC VR 2402.

15 15. A commercial-scale production method for the preparation of a PRRSV comprising:

a. a concurrent seeding of both mammalian cells permissive to infection by said PRRSV and said PRRSV into a bioreactor containing a media suitable for the growth of said cells; and

10 b. performing three consecutive harvesting steps wherein PRRSV is harvested wherein after each of the first and second harvests, the media is replenished, and wherein:

i. the first harvest is performed on the first day that the dextrose concentration of the media decreases to less than 0.1 g/L;

15 ii. the second harvest is performed 1 or 2 days after addition of the media following the first harvest; and

iii. the third harvest is performed between 1 and 4 days after addition of the media following the second harvest.

20 16. A PRRSV MLV comprising a PRRSV produced according to the method of any of claims 1-16 formulated with an acceptable adjuvant or carrier for delivery to a pig.

17, A method for the commercial scale production of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) comprising:

25 a) concurrently seeding a large scale culture media with a mammalian cell line that is permissive to PRRSV infection into a roller bottles and infecting said mammalian cells with a PRRSV.

b) propagating virus for 5 to 7 days post infection;

c) performing a first harvesting step by removing the media from said roller bottle and isolating propagated virus therefrom;

d) replenishing the media in said roller bottle and propagating virus for about 2 days;

e) performing a second harvesting step by removing the media from said roller bottle and isolating propagated virus therefrom;

5 f) replenishing the media in said roller bottle and propagating virus for about 2 days and

g) performing a third harvesting step by removing the media from said bioreactor and isolating propagated virus therefrom.

10

1/8

FIG 1

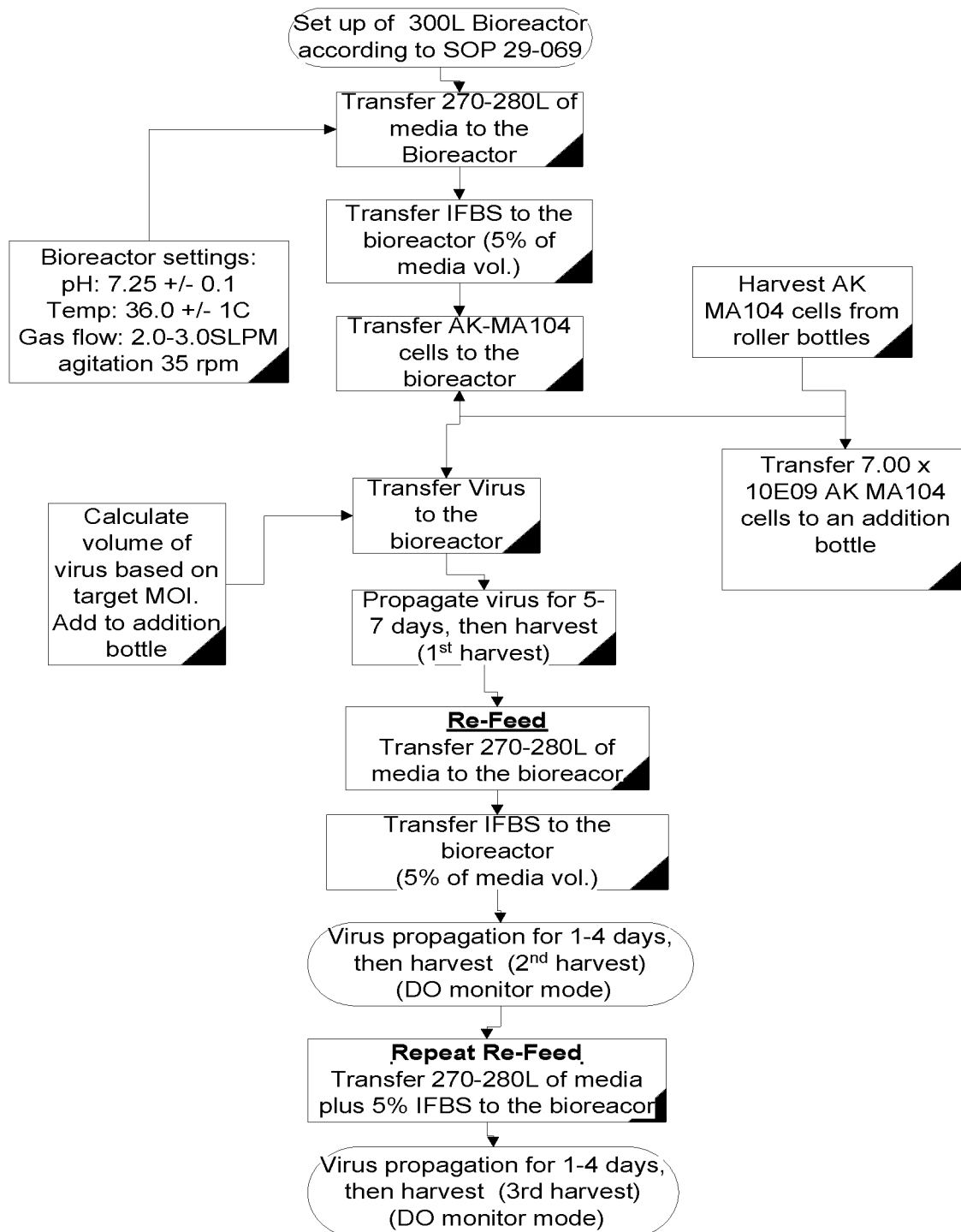


FIG 2

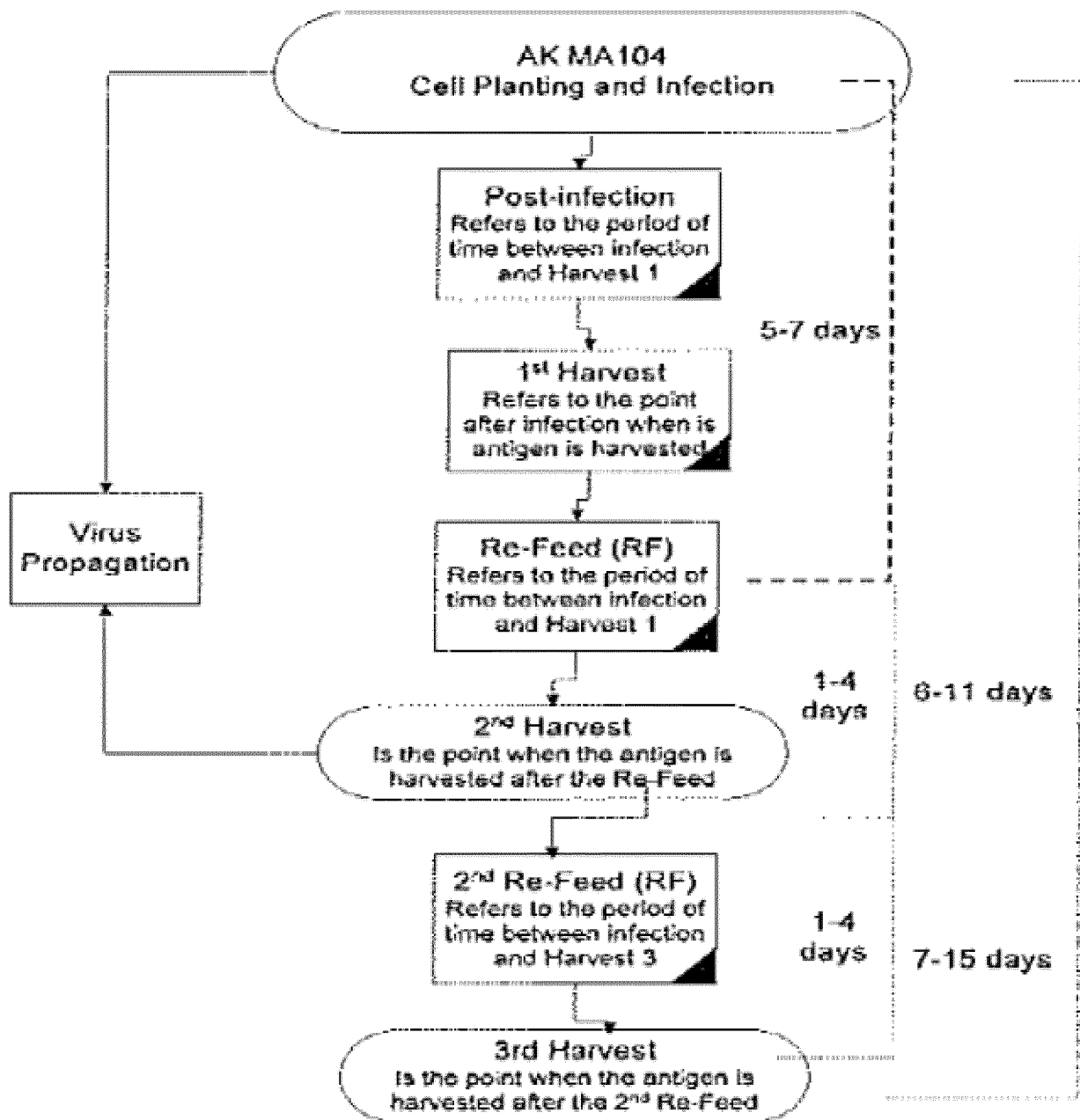


FIG 3

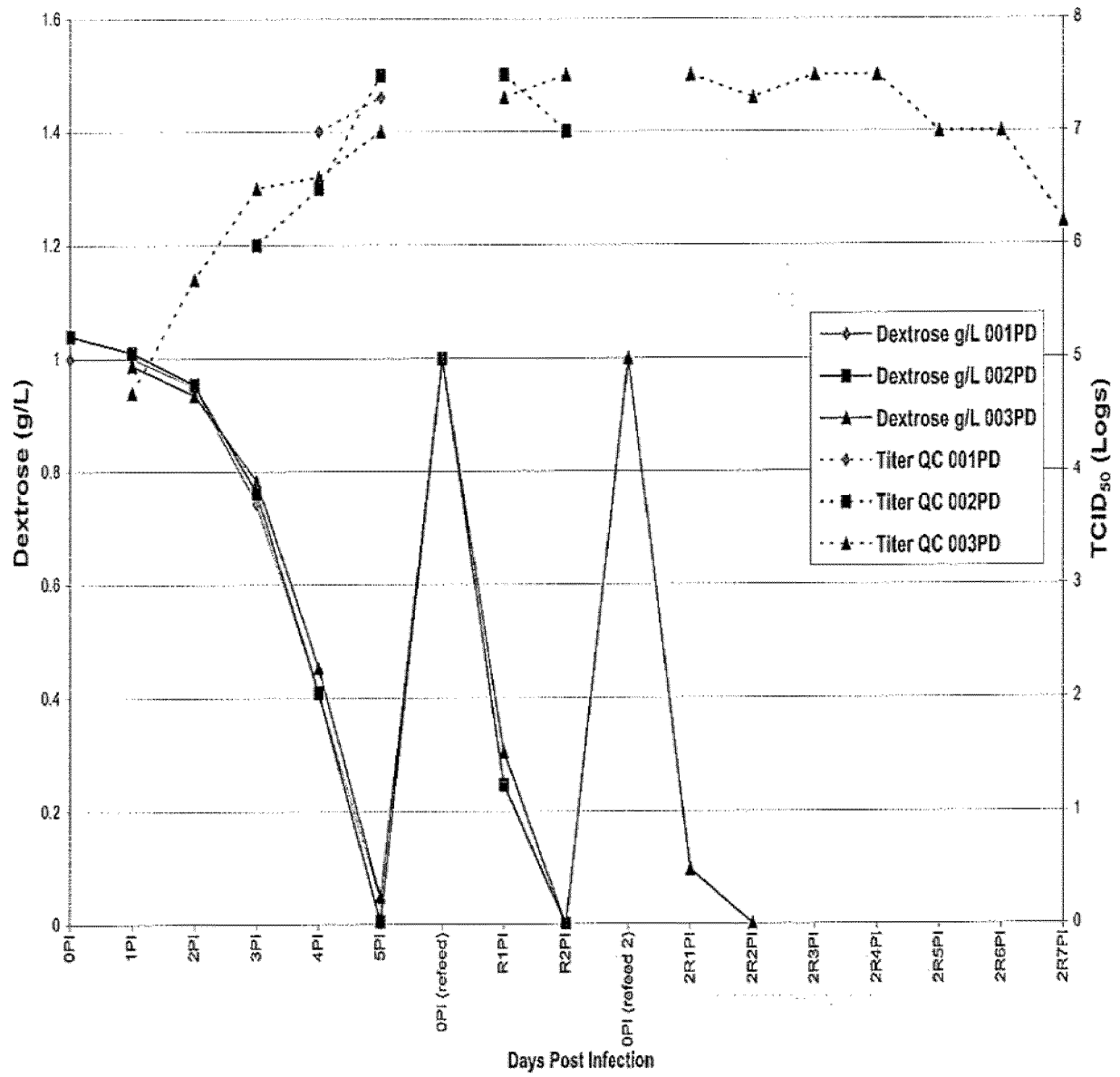


FIG 4

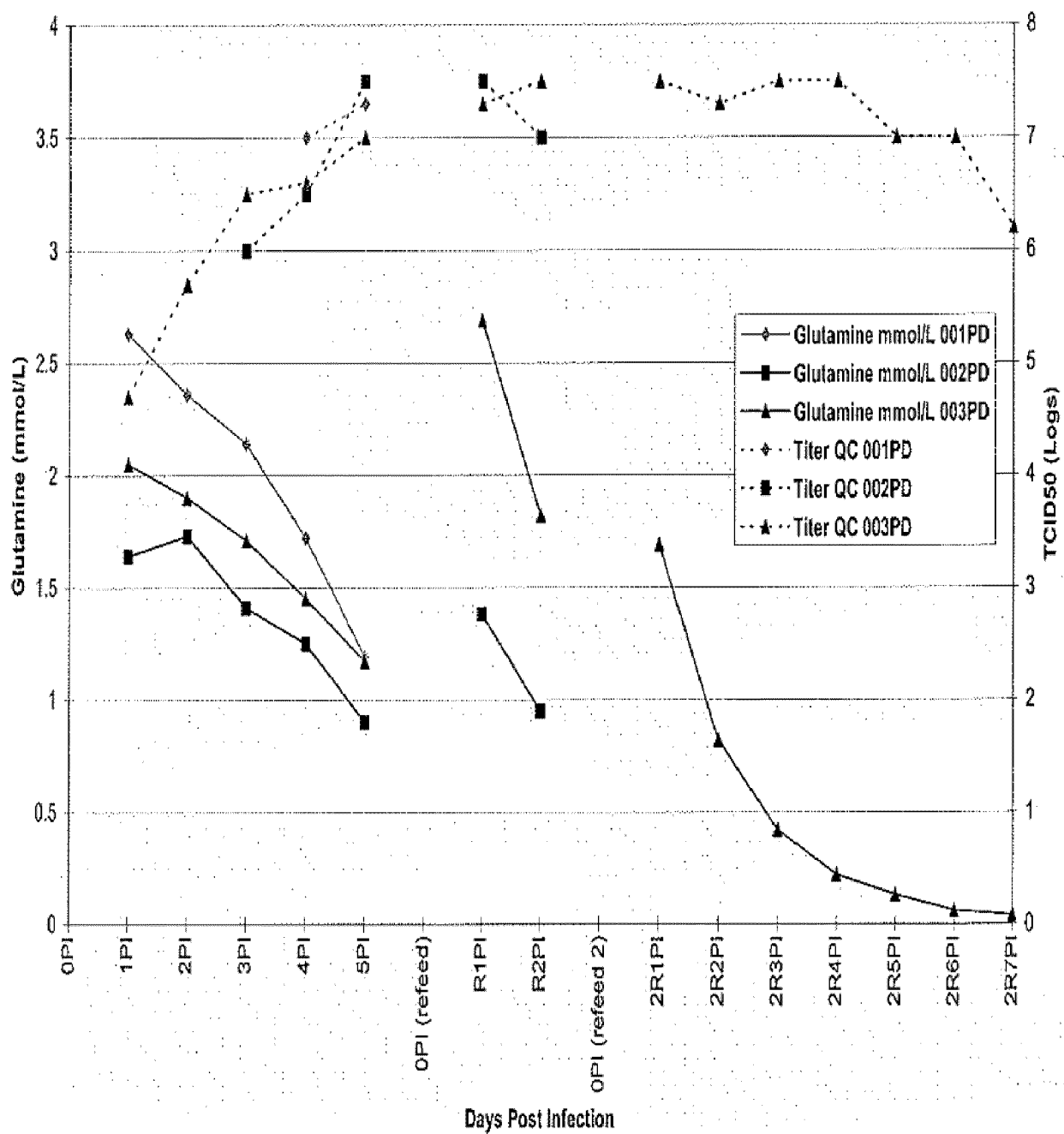


FIG 5

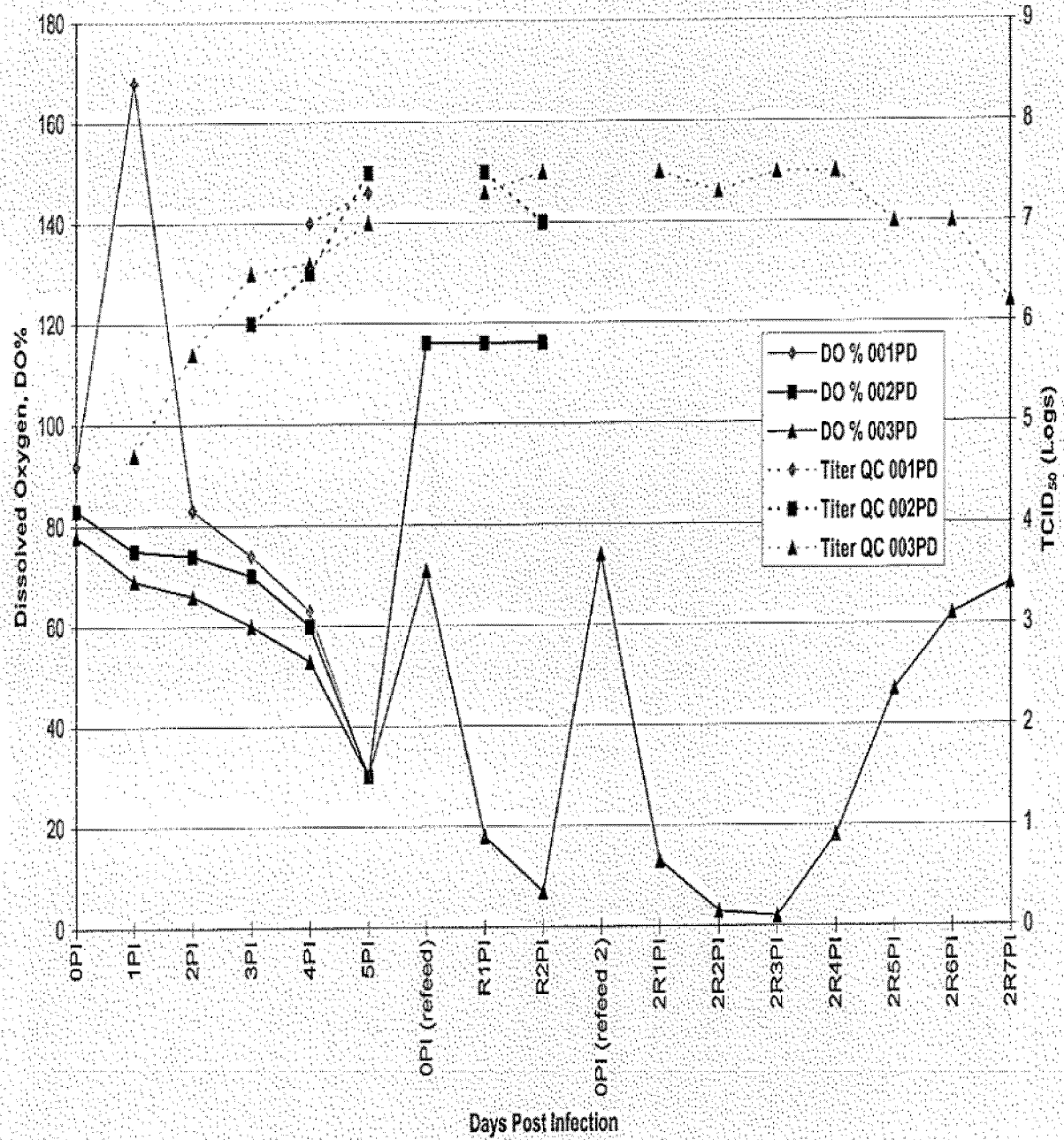


FIG 6

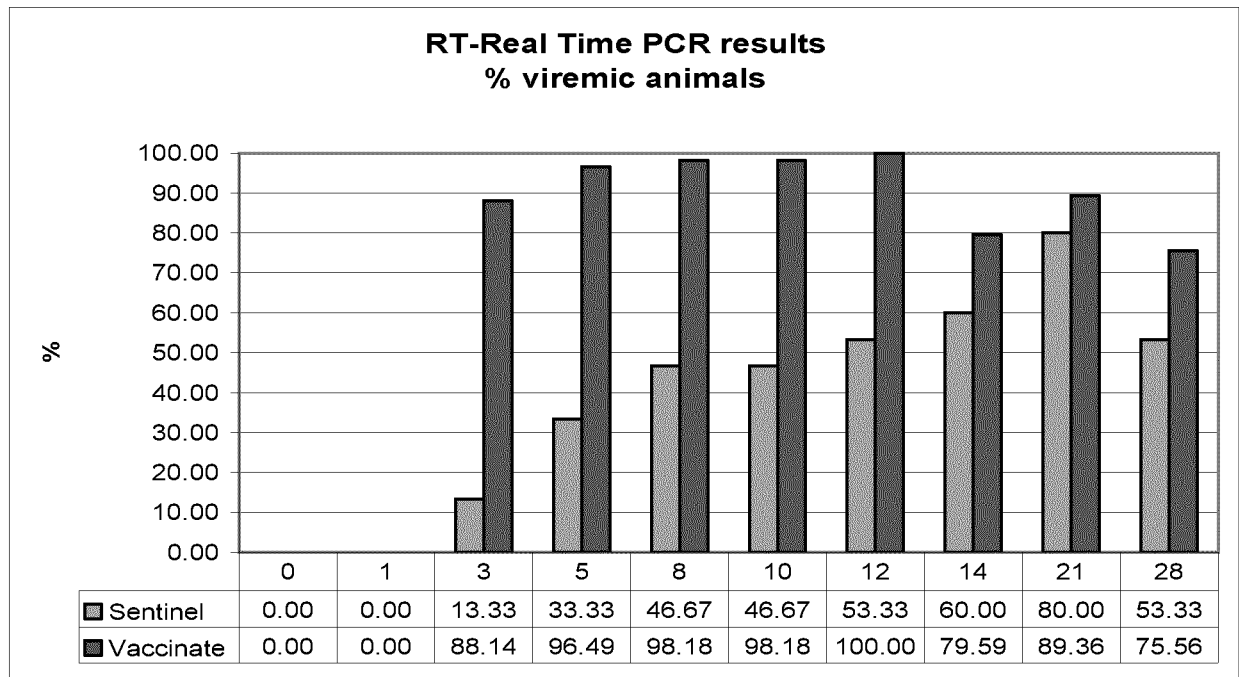


FIG 7

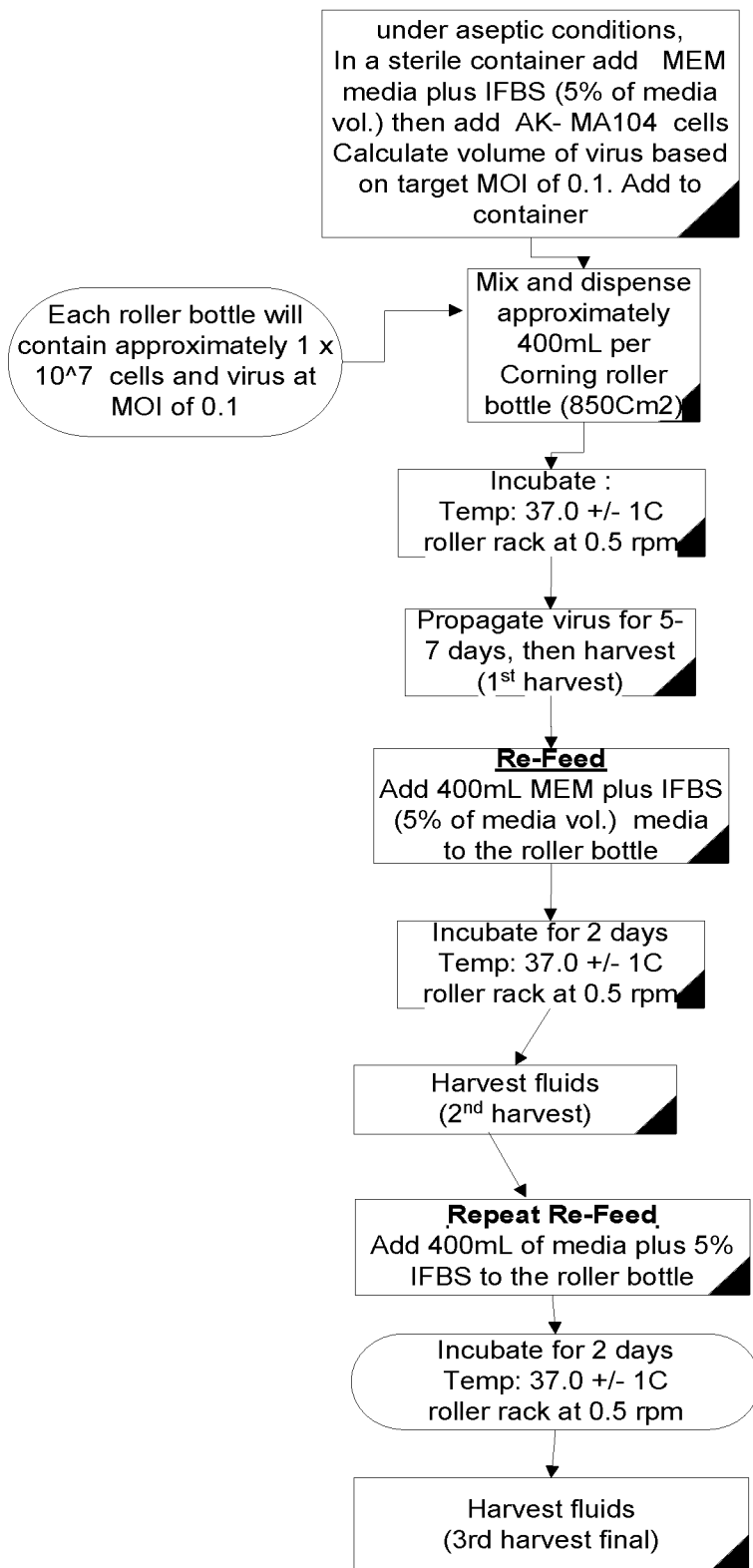
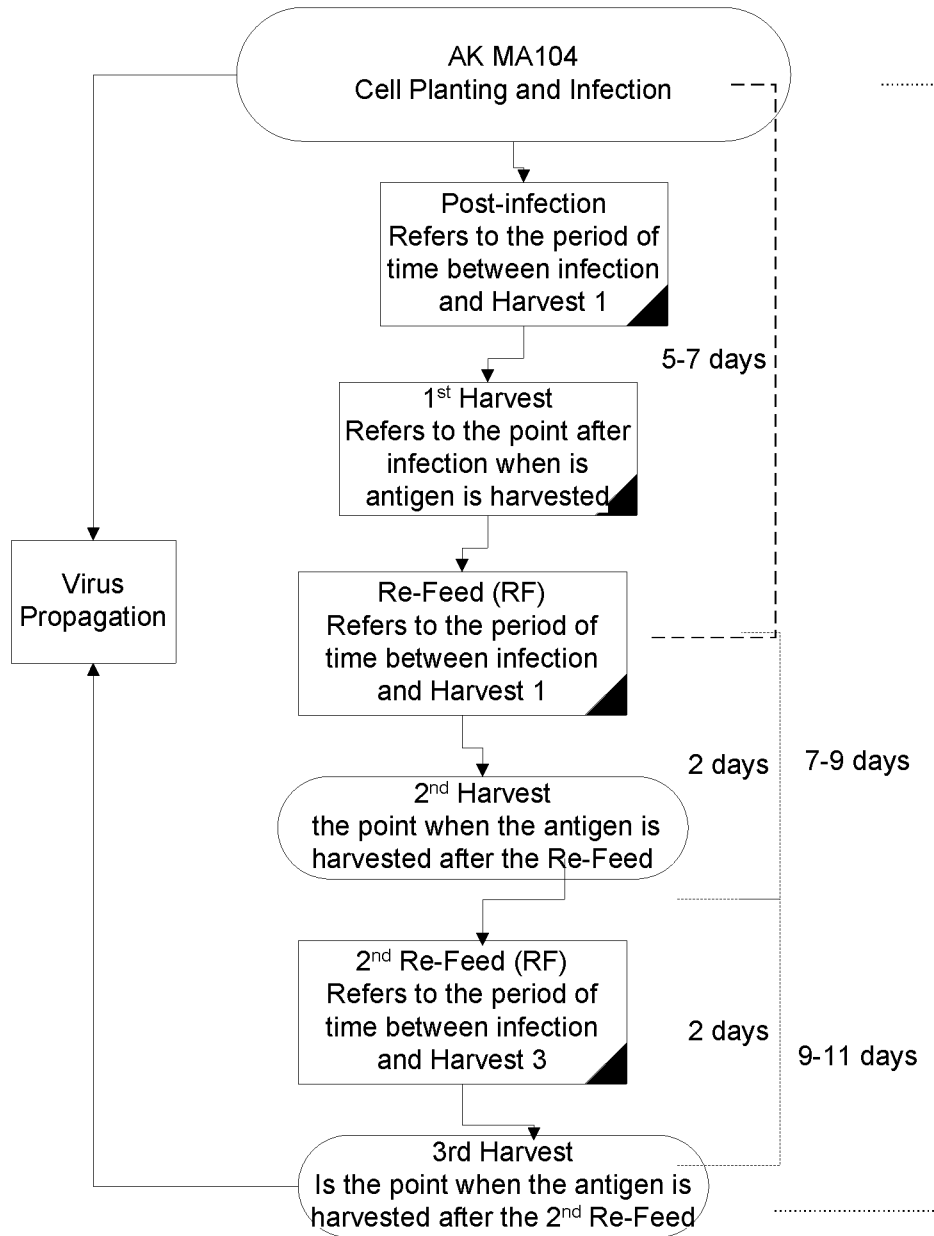


FIG 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/052476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/12 C12N7/00
ADD.

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)
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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 989 563 A (CHLADEK DANNY W [US] ET AL) 23 November 1999 (1999-11-23)	16
A	examples 1,8	1-15,17
A	----- WO 2008/109237 A2 (UNIV WASHINGTON [US]; SRIKUMARAN SUBRAMANIAM [US]; LIU WEIGUO [US]; SH) 12 September 2008 (2008-09-12)	1-17
A	example 5 ----- WO 98/35023 A1 (ORIGEN INC [US]) 13 August 1998 (1998-08-13)	1-17
	page 9, line 11 ff. ----- -/-	



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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 April 2012

Date of mailing of the international search report

07/05/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Brero, Alessandro

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/052476

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATANIN ET AL: "Purification of the major envelop protein GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from native virions", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 147, no. 1, 25 October 2007 (2007-10-25), pages 127-135, XP022390479, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2007.08.018 paragraph [02.2] -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/052476

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5989563	A	23-11-1999	NONE

WO 2008109237	A2	12-09-2008	US 2010146653 A1 10-06-2010
			WO 2008109237 A2 12-09-2008

WO 9835023	A1	13-08-1998	NONE



(43) Fecha de publicación internacional
23 Agosto 2012 (23.08.2012)

(10) Número de publicación internacional
WO 2012/110490 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/12 (2006.01) **C12N 7/00** (2006.01)

(21) Número de solicitud internacional:
PCT/EP2012/052476

(22) Fecha de presentación internacional:
14 Febrero 2012 (14.02.2012)

(25) Idioma de la presentación:
Inglés

(26) Idioma de la publicación:
Inglés

(30) Datos de prioridad:
61/444.071 17 Febrero 2011 (17.02.2011) US

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto EE.UU.): **BOHERINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH** [DE/DE]; Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (solamente para EE.UU.): **BERRY, Elizabeth Jane** [US/US]; Boheringer Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **HADDADIN, Fuad Tawfiq** [JO/US]; Boheringer Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **KHAZRAEINAZMPOUR, Ali** [US/US]; Boheringer Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **KROLL, Jeremy** [US/US]; Boheringer Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **MALBURG, Sonia Regina Cantisano** [BR/US]; Boheringer Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **SANDOVAL BASURTO, Edgar Arnulfo** [MX/US]; Boheringer Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US). **SCHEERER, Stephen** [US/US]; Boheringer Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506 (US).

(74) Agente: **HAMMANN ET AL., Heinz et al.**; Boheringer Ingelheim GmbH, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Declaración en virtud de la regla 4.17:

--- con relación al derecho del solicitante a solicitar y que se le conceda una patente (Regla 4.17(ii))

Publicada:

--- Con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN A ESCALA COMERCIAL DE PRRSV.

(57) Resumen: La presente invención describe un método de producción a escala comercial eficaz para la preparación de virus del PRRS.

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN A ESCALA COMERCIAL DE PRRSV

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a la producción a escala comercial del virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino (PRRSV - siglas en inglés) vivo
5 atenuado, el cual se puede utilizar en la producción de vacunas basadas en el mismo, y al uso del mismo en el tratamiento de cerdos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS - siglas en inglés) es considerado por muchos como la enfermedad más importante que afecta actualmente a la
10 industria porcina en todo el mundo. El síndrome fue descubierto primero en 1987 en los Estados Unidos como la "enfermedad misteriosa del cerdo" y se propagó rápidamente por todo el globo. Esta enfermedad provoca pérdidas graves en la reproducción, está asociada con una mortalidad incrementada debido a infecciones secundarias y está ligada a una conversión reducida en la alimentación y a una ganancia en peso media diaria.
15 Desgraciadamente, se ha manifestado difícil el control del virus que provoca el PRRS.

[0003] El virus del PRRS (PRRSV) es un virus de ARN de una sola cadena con envoltura, clasificado en la familia Arteriviridae (Cavanaugh, 1997). Causa una enfermedad del cerdo muy extendida que se describió por primera vez como la "enfermedad misteriosa del cerdo" en EE.UU. en 1987 (Hill, 1990). La enfermedad se
20 manifiesta como una enfermedad respiratoria en todos los grupos de edad del cerdo, que conduce a la muerte en algunos cerdos más jóvenes y a problemas reproductivos graves en hembras en edad de reproducción.

[0004] La transmisión del PRRSV puede, y a menudo ocurre a través del contacto directo entre cerdos infectados y susceptibles. También puede producirse una transmisión a
25 distancias muy cortas por el aire o a través del semen. Una vez infestado, el virus puede permanecer en la sangre de adultos durante aproximadamente dos a cuatro semanas, y en cerdos infestados durante uno o dos meses o más. Verracos infestados pueden esparcir el virus en el semen durante más de 100 días. Este largo periodo de viremia aumenta significativamente la posibilidad de transmisión. Además, el virus del PRRS puede

atravesar la placenta durante el último tercio del periodo de gestación para infestar a cochinitos en el útero y provoca partos muertos o cochinitos nacidos débiles.

[0005] Todos los tipos y tamaños de rebaños, incluidos aquellos con un estado de salud alto u ordinario o de unidades bajo techado o al aire libre pueden ser infestados con virus del PRRS. Los rebaños infestados pueden experimentar pérdidas de reproductividad graves, así como niveles incrementados de neumonía post-destete con un desarrollo deficiente. La fase reproductora dura típicamente de dos a tres meses; sin embargo, a menudo los problemas post-destete se vuelven endémicos. La enfermedad reproductora se caracteriza por un brote de aborto que afecta tanto a las cerdas como a las lechonas en el último tramo de gestación. Se producen lechigadas prematuras en torno a los 109 y 112 días de gestación. Aumenta el número de partos muertos y de cochinitos nacidos débiles, y resulta en un considerable incremento en la mortalidad pre-destete.

[0006] Tradicionalmente, la fase respiratoria ha sido observada en los neonatales, especialmente en neonatales de flujo continuo. Sin embargo, los problemas respiratorios provocados por el virus del PRRS también pueden observarse en el engorde final como parte de la enfermedad complejo respiratorio porcino (PRDC - siglas en inglés). Pueden producirse una reducción en la tasa de desarrollo, un aumento en el porcentaje de cerdos no comerciables y una elevada mortalidad post-destete. Hallazgos diagnósticos indican elevados niveles de neumonía que se asocian con el virus del PRRS, junto con una amplia diversidad de otros microbios que se observan comúnmente como agentes infecciosos secundarios. Aislados bacterianos pueden incluir *Streptococcus suis*, *Haemophilus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida*, entre otros. Agentes víricos comúnmente implicados incluyen el virus de la influenza porcina y el coronavirus respiratorio porcino. Los cerdos afectados rara vez responden a altos niveles de medicación y han fracasado sistemas de ingreso/salida en el control de la enfermedad.

[0007] El virus existe en forma de dos genotipos denominados tipo „US" y tipo „EU" que comparten aproximadamente el 50% de homología de secuencia (Dea S y col. (2000). Arch Virol 145:659-88). Estos dos genotipos también se pueden distinguir por sus propiedades inmunológicas. La mayor parte de la información de la secuenciación de

diversos materiales aislados se basa en las proteínas estructurales, es decir, la proteína de la envoltura GP5 que justifica sólo el 4% del genoma vírico, mientras que se conoce sólo poco de las proteínas no estructurales (nsp, del inglés " non-structural proteins"). El aislamiento de PRRSV y la preparación de vacunas se han descrito en diversas publicaciones (documentos WO 92/21375 , WO 93/06211, WO 93/03760, WO 93/07898, 5 WO 96/36356, EP 0 676 467, EP 0 732 340, EP 0 835 930).

[0008] La vacunación es el método clave para aliviar la carga del PRRS, dado que cerdos que se recuperan de una infección por el PRRS desarrollarán una respuesta inmune, la cual, bajo circunstancias normales, les protegerá de ser infestados de nuevo por la misma cepa de virus. Sin embargo, el virus del PRRS tiene la capacidad de cambiar debido a la 10 alta tasa de mutación que a menudo se produce en virus de ARN positivos, de cadena sencilla; y, por lo tanto, pueden surgir nuevas cepas de virus. En tales casos, puede no existir una producción cruzada entre cepas, y pueden observarse nuevos brotes en granjas que habían sido infestadas previamente. Así, existe una necesidad continua de vacunas 15 adicionales.

[0009] El método más frecuentemente utilizado para producir vacuna contra el virus vivo atenuada consiste en hacer pasar el virus en serie en un sustrato (habitualmente un cultivo celular con una línea de células que es permisiva al virus) que no sea el hospedante natural (S) hasta que esté lo suficientemente atenuada (es decir, reducida en la 20 virulencia o capacidad productora de enfermedades) a ser utilizado como una vacuna. Para el primer paso, el cultivo celular se infesta con el inóculo seleccionado. Después de obtener clara evidencia de la replicación del virus (p. ej. efectos citopáticos [CPE - siglas en inglés] inducidos por el virus en las células infestadas), se utiliza una parte alícuota del medio de cultivo celular, o de las células infestadas, o ambos, del primer paso para infestar a un 25 segundo cultivo celular. El proceso se repite hasta que una o más mutaciones críticas en el genoma viral provoque una atenuación suficiente, de modo que el virus se pueda utilizar de forma segura como una vacuna. El grado de atenuación se determina, habitualmente, de forma empírica exponiendo al hospedante natural (S) a niveles de paso del virus progresivamente mayores.

[0010] El proceso anterior es fundamentalmente sólido y ha sido utilizado con éxito para el desarrollo de numerosas vacunas para uso humano y veterinario. Sin embargo, cuando se trata de una producción a escala industrial, sigue existiendo la necesidad de proporcionar un método para la producción de PPRSV eficaz y económico.

5

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

[0011] La presente invención se refiere a un nuevo método para la producción de virus del PRRS vivo para uso en la fabricación de vacunas de este tipo. Los métodos descritos en esta memoria se pueden utilizar en la producción a gran escala de cualquier virus del PRRS, que incluyen, pero no se limitan a la cepa 94881 de PPRSV, PPRSV
10 94881, depositada ante la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) bajo los Números de Acceso ECACC 11012501 y ECACC 11012502, cada una depositada el 25 de enero de 2011 de acuerdo con las provisiones del Tratado de Budapest, o cualquier descendencia o progenie de una de las cepas antes mencionadas.

[0012] Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para la
15 producción a escala comercial de virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PPRSV), que comprende:

[0013] a) al mismo tiempo, sembrar un medio de cultivo a gran escala con una línea de células de mamífero que es permisiva a una infección por el PPRSV en un biorreactor e infestar las células de mamífero con un PPRSV.

20 **[0014]** b) propagar el virus durante 5 a 7 días post-infección;

[0015] c) llevar a cabo una primera etapa de recolección separando el medio del biorreactor y aislar del mismo el virus propagado;

[0016] d) reponer el medio en el biorreactor y propagar el virus durante 1 a 4 días;

25 **[0017]** c) llevar a cabo una segunda etapa de recolección separando el medio del biorreactor y aislar del mismo el virus propagado;

[0018] f) reponer el medio en el biorreactor y propagar el virus durante 1 a 4 días; y

[0019] c) llevar a cabo una tercera etapa de recolección separando el medio del biorreactor y aislar del mismo el virus propagado.

[0020] En determinadas realizaciones, el método puede comprender, además, al menos una etapa de re-alimentación y de recolección subsiguientes a la tercera etapa de recolección, que comprende reponer el medio en el biorreactor y propagar el virus durante 1 a 4 días, y realizar una cuarta etapa de recolección separando el medio del biorreactor y aislando del mismo el virus propagado.

[0021] Preferiblemente, en el método de producción la multiplicidad de infección (MOI - siglas en inglés) diana es 0,01 a 0,30 y las células de mamífero son sembradas a una densidad de aproximadamente 7×10^8 a $1,0 \times 10^9$ por cada biorreactor de 300 L. Más particularmente, la densidad de siembra de las células es de aproximadamente $1,0 \times 10^9$ por cada biorreactor de 300 L. En realizaciones específicas, la MOI es de aproximadamente 7×10^8 partículas de virus.

[0022] El método puede comprender vigilar la concentración de dextrosa del medio, en el que la primera etapa de recolección se realiza el primer día cuando la concentración de dextrosa del medio disminuye a menos de 0,1 g/L.

[0023] En el método de producción comercial, la segunda recolección se realiza preferiblemente 1 ó 2 días post-re-alimentación con medio, y la tercera recolección se realiza 1 a 4 días después de la segunda re-alimentación con el medio.

[0024] En realizaciones específicas, el medio de cultivo se añade al biorreactor el día antes de o el mismo día antes de la adición de la línea de células de mamífero y el PRRS. Preferiblemente, el medio de cultivo se añade al biorreactor un día antes de la adición de la línea de células de mamífero y el PRRS. La temperatura del biorreactor se establece entre 34°C y 38°C.

[0025] En realizaciones específicas, el medio comprende suero de ternero fetal al 5% v/v, irradiado.

[0026] El método se puede utilizar para la producción a escala comercial de cualquier PRRSV, que incluye, pero no se limita a PRRSV seleccionado del grupo que consiste en la cepa 94881 de PRRSV, PRRSV 94881, depositada ante la Colección

Europea de Cultivos Celulares (ECACC) bajo los Números de Acceso ECACC 11012501 y ECACC 11012502, cada una depositada el 25 de enero de 2011 de acuerdo con las provisiones del Tratado de Budapest, VR 2332, la cepa del virus Lelystad (Agente Lelystad (CDI-NL-2.91), u otras cepas tales como las depositadas bajo los Números de
5 Acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, CNCM N° de Acceso I-1140, CNCM N° de Acceso No I-1387, CNCM N° de Acceso I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388 o ECACC V93070108; depósito ATCC VR-2332, depósito ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429,
10 ATCC VR 2474 y ATCC VR 2402, o cualquier descendencia o progenie de una de las cepas antes mencionadas.

[0027] También se contempla un método de producción a escala comercial para la preparación de un PRRSV, que comprende:

a. una siembra simultánea tanto de células de mamífero permisivas a la
15 infestación por el PRRSV como del PRRSV en un biorreactor que contiene un medio adecuado para el crecimiento de las células; y

b. realizar tres etapas consecutivas de recolección, en donde se recolecta PRRSV, en donde, después de cada una de las primera y segunda recolecciones, se repone el medio, y en donde:

i. la primera recolección se realiza el primer día en el que la
20 concentración de dextrosa del medio desciende a menos de 0,1 g/L;

ii. la segunda recolección se realiza 1 ó 2 días después de la adición del medio tras la primera recolección; y

iii. la tercera recolección se realiza entre 1 y 4 días después de la
25 adición del medio tras la segunda recolección. Se contempla también un método alternativo que utiliza al mismo tiempo un proceso de frasco rodante que es equivalente al proceso del biorreactor arriba descrito. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para la producción a escala comercial de virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV), que comprende: a) al mismo

tiempo, sembrar un medio de cultivo a gran escala con una línea de células de mamífero que es permisiva a una infección por el PRRSV en frascos rodantes e infestar dichas células de mamífero con un PRRSV; b) propagar el virus durante 5 a 7 días post-infección; c) realizar una primera etapa de recolección separando el medio de dicho
 5 frasco rodante y aislar del mismo el virus propagado; d) reponer el medio en dicho frasco rodante y propagar el virus durante aproximadamente 2 días; e) llevar a cabo una segunda etapa de recolección separando el medio de dicho frasco rodante y aislar del mismo el virus propagado; f) reponer el medio en dicho frasco rodante y propagar el virus durante aproximadamente 2 días y g) realizar una tercera etapa de
 10 recolección separando del biorreactor el medio y aislando del mismo el virus propagado.

[0028] Otro aspecto de la invención se refiere a un PRRSV MLV, que comprende un PRRSV producido de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, formulados con un adyuvante o soporte aceptable para su administración a un cerdo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

15 **[0029]** Figura 1: Proceso simultáneo para la producción a gran escala de PRRSV 94881.

[0030] Figura 2: Definición y secuencias temporales del proceso simultáneo para los Biorreactores de 300 L

20 **[0031]** Figura 3: Títulos virales y perfiles de dextrosa para las tres operaciones simultáneas en los Biorreactores de 300 L.

[0032] Figura 4: Títulos virales y perfiles de glutamina para las tres operaciones simultáneas en los Biorreactores de 300 L.

[0033] Figura 5: Títulos virales y perfiles de DO para las tres operaciones simultáneas en los Biorreactores de 300 L.

25 **[0034]** Figura 6: Muestra los resultados de la RT-PCT PCR en el tiempo que representan el % de viremia en animales vacunados con PRRSV 94881.

[0035] Figura 7: Proceso simultáneo para la producción en frascos rodantes de PRRSV 94881.

[0036] Figura 8: Definición y secuencias temporales del proceso simultáneo para el proceso en frascos rodantes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0037] La presente invención proporciona métodos para la producción a gran escala de virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV) para uso en la producción de vacunas y otras composiciones. En métodos de producción típicos, el virus se desarrolla en una línea de células que es permisiva a la infección por PRRSV. Sin embargo, en métodos generales de este tipo, la línea de células se desarrolla en o cerca de la confluencia antes de la infestación con el PRRSV. En la presente invención, los autores de la invención han demostrado, de manera inesperada, que la línea de células no necesita ser sembrada ni hecha crecer antes de la infestación con PRRSV, sino que el PRRSV y la línea de células se pueden añadir al proceso del cultivo de células al mismo tiempo. Así, esta invención proporciona la importante ventaja de ahorro de tiempo, coste y materiales cuando el virus se produce en masa a escala comercial. La expresión escala comercial se refiere a volúmenes de cultivo celular superiores a 10 L. Por ejemplo, la escala comercial se refiere a un intervalo de escala de producción de 10 L a 3000 L para PRRSV vivo. En realizaciones más específicas, el volumen es de 30 L a aproximadamente 300 L.

[0038] Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para la producción de cualquier cepa de PRRSV, que incluye pero no se limita a las cepas de PRRSV depositadas como ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388 o ECACC V93070108. En realizaciones particularmente preferidas, los métodos de la invención se utilizan para producir la cepa 94881 de PRRSV, depositada por Bioscreen GmbH, Mendelstrasse 11, 48149, Muenster, Alemania, en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Porton Down, Salisbury, 30 Wiltshire, SP4 0JG, Gran Bretaña, con los Números de Acceso ECACC 11012501 (cepa parental) y ECACC 11012502 (MSV atenuado de elevado paso), cada una depositada el 25 de enero de 2011 de acuerdo con las disposiciones del Tratado de Budapest, o cualquier descendencia o progenie de una de las cepas antes mencionadas. Los virus desarrollados pueden ser cualquiera de los virus antes mencionados, en su formato atenuado. Alternativamente, los virus pueden estar genéticamente modificados de

modo que comprendan uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican determinantes antigénicos adicionales de uno o más enfermedades del cerdo.

[0039] La persona experta comprenderá que existe un cierto número de líneas celulares que son permisivas a la infestación por parte de PRRSV. Células a modo de ejemplo son células de macrófagos alveolares porcinas tales como las derivadas de células MARC-145. Otras células que se pueden infestar con el PRRSV incluyen células MA-104; células de riñón de hámster bebé (BHK - siglas en inglés); células de ovario de hámster chino (CHO); y células de riñón de mono verde africano que no sean células MA-104 ni células MARC-145 tales como células VERO; que son transfectadas. Además, las células pueden ser células primarias procedentes de un cerdo que han sido adaptadas para el crecimiento a largo plazo en cultivo. Células hospedantes particularmente adecuadas son la línea de células de simio MA-104, células Vero, o macrófagos alveolares porcinos. El PRRSV crece preferentemente en macrófagos de pulmón alveolares (Wensvoort et al., 1991). Unas pocas líneas de células tales como CL2621 y otras líneas de células clonadas de la línea de células de riñón de mono MA-104 (Benfield et al., 1992; Collins et al., 1992; Kim et al., 1993) son también susceptibles al virus y se pueden utilizar en métodos de producción a gran escala descritos en esta memoria.

[0040] En el método a modo de ejemplo de la presente invención mostrado en el Ejemplo 1 que figura más abajo se proporciona un proceso simultáneo para la producción de MLV 94881 de PRRSV. Mientras que este proceso se muestra para MLV 94881 de PRRSV, la persona experta comprenderá que este proceso se puede utilizar fácilmente para cualquier PRRSV para el que se requiera una producción a gran escala.

[0041] Los virus producidos mediante el método de producción de la invención se pueden utilizar para aplicaciones para las que se utiliza actualmente el PRRSV. En una realización específica, el virus producido de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria se utiliza para preparar un MLV de PRRSV.

[0042] Las cepas de virus desarrolladas de acuerdo con los métodos de la invención pueden ser virus PRRS virulentos, virus PRRS atenuados o, de hecho, virus de PRRS que han sido modificados para impartirles propiedades adicionales deseables. Esto se puede conseguir mediante técnicas convencionales de propagación y selección, tales como la

propagación continuada en células hospedadoras adecuadas para extender el fenotipo atenuado. Alternativamente, las cepas pueden ser modificadas genéticamente por mutación dirigida a la secuencia de ácido nucleico del genoma de estas cepas mediante técnicas adecuadas de ingeniería genética. Se secuenció el genoma de PRRSV por completo o
 5 parcialmente (Conzelmann et al., 1993; Meulenberg et al., 1993a, Murthaugh et al, 1995) y codifica, además de la ARN polimerasa dependiente de ARN (ORFs 1a y 1b), seis proteínas estructurales, de las cuales cuatro son glicoproteínas con cubierta denominada GP2 (ORF2), GP3 (ORF3), GP4 (ORF4) y GP5 (ORF5), una proteína de la membrana no glicosilada M (ORF6) y la proteína N de la nucleocápsida (ORF7) (Meulenberg et al. 1995,
 10 1996; van Nieuwstadt et al., 1996). La caracterización inmunológica y la secuenciación de nucleótidos de las cepas europea y de EE.UU. de PRRSV han identificado diferencias antigénicas menores dentro de las cepas de PRRSV localizadas en las proteínas virales estructurales (Nelson et al., 1993; Wensvoort et al., 1992; Murtaugh et al., 1995).

[0043] De hecho, el virus a modo de ejemplo desarrollado en la invención es el
 15 virus PRRSV 94881. Mientras que una cepa atenuada se desarrolla utilizando los métodos descritos en esta memoria, el virus puede fácilmente ser un virus PRRSV 94881 que se transforma en un virus quimérico, en donde la cadena principal del virus PRRSV 94881 bajo el N° de Acceso ECACC 11012502 o, de hecho, la cepa parental depositada bajo el N° de Acceso ECACC 11012501 se modifica para reemplazar la secuencia endógena de uno o
 20 más de ORF 1a, ORF 1b, ORF 2, ORF 3, ORF 4, ORF 5, ORF 6 u ORF 7 con el ORF correspondiente de una cepa diferente de virus del PRRS. Por ejemplo, la cepa diferente de del virus PRRS puede ser una cepa europea diferente tal como la cepa del virus Lelystad (Agente Lelystad (CDI-NL-2.91), u otras cepas tales como las depositadas bajo los Números de Acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, N° de
 25 Acceso ante CNCM I-1140, N° de Acceso ante CNCM I-1387, N° de Acceso ante CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, o ECACC V93070108 o, de hecho, puede ser una cepa de EE.UU. tal como el virus norteamericano del PRRS, pT7P129A; depósito ATCC VR-2332, depósito ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385,
 30 ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 y ATCC VR 2402.

[0044] Técnicas recombinantes para preparar secuencias modificadas son bien conocidas por los expertos en la técnica y, habitualmente, emplean la construcción de copias de ADN complementarias de longitud completa (clones infecciosos) del genoma viral que luego pueden modificarse mediante métodos de recombinación y manipulación de ADN (tal como la mutagénesis dirigida al sitio, etc.). De este modo, se pueden modificar, por ejemplo, sitios antigénicos o propiedades enzimáticas de las proteínas víricas. En la bibliografía se han reseñado clones infecciosos de cepas del virus del PRRS de genotipo europeo y norteamericano, y se pueden desarrollar utilizando los métodos de la invención.

10 **[0045]** Preferentemente, las vacunas de acuerdo con la presente invención son vacunas vivas modificadas que comprenden una o varias de estas cepas vivas en un vehículo adecuado, pero también se puede utilizar un virus inactivado para preparar vacunas con virus muerto (VM). Las VVM se formulan típicamente para permitir la administración de 10^1 a 10^7 partículas víricas por dosis, preferentemente 10^3 a 10^5 partículas por dosis, más preferentemente 10^4 a 10^5 partículas por dosis (4,0-5,0 $\log_{10}$ TCID₅₀). Los VM se pueden formular basándose en un título de preinactivación de 10^3 a 10^{10} partículas víricas por dosis. La vacuna puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una solución salina fisiológica. La vacuna puede comprender o no un coadyuvante. Un ejemplo de coadyuvante adecuado es acetato de α -tocoferol que se puede obtener bajo la marca Diluvac Forte®. Alternativamente, se pueden utilizar, por ejemplo, coadyuvantes a base de alumbre.

[0046] Los cerdos pueden ser infestados mediante el PRRSV a través de la vía oronasal. El virus en los pulmones es absorbido por los macrófagos alveolares en los pulmones y en estas células la replicación de PRRSV se completa en el espacio de 9 horas.

25 El PRRSV se traslada desde los pulmones a los nódulos linfáticos de los pulmones en el espacio de 12 horas y a los nódulos linfáticos periféricos, la médula ósea y el bazo en el espacio de 3 días. En estos sitios, sólo unas pocas células se tiñen de forma positiva para el antígeno viral. El virus está presente en la sangre durante al menos 21 días y, a menudo, durante mucho más tiempo. Al cabo de 7 días, se encuentran en la sangre anticuerpos

30 contra el PRRSV. La presencia combinada de virus y anticuerpo en cerdos infectados con

el PRRS demuestra que la infección por el virus puede persistir durante largo tiempo, aunque a un bajo nivel, a pesar de la presencia del anticuerpo. Durante al menos 7 semanas, la población de células alveolares en los pulmones es diferente de los pulmones SPF normales.

- 5 **[0047]** Una vacuna se puede presentar en forma de una preparación liofilizada del virus vivo, que se va a reconstituir en un disolvente, para dar como resultado una solución para inyección. Así, después de las etapas de recolección de la presente invención, el virus se puede combinar y liofilizar. El disolvente puede ser, p. ej., agua, solución salina fisiológica o tampón, o un disolvente coadyuvante. El disolvente puede contener
- 10 coadyuvantes, por ejemplo, acetato de α -tocoferol. La vacuna reconstituida se puede inyectar a continuación en un cerdo, por ejemplo, en forma de inyección intramuscular o intradérmica en el cuello. Para la inyección intramuscular, se puede aplicar un volumen de 2 ml, para una inyección intradérmica es típicamente de 0,2 ml. En un aspecto adicional, la presente invención es por tanto un producto de vacuna que comprende en recipientes
- 15 separados, una composición liofilizada del virus y un disolvente para la reconstitución y, opcionalmente, contiene además un folleto o una etiqueta con las instrucciones de uso.

- [0048]** Una vacuna preparada a partir de un virus producido por un método de la invención puede no sólo comprender una o varias de las cepas mencionadas anteriormente, sino también puede incluir otros componentes activos contra el SRRP u otras
- 20 enfermedades porcinas víricas o bacterianas, tales como el circovirus porcino o el virus de la fiebre porcina clásica. Por consiguiente, la invención se refiere adicionalmente a una vacuna tal y como se ha descrito, caracterizada porque contiene al menos un antígeno adicional activo contra una enfermedad porcina que no es el SRRP. Además, la vacuna puede comprender determinados adyuvantes aceptables en farmacia o veterinaria. Uno de
- 25 estos adyuvantes es α -tocoferol. Así, nuevas composiciones de vacunas, en particular vacunas contra el virus PRRS que comprenden PRRSV 94881 se pueden mejorar adicionalmente mediante la adición de adyuvantes. Mejoras de este tipo comprenden la preparación de las vacunas en combinación con adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna, de modo que se observa una mejora respuesta/resultado clínico con la
- 30 administración de la combinación del adyuvante y la vacuna en comparación con la

administración de la vacuna sola. Por ejemplo, las composiciones de vacunas de la invención pueden comprender una vacuna contra el virus PRRSV 94881 y un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en MCP-1, fracciones de Haemophilus sonnus, Carbapol™ y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la vacuna del virus que comprende la vacuna contra el virus PRRSV 94881, puede ser una vacuna subunidad recombinante o, alternativamente, puede ser una vacuna contra el virus viva atenuada. Una vacuna viva a modo de ejemplo que existe es Ingelvac®PRRS MLV y el PRRSV 94881 se puede formular de una manera similar a Ingelvac®PRRS MLV.

[0049] Además de lo anterior, las composiciones de vacunas pueden contener otros ingredientes en tanto que los otros ingredientes no interfieran con las propiedades del adyuvante del MCP-1, fracciones de Haemophilus sonnus, Carbapol™ u otro carbómero o la vacuna contra el virus subyacente. Otros ingredientes de este tipo incluyen, por ejemplo, aglutinantes, colorantes, desecantes, antisépticos, agentes humectantes, estabilizantes, excipientes, adhesivos, plastificantes, agentes de pegajosidad, espesantes, materiales para parches, bases para ungüentos, separadores de queratina, sustancias de carácter básico, promotores de la absorción, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes superiores, tensioactivos, agua y agentes tampón. Otros ingredientes preferidos incluyen agentes tampón, bases para ungüentos, ácidos grasos, antisépticos, sustancias de carácter básico o tensioactivos.

[0050] Puede variar el contenido o la cantidad de los adyuvantes utilizados en la invención y se puede determinar teniendo en consideración, por ejemplo, las propiedades de la vacuna contra el virus del PRRS que se esté utilizando, y la forma de dosificación. El adyuvante puede comprender, por ejemplo, 1 a 100% en peso. Las composiciones de la invención, basadas en PRRSV 94881, se producen mezclando juntos el componente adyuvante y el componente vacuna contra el virus, ya sea solos o con otros diversos ingredientes. Las composiciones pueden ser tales que la vacuna contra el virus y los adyuvantes se presentan como una formulación o, alternativamente, el adyuvante y la vacuna se presentan en formulaciones distintas que se pueden administrar de forma simultánea o secuencial.

- [0051]** El componente adyuvante se puede administrar por separado de la vacuna contra el virus en la administración a organismos. Alternativamente, el adyuvante de acuerdo con la invención, junto con la vacuna contra el virus, se puede administrar como una composición de vacuna sencilla. La vacuna contra el virus puede ser cualquier vacuna
- 5 contra el virus. Realizaciones más específicas contemplan el uso de una vacuna contra el virus PRRS que comprende PRRSV 94881. Además, una vacuna de este tipo se puede combinar con otras vacunas tales como Ingelvac® PRRS MLV y/o Porcilis® PRRS. Esta es meramente una vacuna contra el virus PRRS a modo de ejemplo, y otras vacunas de este tipo se pueden suplementar con los adyuvantes descritos en esta memoria.
- 10 **[0052]** Las composiciones inmunogénicas descritas en esta memoria son particularmente ventajosas en la inducción de la producción de una respuesta de anticuerpo al virus PRRS. En particular, se demuestra en esta memoria que el uso de estos adyuvantes específicos y, en particular, MCP-1, potencia la respuesta inmune al virus PRRS cuando existe una administración combinada del adyuvante y la vacuna contra el virus PRRS en
- 15 comparación con la administración de vacuna sola. Se demuestra que una administración de este tipo produce una disminución de la gravedad de los síntomas clínicos tales como lesiones pulmonares, anorexia, decoloraciones de la piel, letargia, síntomas respiratorios, cochinillos momificados, tos, diarrea y combinaciones de los mismos, que están asociados con una infección por PRRSV. De hecho, hay una mayor disminución de la gravedad de
- 20 los síntomas clínicos asociados con una infección por el virus PRRS, observada con la combinación de la vacuna y adyuvante en comparación con la disminución de este tipo de síntomas producida por la administración de la vacuna sola en ausencia de dicho adyuvante.
- [0053]** Así, las composiciones potencian particularmente el resultado clínico en un
- 25 animal enfermo en comparación con el resultado de la administración de la vacuna contra el virus PRRS sola. En realizaciones específicas, el resultado clínico potenciado es una reducción del porcentaje de lesiones pulmonares cuando se compara con animales que no reciben la composición inmunogénica en combinación con dicho adyuvante. En otras realizaciones, el resultado clínico potenciado es una reducción de la viremia en animales

cuando se compara con animales que no reciben la composición inmunogénica en combinación con dicho adyuvante.

[0054] Así, en un aspecto, la invención se refiere a una vacuna mejorada, más particularmente a una vacuna contra el virus PRRS mejorada, en donde la mejora
5 comprende mezclar la vacuna contra el virus con un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en MCP-1, fracciones de *Haemophilus sonnus*, carbapol y combinaciones de los mismos. La composición de vacunas de la invención puede comprender, además, un soporte farmacéuticamente aceptable. Además, las vacunas pueden comprender otros ingredientes activos, incluidos HS, ORF 5, INF alfa, Poli ICLC, IL-12 para potenciar
10 adicionalmente la función de la vacuna contra el PRRS. Adyuvantes de este tipo se pueden añadir solos o en combinación con MCP-1.

[0055] Las composiciones de vacunas de la invención se pueden formular por cualquier método conocido en la técnica de la formulación, por ejemplo en preparados líquidos, suspensiones, ungüentos, polvos, lociones. emulsiones de agua en aceite,
15 emulsiones de aceite en agua, emulsiones, cremas, cataplasmas, parches y geles, y se utilizan preferiblemente como medicamentos. Así, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la composición de vacunas anterior. La composición de vacunas de acuerdo con la presente invención, cuando se administra dermalmente, puede inducir significativamente la
20 producción de anticuerpos. Por consiguiente, en otra realización preferida de la presente invención, la composición de vacunas se puede proporcionar como un preparado transdermal.

[0056] Además, tal como se describe arriba, el virus y el adyuvante en la presente invención se pueden administrar a un organismo juntos en forma de una composición de
25 vacunas sencilla, o en forma de un preparado adyuvante separado y distinto del componente virus del PRRS antigénico de la vacuna, con lo que el adyuvante actúa de tal manera que la cantidad de un anticuerpo producido en el organismo en respuesta a la vacuna contra el virus PRRS se puede incrementar significativamente en comparación con la administración de la vacuna contra el virus PRRS sola. Así, de acuerdo con todavía otro
30 aspecto de la presente invención, se proporciona un método para aumentar la cantidad de

un anticuerpo producido contra el virus del PRRS, comprendiendo el método administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna contra el virus del PRRS, y un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en MCP-1, fracciones de Haemophilus sonnus, carbapol y combinaciones de los mismos, ya sea solos o en combinación con un
5 componente adicional seleccionado del grupo que consiste en HS, ORF 5, INF alfa, Poli ICLC, IL-12 y combinaciones de los mismos, en una cantidad eficaz como un inmunoadyuvante, de forma simultánea o sucesiva en el organismo.

[0057] Cuando el adyuvante y la vacuna contra el virus PRRS se administran a un organismo, se potencia el resultado clínico del animal. La cantidad eficaz del adyuvante y
10 la cantidad inmunológicamente eficaz de la vacuna contra el virus del PRRS se puede determinar adecuadamente por una persona con una experiencia normal en la técnica teniendo en consideración, por ejemplo, el tipo y las propiedades de la sustancia antigénica, las especies de organismos, la edad, peso corporal, gravedad de las enfermedades, tipo de las enfermedades, el tiempo de administración y el método de
15 administración, y utilizando, además, la cantidad de un anticuerpo producido contra la sustancia antigénica en el organismo como un índice.

[0058] La vacuna contra el virus del PRRS, el adyuvante o combinaciones de los mismos se pueden administrar a organismos por cualquier método adecuado, seleccionado, por ejemplo, dependiendo del estado de los pacientes y las propiedades de las
20 enfermedades. Ejemplos de métodos de este tipo incluyen la administración intraperitoneal, la administración dermal (por ejemplo inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intradermal y parches), administración nasal, administración oral, administración a través de la mucosa (por ejemplo administración rectal, administración vaginal y administración corneal). Entre ellos se prefiere la administración intramuscular.

[0059] Una dosis terapéutica de PRRSV MLV a modo de ejemplo es aproximadamente dos mililitros (2 mL). Los artesanos expertos reconocerán que se puede variar la cantidad de dosificación en base a la raza, estatura y otros factores físicos del sujeto individual, así como la formulación específica de PRRSV MLV y la vía de administración. Preferiblemente, el PRRSV MLV se administra en una dosis única; sin
30 embargo, pueden ser útiles dosis adicionales. De nuevo, el artesano experto reconocerá a

través de la presente invención que la dosificación y el número de dosis se ve influenciado por la edad y el estado físico del cerdo sujeto, así como por otras consideraciones comunes a la industria y las condiciones específicas bajo las cuales se administra el PRRSV MLV.

[0060] En otras determinadas realizaciones, la vacuna puede ser una vacuna multivalente que comprende dos o más virus del PRRS, en que al menos una de los virus del PRRS es el virus 94881 atenuado, depositado bajo el n° de Acceso ECACC 11012502. Los otros virus PRRS pueden ser uno o más seleccionados del grupo consistente en la cepa PRRSV depositada bajo los Números de Acceso cepa del virus Lelystad (Agente Lelystad (CDI-NL-2.91), u otras cepas tales como las depositadas bajo los Números de Acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, N° de Acceso ante CNCM I-1140, N° de Acceso ante CNCM I-1387, N° de Acceso ante CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388, o ECACC V93070108 o, de hecho, puede ser una cepa de EE.UU. tal como el virus norteamericano del PRRS, pT7P129A; depósito ATCC VR-2332, depósito ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 y ATCC VR 2402.

[0061] Las vacunas basadas en virus PRRS se pueden utilizar para vacunar tanto a cochinitos como a cerdas. En un aspecto de la invención, se selecciona un regimen de dosis particular en base a la edad del cerdo y el antígeno seleccionado para la administración. Esto permitirá a los cerdos de cualquier edad recibir la dosis más eficaz en base al descubrimiento de la presente invención de que la infección por PRRSV (tanto por exposición de tipo salvaje y de vacunación) se despeja mucho más rápidamente en animales de más edad. Así, en algunos aspectos, se prefiere la vacunación de animales de edad a la vacunación de cerdos más jóvenes, incluidos los de tres semanas de edad y menores ayuda a inducir la inmunidad activa y sigue siendo muy beneficiosa. La edad del animal puede ser un factor importante en el control del PRRS y puede ser un factor que impacta sobre la vacunación y el desarrollo de una respuesta inmune eficaz. Así, la edad, la gestión de la enfermedad, la cría de los animales, la inmunidad innata y activa son importantes y necesitan ser considerados en las estrategias de control.

- [0062]** La vacuna contra PRRSV 94881 se puede administrar de cualquier manera convencional y, en algunos métodos preferidos, la administración es nasal. Se prefiere que la vacuna contra el PRRSV administrada proporcione sus beneficios de tratar o reducir la gravedad o la incidencia de una infección por PRRSV tras una dosis única, como con
- 5 Ingelvac®, sin embargo, si se seleccionan otros antígenos o vacunas de combinación o multivalentes, debe entenderse que éstos pueden administrarse de su forma convencional, que puede incluir una o más dosis de refuerzo después de la administración inicial. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar niveles de dosificación apropiados en base a la vacuna contra el PRRSV seleccionada y el intervalo de edades de los animales a
- 10 los que se administrará el antígeno.

[0063] Ejemplo 1:

[0064] Ampliación a modo de ejemplo para la producción de PRRSV 94881 MLV

[0065] La ampliación del proceso en el biorreactor de 300 L para PRRSV 94881 utilizaba células MA104 que se encontraban entre el paso 64-84. Estas células se expandieron en frascos rodantes de 850 cm² (Corning). Las células se cultivaron al mismo tiempo con una infección por virus en Biorreactores air-lift de 300 L. A lo largo del proceso de cultivo, las concentraciones en el medio de dextrosa/lactato se vigilaron en g/L. En la recogida, los fluidos se desecharon y se retuvieron las muestras de virus.

10 **[0066]** Las composiciones del medio eran como se muestra en la siguiente tabla:

Componente	Cantidad
Suero bovino fetal gamma irradiado	5%
MEM sin polvo rojo fenol	9,6 g/L
Sulfato de neomicina	30 mg/L
Bicarbonato de sodio	1,4 g/L
Ácido clorhídrico	para ajustar el pH

[0067] Se prepararon y filtraron el MEM sin medio Rojo Fenol, neomicina y 1,4 g/L de bicarbonato de sodio. El FBS se añadió al medio, colocándose el medio simultáneamente en el biorreactor. La cantidad de neomicina añadida se calcula mediante:

15 $\text{vol (L)} \times 30 \text{ mg/L} \div \text{Potencia (mg/g de base)}.$

[0068] El proceso simultáneo para el crecimiento de PRRSV 94881 comprende sembrar células AK MA104 en el biorreactor e infestar simultáneamente las células con la siembra viral de PRRSV 94881. La figura 1 esboza el proceso simultáneo. En la figura 2 se proporcionan secuencias temporales para el proceso simultáneo esbozado en la figura 1.

[0069] En el proceso simultáneo un volumen de 270 L de medio se filtró en condiciones estériles en el biorreactor. El medio se añadió al recipiente el mismo día o el día anterior a la adición de células y suero. Si el medio se añade al biorreactor el día anterior a la adición de las células y suero, se recomienda que se active el control de la temperatura de manera que el medio se mantenga a 35°C, el pH en el modo de control con el pH mantenido en 7,25 $\pm$ 0,1 y modo de vigilancia de la DO y agitación ajustada a 35 rpm. El día de la adición de las células y suero bovino fetal irradiado (IFBS - siglas en inglés), el control de la temperatura se ajusta a 36°C. El IFBS se añade al biorreactor después de la adición del medio y antes de la siembra de las células. La concentración diana del IFBS es 5% v/v, lo cual, en el volumen de 270 L, es un volumen de 14,0 L de IFBS por biorreactor.

[0070] Se realizaron tres rondas en el biorreactor de 300 L. Los parámetros del biorreactor eran: punto de ajuste de la temperatura a 36°C, punto de ajuste del pH a 7,25 en el modo de control, vigilancia de la DO y agitador a 35 rpm. Las Tablas 3, 4 y 5 muestran los datos registrados el % de DO % a partir del OIT, dextrosa y lactato a partir de YSI, y el pH y L-gutamina a partir de NOVA. Los títulos PD son sólo de referencia. Los títulos QC son los títulos oficiales.

Tabla 3: Resultados para la operación del lote 001PD-X en el biorreactor de 300 L								
días	pH	DO %	Dextrosa g/L	Lactato g/L	Gln mmol/L	Título PD	Título QC	Comentarios
			YSI	YSI	NOVA	TCID50	TCID50	
-1	7,24	168	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	Sólo Medio
0PI	7,2	92	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
1PI	7,26	168	1	0,073	2,63	3,67	N/E	N/E
2PI	7,25	83	0,95	0,12	2,36	4,9	N/E	N/E
3PI	7,23	74	0,742	0,262	2,14	5,88	N/E	N/E
4PI	7,24	63	0,408	0,58	1,72	6,45	7,0	N/E
5PI	7,06	30	0,044	0,921	1,19	6,50	7,3	DO control
6PI	7,25	30	0,011	0,902	0,74	6,38	6,7	Claro
7PI	7,24	30	0	0,855	0,49	7,40	7,4	turbio

[0071] La Tabla 3 muestra los resultados del lote 001PD-X durante 7 días de infección. Se tomaron muestras diariamente y la operación se terminó el día 7 PI. El pH se ajustó a 7,25 y se mantuvo constante durante la operación, excepto el día 4 PI cuando cayó

- por debajo de 7,0. El día 4 PI, la glucosa cayó hasta 0,4 desde 0,74 el día anterior, la glutamina comenzó a ser consumida y el título comenzó a aumentar aproximadamente un log. El título pico se observó el día 5 PI cuando la glucosa se había consumido totalmente ($\leq 0,1$ g/L). También el día 5 PI, la DO cayó hasta el 30% y se inició el control para evitar la caída a cero de la DO durante una noche. El día 6 PI cayó el título y luego aumentó hasta 7,4 el día 7 PI. La muestra era turbia el día 7 PI.

Tabla 4: Resultados para la operación del lote 002PD-X en el biorreactor de 300 L								
días	pH	DO %	Dextrosa g/L	Lactato g/L	Gln mmol/L	Título PD	Título QC	Comentarios
			YSI	YSI	NOVA	TCID50	TCID50	
-1	7,27	116	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	Medio añadido
0PI	7,2	83	1,04	0	N/E	N/E	N/E	células/suero/siembra añadidos
1PI	7,25	75	1,01	0,073	1,64	3,88	n/a	N/E
2PI	7,25	74	0,954	0,105	1,73	5,5	n/a	N/E
3PI	7,24	70	0,762	0,223	1,41	5,93	6	N/E
4PI	7,19	60	0,409	0,561	1,25	6,62	6,5	N/E
5PI	7,21	30	0,005	0,881	0,9	6,79	7,5	RECOLECCIÓN-I
R0PI (re-alimentado)	7,24	116	0,001	0,858	0,64	N/E	N/E	falló la sonda DO
R1PI	6,99	116	0,247	0,726	1,38	7,13	7,5	N/E
R2PI	7,15	116	0,0	0,894	0,95	7,06	7,0	dextrosa era cero
R3PI	7,13	116	0,0	0,865	0,66	6,69	7,5	Claro
R4PI	7,13	116	0,0	0,819	0,21	7,52	7,5	Claro
R5PI	7,13	116	0,0	N/E	0,1	7	7,3	Cierta turbidez

- [0072]** La Tabla 4 muestra resultados del lote 002PD-X (R0PI es el punto en el que se re-alimenta el cultivo). En base a los resultados del título del lote 001PD-X, el día de recolección se estableció el día 5 PI. Los días 1 PI a 5 PI del lote 002PD-X eran consistentes con el lote 001PD-X. El biorreactor fue recolectado y luego se re-alimentó el día 5 PI. Se estableció la curva de crecimiento para la recolección-II. Se tomaron muestras sobre una base diaria durante 5 días. La dextrosa se había consumido por completo hacia el día R2PI. El título se encontraba en el pico durante 5 días (la variación de 0,5 logs se encuentra dentro del error de ensayo). La glutamina se había consumido totalmente hacia el día R5PI. La sonda de DO falló después de la re-alimentación. El nivel de DO no se podía medir (lo más probablemente próximo a cero). El día R4PI las células seguían

estando fijadas, ya que la muestra en el frasco era clara. El día R5PI se observó una cierta turbidez en el frasco de la muestra, lo que indicaba que las células podían haber comenzado a desprenderse de descendencia.

Tabla 5: Resultados para la operación del lote 003PD-X en el biorreactor de 300 L								
días	pH	DO %	Dextrosa g/L	Lactato g/L	Glutamina mmol/L	Título PD	Título QC	Comentarios
			YSI	YSI	NOVA	TCID 50	TCID 50	
0PI	7,49	78	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
1PI	7,25	69	0.987	0,078	2,05	4,38	4,7	vigilar la DO/controlar el pH
2PI	7,23	66	0.935	0,107	1,9	5,13	5,7	N/E
3PI	7,22	60	0.783	0,221	1,71	6,2	6,5	N/E
4PI	7,29	53	0.453	0,519	1,45	6,36	6,6	N/E
5PI	7,1	30	0.049	0,899	1,17	6,36	7,0	RECOLECCIÓN-I
0PI (re-alimentación)	7,19	71	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	Vigilar la DO
R1PI	6,98	18	0.305	0,702	2,69	7,26	7,3	N/E
R2PI	7,23	7	0,0	0,917	1,82	6,85	7,5	RECOLECCIÓN-II
0PI 2ª re-alimentación	7,21	74	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
2R1PI	6,91	13	0,097	0,853	1,69	7,0	7,5	control de la DO a 10%
2R2PI	7,19	3	0,0	0,883	0,82	7,2	7,3	Vigilar la DO
2R3PI	7,17	2	N/E	N/E	0,42	7,46	7,5	turbio
2R4PI	7,24	18	N/E	N/E	0,22	7,0	7,5	la DO está subiendo
2R5PI	7,24	47	N/E	N/E	0,13	6,68	7,0	turbio
2R6PI	7,22	62	N/E	N/E	0,06	6,5	7,0	turbio
2R7PI	7,24	68	N/E	N/E	0,04	6,36	6,2	turbio

5

[0073] La Tabla 5 muestra los resultados del lote 003PD-X. En base a los resultados del título del lote 002PD-X, el día de recolección-II se estableció el día 1 PI o 2PI. Se decidió recolectar fluidos el día 2 PI para proporcionar una flexibilidad para la producción. Se estableció una curva de crecimiento para la Recolección-III durante 7 días. Se tomaron muestras sobre una base diaria. La dextrosa se había consumido por completo hacia el día 2 R2PI. El título se encontraba en el pico durante 4 días y luego cayó hasta 7,0

10

durante 2 días (la variación de 0,5 logs se encontraba dentro del error de ensayo), después cayó hasta 6,2 el día 7 PI. La glutamina se había consumido totalmente hacia el día 2 R5PI. La DO se tomó fuera de control el día 2R2PI para vigilar la muerte de las células.

[0074] Fase de recolección-I para la propagación del virus en la escala de 300

- 5 **L:** La curva de crecimiento para la Recolección-I (lote 001PD-X) mostró que las partículas virales continuaban creciendo hasta el día 7 PI a pesar de haberse consumido por completo la dextrosa ($\leq 0,1$ g/l) hacia el día 5 PI. El consumo de glutamina se inició cuando la dextrosa se encontraba aproximadamente la mitad de la concentración inicial de 1 g/L (día 4 PI), y luego, después de haberse consumido la dextrosa, la glutamina pareció ser la
- 10 fuente de energía primaria. La inconsistencia en las lecturas de glutamina durante los primeros 2-3 días pudieran atribuirse a fluctuaciones en el instrumento NOVA, ya que el medio sólo contiene 2 mmol/L. Los niveles de la DO descendían de forma consistente durante el metabolismo de dextrosa/glutamina y la propagación del virus.

[0075] La cinética de propagación del virus sugirió recolectar el virus 5-7 días PI.

- 15 La variación en los títulos de QC entre el día 4 PI y 7 PI se encontraba dentro de la variación del ensayo ($\pm 0,71$ logs/ml). El criterio de Recolección-I era el instante en el que la dextrosa se había consumido por completo ($\leq 0,1$ g/l) que era consistente con los datos de 30 L (Nº de estudio 6127-1310-09K-198). Por lo tanto, las mediciones fuera de línea de la dextrosa, partiendo del día 4 PI serían necesarias para seguir la pista de los niveles de
- 20 dextrosa. La Tabla 3 demostró que el virus PRRSV 94881 era estable durante 3 días (5-7 días PI) en el biorreactor de 300 L después de haberse agotado la dextrosa. Sin embargo, si se ha de realizar una segunda recolección, en base a los resultados de las tablas 4 y 5, se recomienda que la Recolección-I se realice el primer día en el que la concentración de la dextrosa es $< 0,1$ g/L (utilizando la medición YSI) para asegurar la adherencia de las
- 25 células a los descendientes (soportes) en el biorreactor.

[0076] Fase de recolección-II para la propagación del virus en la escala de 300

- L:** Para los lotes 002PD-X y 003PD-X, después de haberse realizado la Recolección-I el día 5 PI, se añadieron medio reciente y suero al 5% para generar la segunda recolección de fluidos virales (Tablas 4 y 5). El medio MEM (270-280 L) con IFBS (al 5% v/v) se añadió
- 30 al biorreactor siguiendo los mismos procesos que los establecidos para ajustar el primer

material de recolección. Se realizó una curva de crecimiento para la recolección-II durante 5 días en el lote 002PD-X y el título del pico se consiguió el día 1 post re-alimentación (véase la Tabla 4). El título era estable durante 4 días. El título del virus el día 1 post-re-alimentación era equiparable al título de la primera recolección Tabla 2). El nivel de dextrosa se había consumido por completo el día 2 PI. Se podía utilizar un intervalo de cuatro días post-re-alimentación para el segundo criterio de recolección. Sin embargo, la realización de la segunda recolección el día 4 PI podría tener un efecto sobre la tercera recolección, ya que se observó una cierta turbidez en las muestras de fluido que se tomaron el día 4 PI, indicando la muerte de las células o el desprendimiento de la descendencia.

Así, para el lote 003PD-X la recolección-II se realizó el día 2 PI. En base a los datos del lote 003PD-X se recomienda que los días diana de la Recolección II sean 1-2 PI si se han de realizar una segunda re-alimentación y una tercera recolección.

[0077] Fase de recolección-III para la propagación del virus en la escala de 300

L: Para el lote 003PD-X (Tabla 5), después de haber realizado la Recolección II el día 2 PI, se añadió al recipiente medio y suero adicionales para la generación de fluidos virales de tercera recolección (Tabla 5). El medio MEM (270-280 L) con IFBS (al 5% v/v) se añadió al biorreactor siguiendo los mismos procesos que los establecidos para ajustar el primer material de recolección. Se realizó una curva de crecimiento para la recolección-III durante 7 días y el título del pico se consiguió el día 1 post re-alimentación (véase la Tabla 5). El título era estable durante 4 días. El título del virus el día 1 post-re-alimentación era equiparable al título de la segunda recolección (Tablas 4 y 5). La dextrosa se había consumido por completo el día 1 PI. Se podía utilizar un intervalo de cuatro días post-re-alimentación para el tercer criterio de recolección.

[0078] Las tres gráficas que figuran más abajo representan los perfiles de dextrosa, glutamina y DO y los títulos para las tres operaciones realizadas en el biorreactor de 300 L. El propósito de la gráficas es mostrar la consistencia de las tres operaciones.

[0079] La figura 3 muestra un sumario de las tres operaciones realizadas en la escala de 300 L para el consumo de dextrosa y los títulos de virus. Los perfiles de la Recolección-I para las tres operaciones eran muy consistentes, la dextrosa se había consumido totalmente ($\leq 0,1$ g/l) hacia el día 5 PI y coincidió con el título pico en las tres

operaciones realizadas. Después de la primera re-alimentación, la dextrosa se encontraba por debajo de 0,3 g/l para los lotes 002PD y 003PD el día 1 PI y el título ya se encontraba en el pico. El día 2 PI, la dextrosa se había consumido por completo y el título del virus permanecía en el pico. Para la recolección III en el lote 003PD, cuando la segunda re-alimentación se realizó el día R2PI, la dextrosa había descendido a menos de 0,1 g/L hacia el día 2R1PI y el título se encontraba en el pico.

[0080] La figura 4 muestra un sumario de las tres operaciones realizadas en la escala de 300 L para el consumo de glutamina y los títulos de virus. Como se puede ver, los perfiles de la recolección-I para las tres operaciones eran muy consistentes. La glutamina cayó a la mitad de su concentración inicial de 2 mmol/L hacia el día 5 PI y coincidió con el título pico en las tres operaciones realizadas. Después de la primera re-alimentación, la glutamina cayó hasta la mitad de su concentración inicial hacia el día 2 PI para los lotes 002PD y 003PD y el título ya se encontraba en el pico desde el día 1 PI. Para la recolección III en el lote 003PD, la segunda re-alimentación se realizó el día R2PI. La glutamina se estaba consumiendo lentamente hasta 0 hacia el día 5 PI y el título del virus era consistente y luego las células comenzaron a morir y el título cayó hacia el día 7 PI.

[0081] Como se puede observar para el perfil de Recolección-I, las tres operaciones eran muy consistentes, la DO había caído hasta el 30 % hacia el día 5 PI y coincidió con los títulos pico en las tres operaciones realizadas. Después de la primera re-alimentación, la sonda de DO fracasó para el lote 002PD-X, de modo que no hay datos disponibles, en el lote 003PD-X DO cayó el día 1 PI, coincidiendo con el título pico. Para la recolección-III en el lote 003PD, cuando la segunda re-alimentación se realizó el día R2PI, la DO disminuyó rápidamente hasta el día 3 PI cuando las células comenzaron a morir y la O se consumió hasta 0 hacia el día 5 PI y el título del virus era consistente, entonces las células comenzaron a morir y el título cayó hacia el día 7 PI.

Tabla 6: Sumario de las condiciones y resultados del proceso simultáneo en operaciones en biorreactores de 300 L*.

Lote	PCD	MOI	TOH1	Título H1	TOH2	Título H2	TOH3	Título H3
001PD-X	$7,0 \times 10^9$	0,1	5	7,3	N/E	N/E	N/E	N/E
002PD-X	$7,0 \times 10^9$	0,1	5	7,5	1-4	7,5	N/E	N/E
003PD-X	$7,0 \times 10^9$	0,1	5	7,0	2	7,5	1-4	7,5

*Condiciones diana (0,1 MOI, $7,0 \times 10^9$ células totales por biorreactor de 300 L, pH 7,25 y 36°C)

- (H1): Indica las primeras recolecciones en días post-infección.
 (H2): Indica las segundas recolecciones en días post-infección.
 (H3): Indica las terceras recolecciones en días post-infección.
- 10 **[0082]** Los fluidos virales procedentes del Lote 001PD-X se blanquearon y desecharon. Se mantuvo un litro de la recolección-I del lote 002PD-X y se añadió SGS (al 25% v/v) para fines de búsqueda, el resto de los fluidos fueron blanqueados y desechados. Dos litros de la Recolección II del lote 003PD-X se mantuvieron congelados para fines de concentración y el resto de los fluidos se blanquearon y desecharon.
- 15 **[0083]** **Intervalo de la densidad de células de siembra (PCD) para la escala de 300 L:** La densidad de células de siembra (PCD) es $7,0 \times 10^9$ células totales por cada biorreactor de 300 L con un volumen de trabajo de 270-280 L. Basado en los datos del Proceso de Transferencia del Proceso Final de 30 L (6127-1310-09K-198), el intervalo de siembra de células totales oscila entre $7,0 \times 10^8$ - $1,0 \times 10^9$ por cada biorreactor de 30-L.
- 20 Debido a restricciones en el tiempo, sólo se evaluó la densidad de siembra de células diana.
- [0084]** **Intervalo de la multiplicidad de infección (MOI) para la escala de 300 L:** La MOI diana de 0,1 es ideal para la propagación de PRRSV 94881 dentro de este sistema de crecimiento. Los niveles bajo y alto de la MOI de 0,01 y 0,3, respectivamente, se examinaron en los biorreactores de 30 L.
- 25 **[0085]** **Análisis de riesgo:** Los parámetros recomendados del procesos simultáneo en el biorreactor de 300 L se esbozan en la Tabla 11. Solamente se testaron parámetros diana y se consideraron por si eran críticos o no críticos para el proceso. Los intervalos se evaluaron en la escala de 30 L. Las definiciones son como sigue:

- Parámetros críticos son aquellos parámetros que son críticos para los atributos de calidad del producto final;
- Parámetros no críticos son aquellos parámetros que pueden ser controlados directamente dentro del intervalo definido o que tienen un amplio intervalo operacional, de modo que una desviación del punto establecido no es crítica. Parámetros no críticos ayudan a controlar los parámetros críticos dentro del intervalo definido.
- Parámetros "Para Información Solamente" son parámetros que son vigilados para obtener información adicional sobre el proceso, pero que no tienen correlación directa con los atributos del producto final.

Tabla 7: Sumario de los parámetros del proceso simultáneo en un biorreactor de 300 L para PRRSV 94881 MLV

Parámetro	*Límite Inferior Ensayado	*Límite Superior Ensayado	*Intervalo Aceptado	Diana Aceptada	Crítico/No Crítico
MOI	0,01	n/a	0.01-0.30	0,10	NC*
Densidad de Siembra de Células	$7,0 \times 10^9$ células	$1,0 \times 10^{10}$ células n°	$7,0 \times 10^8$ células a 10×10^9 células	$7,0 \times 10^9$ células	NC*
Tiempo de la 1ª Recolección (Días post-infección)	Día 4	Día 7	Día 5 – Día 7 PI	Día 5 – 7 PI	Crítico **
Temperatura	35 °C	38 °C	36±1°C	36 °C	NC*
pH	6,5	7,9	6.9 – 7.9	7,2	NC*
Tiempo de 2ª Recolección (Días post re-alimentación)	Día 1	Día 5	Día 1 – Día 4 PI	1-2	Crítico***
Tiempo de 3ª Recolección (Días post re-alimentación)	Día 1	Día 7	Día 1 – Día 4 PI	1-4	Crítico

* No crítico dentro del intervalo examinado en la escala de 30 L.

- ** El criterio de primera-Recolección se decide por el tiempo del consumo completo de dextrosa en el periodo de 5-7 días PI. Sin embargo, si se ha de realizar una segunda recolección, la Recolección-I debería ser el primer día en el que la dextrosa es 0,1 g/L

*** Los fluidos son estables durante 5 días. Sin embargo, si se ha de realizar una recolección, la recolección debería hacerse entre los días 1 y 2
Nº basado en datos de 30 L para el scale-up

[0086] Conclusiones y Recomendaciones del Proceso: El proceso simultáneo de
5 ampliación del biorreactor de 30 L al de 300 L se consiguió con éxito. La Recolección-I se encontraba dentro del intervalo del biorreactor de 30 L para los días de recolección y el título. La Recolección-II también tenía éxito con títulos equiparables a la Recolección-I. El título de la 2ª recolección era estable durante 4 días. Se consiguió una recolección adicional (tercera) con títulos equiparables a las recolecciones I y II. El título de la tercera
10 recolección era estable durante al menos 4 días.

[0087] Las recomendaciones para un proceso simultáneo en un biorreactor de 300 L preferido para PRRSV 94881 MLV son como sigue:

[0088] Propagación del virus, RECOLECCIÓN-I: La composición del medio era MEM sin Rojo Fenol, 30 mg/L de neomicina y 1,4 g/L de bicarbonato de sodio.
15 Células MA104 se sembraron a una densidad de 7×10^9 / biorreactor para descendencia de 300 L en 270 - 280 L de medio suplementado con 14,0 L de suero de bovino fetal al 5% v/v (intervalo: 7×10^9 - 1×10^{10} / biorreactor para descendencia de 300 L). La temperatura del biorreactor se controló en $36 \pm 1^\circ\text{C}$. La DO se ajusta en el "Modo de Vigilancia". Activar el control de la DO en el punto establecido de 10% una vez que el nivel de DO
20 caiga a 10 - 30%. el pH 7,2 se establece en el Modo Control. Los parámetros PID utilizados para el valor elevado de pH (adición de CO₂) eran:

	Ganancia	300,00
	Reajustar mins por cada repetición	2,20
	Tasa, minuto	0,50
25	Unidades de pH de la valve fina	0,03
	Límite CV de la válvula fina	5%

[0089] El caudal de aire se ajusta a 2,0 SLPM; el caudal de CO₂ a 2,0 SLPM; el caudal de O₂ a 2,0 SLPM; el caudal de N₂ se ajusta a 2,0 SLPM y la tasa de purgado de gas total debería estar en 2,0 SLPM.

30 **[0090]** La MOI diana es 0,1 (intervalo 7×10^8 - 1×10^9 partículas de virus / biorreactor para descendencia de 300 L).

[0091] Para el criterio de recolección-I, el muestreo fuera de línea de las mediciones de dextrosa se toman comenzando el día 4 PI. La tendencia de la DO debería utilizarse como indicador. La Recolección-I debería realizarse cuando la dextrosas $\leq 0,1$ g/L (intervalo 2 días +/-), lo cual ocurre habitualmente entre los 5-7 días PI. Sin embargo, si se ha de realizar una segunda recolección, la Recolección-I se recomienda el primer día en el que la concentración de dextrosa es $\leq 0,1$ g/L.

[0092] Primera Re-Alimentación- RECOLECCIÓN-II: Después de la primera Recolección, re-alimentar el biorreactor con 270 - 280 L de composición de medio MEM sin Rojo Fenol, neomicina y 1,4 g/L de bicarbonato de sodio suplementado con 14,0 L de suero bovino fetal (al 5% v/v). La re-alimentación se realiza bajo las mismas condiciones que el ajuste del medio de la primera recolección (véanse los parámetros de la Primera Recolección anteriores). el control del pH se ha de mantener en un punto establecido de 7,2. Los parámetros PID utilizados para el valor elevado de pH (adición de CO₂) eran:

15	Ganancia	300,00
	Reajustar mins por cada repetición	2,20
	Tasa, minuto	0,50
	Unidades de pH de la valve fina	0,03
	Límite CV de la válvula fine	5%

[0093] El control de la temperatura permanece en un punto establecido de $36 \pm 1^\circ\text{C}$. El control de la DO se ajusta en el "Modo de Vigilancia".

[0094] Segunda Re-Alimentación - RECOLECCIÓN-III: Inmediatamente después de la segunda recolección, re-alimentar el biorreactor con 270 - 280 L de composición de medio MEM sin Rojo Fenol, neomicina y 1,4 g/L de bicarbonato de sodio suplementado con 14,0 L de suero bovino fetal irradiado (al 5% v/v). La re-alimentación se realiza bajo las mismas condiciones que el ajuste del medio de la primera recolección (véanse los parámetros de la segunda recolección anteriores). el control del pH se ha de mantener en un punto establecido de 7,2. Los parámetros PID utilizados para el valor elevado de pH (adición de CO₂) eran:

30	Ganancia	300,00
	Reajustar mins por cada repetición	2,20
	Tasa, minuto	0,50
	Unidades de pH de la valve fina	0,03
	Límite CV de la válvula fine	5%

[0095] El control de la temperatura ha de permanecer en un punto establecido de $36 \pm 1^\circ\text{C}$. La DO se ajusta en el Modo de Vigilancia. Los resultados actuales del ensayo demuestran que el tiempo óptimo oscila entre los días 1 - 4 post re-alimentación para los fluidos virales de la tercera Recolección.

- 5 **[0096]** Debe entenderse que el proceso anterior es a modo de ejemplo y se puede modificar adicionalmente para aumentar el rendimiento y/o reducir los costes de poner en funcionamiento el bioprosesador. Por ejemplo, cambios en los parámetros pueden incluir, pero no se limitan a: reducir la concentración de suero para segunda y terceras recolecciones, reducir la densidad de siembra de células, añadir las células y la siembra al
- 10 mismo frasco y agitarlo, de manera que se pueda acortar la propagación del virus para la recolección I. También, se puede mejorar adicionalmente el rendimiento del virus mediante una re-alimentación más para una posible Recolección IV. Componentes de medio agotado de alimentación son, pero no se limitan a glucosa y glutamina

[0097] EJEMPLO 2

- 15 **[0098]** En un ejemplo específico, el PRRSV 94881 producido de acuerdo con el método arriba descrito se utilizó para determinar la eficacia del PRRSV 94881 en la vacunación de cerdos. En este estudio, cochinitos de 4 a 13 días de edad fueron vacunados intramuscularmente con una composición que comprendía $10^{7.6}$ TCID₅₀ en 2 ml (día 0 de estudio). El día 13, se destetó a los cochinitos y se les vigiló en cuanto a diversos
- 20 parámetros de la enfermedad hasta el día 90. Los parámetros del estudio incluían vigilar la viremia, la presencia de virus en los tejidos y las secreciones, observaciones clínicas, lesiones pulmonares y ganancia de peso.

- [0099]** Cada uno de los grupos de estudio: los vacunados, los centinelas y los controles se pesaron los días de estudio 0, 14, 28, 56 y 90. Se tomaron muestras de sangre
- 25 cada día alterno entre los días 0 y 14 y una vez a la semana hasta el día 90 tanto para el grupo vacunado como para los centinelas y una vez a la semana a lo largo de los periodos de estudio para los controles hasta el día 90.

[0100] Se tomaron frotis nasales, orales y faciales cada día alterno entre los días 0 y 14 y una vez a la semana hasta el día 56 tanto para el grupo vacunado como para los

centinelas y una vez a la semana a lo largo de los periodos de estudio para los controles hasta el día 56.

5 **[0101]** La necropsia se confirmó en el grupo vacunado en dos cerdos cada día alterno de los días 0 a 14 y una semana desde el día 14 al día 90 con el resto de los cerdos el día 90. En el grupo centinela 5 cerdos el día 56 permanecían el día 90. Grupo control 2 cerdos cada día alterno entre el día 0 y el día 14, una vez a la semana entre el día 14 y el día 56 y los cerdos restantes el día 90.

[0102] Cada día se realizaron observaciones clínicas.

10 **[0103]** La RT- PCR cuantitativa se realizó utilizando cebadores específicos de PRRSV europeo para muestras de frotis de la sangre, oral, fecal y nasal, así como lavados de los pulmones.

15 **[0104]** A partir de estos estudios los datos demostraron que los cochinitos mostraban una salud normal, excepto unos pocos cerdos que cojeaban. Post-mortem no había aspectos anormales en la necropsia, excepto que 1-2 animales mostraban signos de nódulos linfáticos inguinales suavemente ampliados. De manera importante, se observó que no existían lesiones pulmonares en el grupo vacunado.

20 **[0105]** La figura 6 muestra el porcentaje de animales virémicos en el grupo centinela en comparación con el grupo vacunado con una composición que contiene la cepa de virus del PRRS atenuada depositada con el N° de Acceso 11012502 en la ECACC, mostrando eficacia del virus del PRRS producido de acuerdo con los métodos de la invención en proporcionar inmunidad protectora a cerdos.

[0106] EJEMPLO 3

[0107] El siguiente equipo y reactivos (Tabla 8) se utilizaron en el desarrollo del proceso en frasco rodante simultáneo para EU PRRS 94881:

25

Tabla 8: Equipo

Etapa del Proceso	Procedimiento	Equipo
Mantenimiento de células MA104 (pasos 58-78) y AK- MA104 (pasos 64-84) . Misma línea de células, diferentes pasos	Mantenimiento y ampliación, de acuerdo con los registros del proceso BPF-777 y BPF-778	Frascos rodantes de 850 cm ² (CORNING)
Recuento de células	Recuento automático	Célula Vi
Cultivo celular	Crecimiento de células	Frascos rodantes de 850 cm ² (CORNING) Sacudidor rodante e incubadora
Producción de Virus	Infección	
	Conc. de Dextrosa/Lactato g/L(± 5% de variación del ensayo)	YSI 2700
	Muestreo	pipetas

- [0108]** Medio MEM con Rojo Fenol y 1,4 g/L de bicarbonato de sodio se obtuvo de SAFC. La Tabla 9 describe la composición del Medio, más concentración del suero.
- 5 este medio se utilizó para propagar el virus, incluidas todas las re-alimentaciones de frascos rodantes.

Tabla 9: Composición del Medio MEM.

Catálogo/Artículo n°	Componente	Número de lote	Cantidad por frasco rodante
700754	Suero bovino fetal gamma irradiado, US	10D837	20 mL (5% v/v)
62892-1000M3056	MEM con Rojo Fenol	10L259	400 mL

- [0109]** Proceso simultáneo con tres recolecciones:
- 10 **[0110]** El proceso simultáneo añadía medio con suero, células AK- MA104 y siembra de virus EU PRRS 94881 en un recipiente. Luego, se mezcló el contenido del recipiente y se dispensó a los frascos rodantes (TOI igual a cero los días PP). La figura 7 ilustra el método del proceso simultáneo y la figura 8 ilustra la definición del proceso y las secuencias temporales.
- 15 **[0111]** Frasco Rodante y Preparación del Medio:
- [0112]** El experimento presentado aquí era una tanda de 5 frascos rodantes. El tamaño real de la tanda puede variar.

[0113] Bajo condiciones asépticas se añadieron a un recipiente 2000 mL de medio MEM y 100 mL de suero bovino fetal irradiado. Luego se añadieron 5×10^7 células AK-MA104 y siembra de virus EU PRRS a una MOI de 0,1. Estos materiales se mezclaron y, bajo condiciones asépticas se dispensaron aproximadamente 400 mL por cada frasco rodante de 850 cm² Corning. Los frascos rodantes se incubaron luego a 37°C en un sacudidor rodante a una velocidad de 0,5 rpm. Se realizaron hasta tres recolecciones con dos re-alimentaciones de medio.

[0114] Criterio para la Recolección y Potencia Aceptable:

[0115] Los criterios para recolectar los frascos rodantes se basaron en el punto establecido/ objetivo para los parámetros críticos del proceso en el biorreactor de 300 L validado de los Ejemplos 1 y 2, tal como se muestra en la Tabla 10 que figura más abajo.

[0116] La recolección-I se realizó los días 5 -7 PI y el nivel de dextrosa era $\leq 0,1$ g/L. La recolección II tuvo lugar el día 2 PI después de la re-alimentación y la recolección III el día 2 PI después de la segunda re-alimentación.

[0117] La potencia de las tres recolecciones de los frascos rodantes debería ser $\geq 10^{5,5}$ TCID₅₀/mL.

Tabla 10: Criterios de recolección/potencia aceptable para EU PRRS 94881 MLV

Parámetro	Diana Aceptable
Tiempo de la 1ª Recolección (Días post- infección)	Día 5 – 7 PI
Nivel de dextrosa a la 1ª recolección	0,1 g/L
Tiempo de 2ª Recolección (Días post re-alimentación)	2
Tiempo de 3a Recolección (Días post re-alimentación)	2
Potencia	$\geq 10^{5,5}$ TCID ₅₀ /mL

[0118] *Parámetros críticos son aquellos parámetros que son críticos para los atributos de calidad del producto final

[0119] OPERACIONES CON FRASCOS RODANTES**Tabla 11:** Experimento inicial para el desarrollo del EU PRRS 94881 del proceso simultáneo de frascos rodantes y resultados de los títulos

Frasco rodante código	Densidad de siembra de células por cada FR	MOI	H- I + re-alimentación	Dextrosa g/L	TCID ₅₀ por mL	H-II + re-alimentación	TCID ₅₀ por mL	H-III Final	TCID ₅₀ por mL
A	3,5 x 10 ⁶	0,1	5PI	0,304	≤ 5,5	7PI	6,5	9PI	≤ 6,0
B	3,5 x 10 ⁶	0,1	6PI	0,048	6,5	8PI	6,6	10PI	≤ 5,7
C	3,5 x 10 ⁶	0,1	7PI	0,006	≤ 5,5	9PI	≤ 6,3	11PI	6,7
D	3,5 x 10 ⁶	0,005	5PI	N/E	≤ 5,6	7PI	6,5	9PI	≤ 5,5
E	3,5 x 10 ⁶	0,005	6PI	0,057	≤ 5,5	8PI	≤ 5,5	10PI	7,4
F	3,5 x 10 ⁶	0,005	7PI	0,0	≤ 5,5	9PI	≤ 5,5	11PI	≤ 5,5
G	7 x 10 ⁶	0,1	5PI	0,066	6,6	7PI	6,9	9PI	≤ 6,3
H	7 x 10 ⁶	0,1	6PI	0,009	6,5	8PI	7,3	10PI	6,7
I	7 x 10 ⁶	0,1	7PI	0	≤ 6,2	9PI	7,0	11PI	6,6
J	1 x 10 ⁷	0,1	5 PI	0,095	6,9	7 PI	6,6	9 PI/10 PI	≤ 6,3/6,7
K	1 x 10 ⁷	0,1	6 PI	0	7,3	8 PI	7,5	10 PI/11 PI	6,5/6,6
L	1 x 10 ⁷	0,1	7 PI	0	7,7	9 PI	≤ 5,5	11 PI/12 PI	7,2/6,6
M	1 x 10 ⁷	0,005	5PI	0,118	≤ 5,6	7PI	7,5	9PI	≤ 6,0
N	1 x 10 ⁷	0,005	6PI	0,014	7,0	8PI	6,7	10PI	6,7
O	1 x 10 ⁷	0,005	7PI	0	6,7	9PI	7,3	11PI	6,7
Experimento control: Proceso convencional de frasco rodante para EU PRRS 94881									
Frasco rodante código	Densidad de Siembra de Células	TOI	MOI	Recolección I + re-alimentación	TCID ₅₀ por mL	Recolección II + re-alimentación	TCID ₅₀ por mL	Recolección III Final	TCID ₅₀ por mL
P	2 x 10 ⁷	3 días	0,005	3PI	6,7	6PI	7,4	9PI	6,9
Q	2 x 10 ⁷	3 días	0,005	4PI	6,7	7PI	7,7	10PI	6,7
R	2 x 10 ⁷	3 días	0,005	5PI	7,0	8PI	7,2	11PI	6,6
S	2 x 10 ⁷	Al cabo de 3 días, se hizo un recuento de las células para el cálculo de MOI para los FRs P, Q y R							

[0120] La Tabla 11 muestra el experimento inicial diseñado para definir el proceso simultáneo en frasco rodante basado en los siguientes parámetros a partir del proceso descrito en los Ejemplos 1 y 2 y los informes del virus de siembra de trabajo mostrados en la Tabla 12a.

5 **Tabla 12a:** Parámetros evaluados para definir el proceso simultáneo en frasco rodante

parámetros	intervalo	información
Densidad de siembra de células por cada FR de 850cm ²	3,5 x 10 ⁶	bajo intervalo de siembra de células
	7,0 x 10 ⁶	Intervalo medio de siembra de células
	1,0 x 10 ⁷	Equivalente a FR de 300 L basado en células/mL
MOI	0,005	Proceso convencional en FR
	0,1	[00100] MOI diana para proceso en FR de 300 L

[0121] Quince frascos rodantes fueron sembrados con células MA-104 a densidades de siembra de células que oscilan entre 3,5 x 10⁶ y 1 x 10⁷ (véase la Tabla 11 columna 2). Los frascos rodantes fueron marcados por orden alfabético. Conjuntos de tres frascos rodantes tenían la misma densidad de siembra de células y el mismo MOI que oscilaba entre 0,005 y 0,1 (Tabla 11, tercera columna).

[0122] Se evaluaron tres densidades de siembra de células y dos MOIs (Tabla 12). Conjuntos de tres frascos rodantes tenían la misma densidad de siembra de células y el mismo MOI (Tabla 4, columna 1). Los frascos rodantes se ajustaron de acuerdo con la preparación del frasco rodante y del medio arriba descrita y se incubaron en un sacudidor rodante a una velocidad de 0,5 RPM a 37°C en incubadora.

[0123] La recolección I de los frascos rodantes A, D, G, J y M se produjo el día 5 PI, y luego se re-alimentaron y se incubaron durante dos días. Luego se realizó la R-II, los frascos rodantes se re-alimentaron e incubaron y se realizó una tercera recolección y final dos días más tarde.

- [0124]** La R-I de los frascos rodantes B, E, H, K y N se produjo el día 6 PI, y luego se re-alimentaron y se incubaron durante dos días. Luego se realizó la R-II; los frascos rodantes se re-alimentaron una vez más y se re-incubaron. Una tercera recolección y final dos días más tarde.
- 5 **[0125]** Finalmente, la R-I de los frascos rodantes C, F, I, L y O se produjo el día 7 PI, y luego se re-alimentaron y se incubaron durante dos días. Luego se realizó la R-II, los frascos rodantes se re-alimentaron y re-incubaron y se realizó una tercera recolección y final dos días más tarde.
- 10 **[0126]** El proceso convencional en frascos rodantes (frascos rodantes P, Q, R y S) se utilizó como un control para este experimento. Este proceso se desarrolló con dos recolecciones. La tercera recolección se añadió al proceso en estos experimentos, así como el intervalo de recolección-I de hasta 5 días PI.
- 15 **[0127]** Células MA104 se sembraron en frascos rodantes de 850cm² a razón de 2×10^7 y se incubaron durante 3 días (frascos rodantes P, Q, R y S). Al cabo de tres días, el frasco rodante S se tripsinizó y las células se recontaron mediante Vi-cell. El recuento de células se utilizó para el cálculo del MOI del virus para los FRs P, Q y R. La cantidad calculada de virus se añadió a los frascos rodantes que se incuban a 37°C en un sacudidor rodante. Al cabo de 3 días, se realiza la recolección-I en el frasco rodante P, que luego fue re-alimentado e incubado a 37°C. Después de 3 días, se obtuvo una
20 segunda recolección, y se re-alimentó una segunda vez y se incubó durante 3 días adicionales para una recolección tercera y final.
- [0128]** Los frascos rodantes Q y R siguieron el mismo proceso después de la R-I, el día 4 PI para el FR Q y 5 PI para el FR R.
- 25 **[0129]** El proceso convencional en frascos rodantes es más largo que el proceso simultáneo descrito en los Ejemplos 1 y 2 y requiere más trabajo, ya que las células necesitan crecer durante 3 días antes de ser infestadas con el virus. También, requiere el doble de la densidad de siembra de las células cuando se compara con el proceso simultáneo, pero una MOI más baja. Este proceso proporcionó altos títulos consistentes para las tres recolecciones.

[0130] Se decidió que el tiempo de recolección R-I (TOH) para el proceso simultáneo se basara sólo en los días diana, independientemente del consumo de dextrosa. Se tomaron muestras para medir la dextrosa y el título los días de recolección.

[0131] En base a los criterios para el título aceptable de potencia (Tabla 10), los
5 frascos rodantes A, B, C, D, E y F mostraron títulos inconsistentes para las recolecciones I, II y III.

[0132] Los frascos rodantes G, H e I con una densidad de siembra de las células de 7×10^6 y una MOI diana de 0,1 tenían un nivel de dextrosa en la primera recolección dentro del objetivo de $\leq 0,1$ g/L. Los resultados de los títulos para los
10 frascos rodantes G y H eran aceptables. Para la recolección-II, todos los frascos rodantes G, H e I tenían títulos de logs alto 6 y bajo 7. Para la recolección-III, los frascos rodantes G y H eran aceptables con títulos de 6,6 y 6,5, respectivamente. Para la mayoría del conjunto de recolecciones G, H e I eran aceptables.

[0133] El siguiente experimento J, K y L era el más prometedor en términos de
15 títulos. La dextrosa se consumió en la R-I para todos los FRs y el título dentro de criterios aceptables en base a la Tabla 10. En las segunda y tercera recolecciones los títulos también cumplían los criterios en la Tabla 3, excepto para dos frascos rodantes. La R-III para los FRs J, K y L se extendió durante un día más, demostrando que los títulos seguían siendo aceptables. (Tabla 11)

[0134] Los últimos frascos rodantes M, N y O tenían una elevada densidad de
20 siembra de células y una MOI baja mostraba resultados de títulos consistentes para los frascos rodantes N y O.

Tabla 12b: Comparación de parámetros entre el proceso simultáneo en frascos rodantes y el proceso en biorreactor

Parámetro	biorreactor de 300 L	Conjunto de frascos rodantes J, K y L
Volumen de trabajo de medio más suero en mL	283500	400
Densidad de siembra de células/mL	$2,53 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
MOI	0,1	0,1

[0135] En base a la Tabla 10, los resultados de los frascos rodantes J, K y L TCID₅₀/mL mostrados en la Tabla 11, cumplieron todos los criterios para las recolecciones I, II y III. La relación de la densidad de siembra de células por mL en los frascos rodantes J, K y L son equivalentes a la densidad de siembra de células en el biorreactor por mL (Tabla 6) para el de 300 L. En base a estos datos, los parámetros para los frascos rodantes J, K y L eran los elegidos para una operación de confirmación (Tabla 13).

Tabla 13: Establecimiento de la operación de confirmación en el proceso simultáneo en frascos rodantes y concentración de dextrosa en la recolección-I

Frasco rodante código	Densidad de siembra de células/FR	MOI	Recolección I + re-alimentación	dextrosa g/L a TOH	H II + re-alimentación	H III Final
J1	1×10^7	0,1	5PI	0,080	7PI	9PI
J2	1×10^7	0,1	5PI	0,128	7PI	9PI
J3	1×10^7	0,1	5PI	0,066	7PI	9PI
J4	1×10^7	0,1	5PI	0,076	7PI	9PI
J5	1×10^7	0,1	5PI	0,128	7PI	9PI
K1	1×10^7	0,1	6PI	0,137	8PI	10PI
K2	1×10^7	0,1	6PI	0,058	8PI	10PI
K3	1×10^7	0,1	6PI	0,100	8PI	10PI

K4	1×10^7	0,1	6PI	0,088	8PI	10PI
K5	1×10^7	0,1	6PI	0,087	8PI	10PI
L1	1×10^7	0,1	7PI	0,005	9PI	11PI
L2	1×10^7	0,1	7PI	0,006	9PI	11PI
L3	1×10^7	0,1	7PI	0,0	9PI	11PI
L4	1×10^7	0,1	7PI	0,013	9PI	11PI
L5	1×10^7	0,1	7PI	0,004	9PI	11PI

[0136] La Tabla 13 muestra la tanda de confirmación para el proceso simultáneo elegido evakuado en la Tabla 10.

[0137] Se ajustó un total de 15 frascos rodantes a una densidad de siembra de células de 1×10^7 cada una en 400 mL de medio con suero y siembra de EU PRRS 94881 MSV+4 a una MOI de 0,1. Los frascos rodantes se dividieron en 3 grupos de 5. La recolección-I se realizó el día 5 PI para los FRs J1 a J5, el día 6 PI para K1 a K5 y el día 7 PI para L1 a L5. La dextrosa se midió para cada uno de los frascos rodantes. Después, las recolecciones se agruparon y se tomaron muestras para cada uno de los títulos. Subsiguientemente, se realizaron re-alimentaciones y recolecciones II y III final.

[0138] En la recolección-I, por término medio, todos los quince frascos rodantes tenían dextrosa dentro de criterios de recolección de $\leq 0,1\text{g/L}$ para el proceso de biorreactor (Tabla 3), que confirmó que el proceso es consistente en frascos rodantes.

Tabla 14: Sumario de las condiciones y resultados TCID₅₀ del proceso simultáneo en frasco rodante

Lote (agrupación de 5 frascos rodantes)	PCD	MOI	TOH 1	Dextrosa g/L a TOH1	TCID ₅₀ / mL H1	TOH2	TCID ₅₀ /mL H2d	TOH3	TCID ₅₀ / mL H3
J	$1,0 \times 10^7$	0,1	5PI	0,092	6,5	7PI	7,3	9PI	6,5
K	$1,0 \times 10^7$	0,1	6PI	0,084	6,7	8PI	7,6	10PI	6,7
L	$1,0 \times 10^7$	0,1	7PI	0,000	6,5	9PI	7,7	11PI	7,4

[0139] La Tabla 14 muestra un resumen de las condiciones y los títulos de virus en TCID₅₀ /mL para la agrupación de frascos rodantes J, K y L para R-I, R-II y R-III para el proceso simultáneo en frascos rodantes de la presente invención.

[0140] Para imitar el proceso en frascos rodantes, se agruparon muestras de cada uno de los frascos rodantes individuales para el conjunto J (Tabla 13) y la muestra agrupada para el título. El mismo proceso se aplicó a los frascos rodantes K y L para R-I, R-II y R-III.

[0141] La dextrosa para las muestras de la agrupación R-1 eran 0,0 g/L para J, K y L. Los títulos para R-I, R-II y R-III oscilan de 6,5 a 7,7 que es equiparable al proceso en el biorreactor de 300 L. (Tabla 15)

Tabla 15: Resumen de las condiciones y resultados de TCID₅₀/mL del proceso simultáneo validado en FR de 300 L*

Lote	PCD	MOI	TOH1	Dextrosa g/L a TOH1	TCID50/mL H1	TOH2	TCID50/mL H2d	TOH3	TCID50/mL H3
021610 PD	7,2 x 10 ⁹	0,1	5PI	0,0	7,5	7PI	7,5	9PI	6,7
030110 PD	7,2 x 10 ⁹	0,1	6PI	0,0	7,3	8PI	7,4	10PI	7,4
031510 PD	7,2 x 10 ⁹	0,1	7PI	0,0	7,5	9PI	6,7	11PI	7,4

*muestras contienen SGS como estabilizador

[0142] La Tabla 15 muestra los parámetros y los títulos en TCID₅₀/mL para las tres tandas de validación realizadas bajo condiciones de cGMP. Los tres lotes tenían la misma densidad de células de siembra y la misma MOI. La dextrosa era 0,0 g/L en la recolección I para los tres lotes. Todas las recolecciones tenían resultados dentro de criterios de aceptación.

[0143] Intervalo de densidad de células de siembra (PCD) para frasco rodante:

[0144] La densidad de células de siembra (PCD) es 1,0 x 10⁷ células totales por cada frasco rodante con un volumen de trabajo de 400 mL. Para el intervalo bajo 7 x 10⁶ se evaluó (Tabla 4) asimismo con títulos aceptables. El intervalo alto fue evaluado en el proceso convencional (Tabla 11).

[0145] Intervalo de la multiplicidad de infección (MOI) para frascos rodantes:

[0146] La MOI diana de 0,1 es ideal para la propagación de EU PRRS 94881 dentro de este sistema de crecimiento. Los niveles bajo y alto de la MOI de 0,01 y 0,3, respectivamente, se examinaron en los biorreactores de 30 L. En el frasco rodante, debido a limitaciones en el tiempo, sólo se evaluaron las dianas 0,1 MOI y 0,005 MOI (Tabla 10).

[0147] Análisis

[0148] Los parámetros recomendados del procesos simultáneo en los frascos rodantes se esbozan en la Tabla 16. Solamente se testaron parámetros diana y se consideraron por si eran críticos o no críticos para el proceso. Las definiciones son como sigue: Parámetros críticos son aquellos parámetros que son críticos para los atributos de calidad del producto final y parámetros no críticos son aquellos parámetros que se pueden controlar directamente dentro del intervalo definido o que tienen un amplio intervalo operativo, de modo que una desviación desde el punto establecido no es crítica. Parámetros no críticos ayudan a controlar los parámetros críticos dentro del intervalo definido.

Tabla 16: Sumario de los parámetros del proceso simultáneo en frascos rodantes para EU PRRS 94881 MLV.

Parámetro	Límite Inferior Testado	Límite Superior Testado	Intervalo aceptable	Diana	Crítico/N o Crítico
MOI	0,005	0,1@	0,005 -0,3y	0,10	NC
Densidad de siembra de células por cada frasco rodante	7×10^6 células	$2,0 \times 10^7$ células n°	$7,0 \times 10^6$ células a $2,0 \times 10^7$ células	$1,0 \times 10^7$ células	NC
Tiempo de la 1ª Recolección (Días post-infección)	Día 5	Día 7	Día 5 – Día 7 PI	Día 5 – 7 PI	Crítico **
Temperatura	NE	37°C	36 + 1°C	36 °C	NC
Tiempo de 2ª Recolección (Días post re-	Día 2	Día 2	NE	2	Crítico

alimentación)					
Tiempo de 3a Recolección (Días post re-alimentación)	Día 2	Día 2	2-3	2	Crítico

** El criterio de primera-Recolección se decide por el tiempo del consumo completo de dextrosa en el periodo de 5-7 días PI.

basado en el proceso convencional en frascos rodantes

@ testado en la escala del biorreactor de 30 L, 300 L y frasco rodante

5 & testado en la escala del biorreactor de 30 L

[0149] Conclusiones

[0150] El desarrollo del proceso simultáneo en frasco rodante se consiguió con éxito y es equivalente al proceso en biorreactor descrito anteriormente en términos de potencia medida como TCID₅₀/mL. Los parámetros críticos para R-I, R-II y R-III en el
10 objetivo se reprodujeron con éxito en el proceso simultáneo en frascos rodantes.

[0151] Las realizaciones preferidas para el proceso simultáneo en frascos rodantes para EU PRRS 94881 MLV son como sigue para la propagación del virus, RECOLECCIÓN-I: La composición del medio MEM con 1,4 g/L de bicarbonato de sodio; Células de siembra a 1×10^7 / frasco rodante de 850 cm² Corning con 400 mL de
15 medio suplementado con 20 mL de suero bovino fetal al 5% v/v (intervalo: 7×10^6 - 2×10^7 /frasco rodante); Temperatura controlada a $36 \pm 1^\circ\text{C}$; la velocidad de sacudidor del frasco rodante es 0,5 RPM; y la MOI diana es 0,1.

[0152] Para el criterio de recolección-I, comenzar el muestreo para las mediciones de dextrosa fuera de línea el día 5 PI. La Recolección-I debería realizarse cuando la
20 dextrosa es $\leq 0,1$ g/L, lo cual ocurre habitualmente entre los 5-7 días PI. Sin embargo, si se ha de realizar una segunda recolección, re-alimentar primero RECOLECCIÓN II.

[0153] II. Primera Re-Alimentación- RECOLECCIÓN-II

[0154] Re-alimentar con 400 mL de composición de medio MEM, y 1,4 g/L de bicarbonato de sodio suplementado con 20 mL de suero de bovino fetal (al 5% v/v).
25 Realizar la re-alimentación bajo las mismas condiciones que el primer ajuste del medio de recolección (véanse los parámetros de primera recolección anteriores). El control de la temperatura ha de permanecer en un punto establecido de $36 \pm 1^\circ\text{C}$. La velocidad de

sacudidor del frasco rodante es 0,5 RPM. La segunda recolección de fluidos virales se produce el día 2 post-re-alimentación.

[0155] III. Segunda Re-Alimentación - RECOLECCIÓN-III:

[0156] Re-alimentar con 400 mL de composición de medio MEM, neomicina y 1,4
5 g/L de bicarbonato de sodio suplementado con 20 mL de suero de bovino fetal
irradiado (al 5% v/v). Realizar la re-alimentación bajo las mismas condiciones que el
ajuste del medio de la primera recolección (véanse los parámetros de la segunda
recolección anteriores). El control de la temperatura ha de permanecer en un punto
establecido de $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$. La velocidad de sacudidor del frasco rodante es 0,5 RPM. La
10 tercera recolección de fluidos virales se produce el día 2 post-re-alimentación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción a escala comercial de virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV), que comprende:

5 a) al mismo tiempo, sembrar un medio de cultivo a gran escala con una línea de células de mamífero que es permisiva a una infección por el PRRSV en un biorreactor e infestar dichas células de mamífero con un PRRSV;

b) propagar el virus durante 5 a 7 días post-infección;

c) llevar a cabo una primera etapa de recolección separando el medio de dicho biorreactor y aislar del mismo el virus propagado;

10 d) reponer el medio en dicho biorreactor y propagar el virus durante 1 a 4 días;

c) llevar a cabo una segunda etapa de recolección separando el medio de dicho biorreactor y aislar del mismo el virus propagado;

15 f) reponer el medio en dicho biorreactor y propagar el virus durante 1 a 4 días; y

g) llevar a cabo una tercera etapa de recolección separando el medio de dicho biorreactor y aislar del mismo el virus propagado.

2. El método de la reivindicación 1 que comprende, además, al menos una etapa de re-alimentación y de recolección subsiguientes a la tercera etapa de recolección, que comprende reponer el medio en dicho biorreactor y propagar el virus durante 1 a 4 días, y realizar una cuarta etapa de recolección separando el medio de dicho biorreactor y aislando del mismo el virus propagado.

3. El método de la reivindicación 1, en el que la multiplicidad de infección (MOI) diana es 0,01 a 0,30 y la densidad de siembra de células.

25 4. El método de la reivindicación 1, en el que dichas células de mamífero se siembran a una densidad de aproximadamente 7×10^8 a $1,0 \times 10^9$ por cada biorreactor de 300 L.

5. El método de la reivindicación 4, en el que dicha densidad de siembra de células es aproximadamente $1,0 \times 10^9$ por cada biorreactor de 300 L.
6. El método de la reivindicación 5, en el que dicha MOI es aproximadamente 7×10^8 partículas de virus.
- 5 7. El método de la reivindicación 1, que comprende vigilar la concentración de dextrosa de dicho medio, en el que dicha primera etapa de recolección se realiza el primer día cuando la concentración de dextrosa del medio disminuye a menos de 0,1 g/L.
8. El método de la reivindicación 1, en el que dicha segunda recolección se realiza 1 ó 2 días post-re-alimentación con medio.
- 10 9. El método de la reivindicación 1, en el que dicha tercera recolección se realiza 1 a 4 días post la segunda re-alimentación con medio.
10. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo se añade al biorreactor el día antes de o el mismo día antes de la adición de dicha línea de células de mamífero y dicho PRRS.
- 15 11. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo se añade al biorreactor un día antes de o el mismo día antes de la adición de dicha línea de células de mamífero y dicho PRRS.
12. El método de la reivindicación 1, en el que la temperatura de dicho biorreactor se ajusta entre 34°C y 38°C.
- 20 13. El método de la reivindicación 1, en el que dicho medio comprende suero de ternero fetal irradiado al 5% v/v.
14. El método de la reivindicación 1, en el que dicho PRRS se selecciona del grupo consistente en la cepa 94881 de PRRSV, VR 2332, la cepa del virus Lelystad (Agente Lelystad (CDI-NL-2.91), u otras cepas tales como las depositadas bajo los
- 25 Números de Acceso ECACC 04102703, ECACC 04102702, ECACC 04102704, N° de Acceso ante CNCM I-1140, N° de Acceso ante CNCM I-1387, N° de Acceso ante CNCM I-1388, ATCC VR 2332, VR 2385, VR 2386, VR 2429, VR 2474 y VR 2402; CNCM I-1102, CNCM I-1140, CNCM I-1387, CNCM I-1388 o ECACC V93070108; depósito

ATCC VR-2332, depósito ATCC VR-2368; ATCC VR-2495; ATCC VR 2385, ATCC VR 2386, ATCC VR 2429, ATCC VR 2474 y ATCC VR 2402.

15. Un método de producción a escala comercial para la preparación de un PRRSV, que comprende:

5 a. una siembra simultánea tanto de células de mamífero permisivas a la infestación por dicho PRRSV como de dicho PRRSV en un biorreactor que contiene un medio adecuado para el crecimiento de dichas células; y

 b. realizar tres etapas consecutivas de recolección, en donde se recolecta PRRSV, en donde, después de cada una de las primera y segunda recolecciones,
10 se repone el medio, y en donde:

 i. la primera recolección se realiza el primer día en el que la concentración de dextrosa del medio desciende a menos de 0,1 g/L;

 ii. la segunda recolección se realiza 1 ó 2 días después de la adición del medio tras la primera recolección; y

15 iii. la tercera recolección se realiza entre 1 y 4 días después de la adición del medio tras la segunda recolección.

16. Un PRRSV MLV que comprende un PRRSV producido de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 formulado con un adyuvante o soporte aceptable para el suministro a un cerdo.

20 17. Un método para la producción a escala comercial de virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRSV), que comprende:

 a) al mismo tiempo, sembrar un medio de cultivo a gran escala con una línea de células de mamífero que es permisiva a una infección por el PRRSV en frascos rodantes e infestar dichas células de mamífero con un PRRSV;

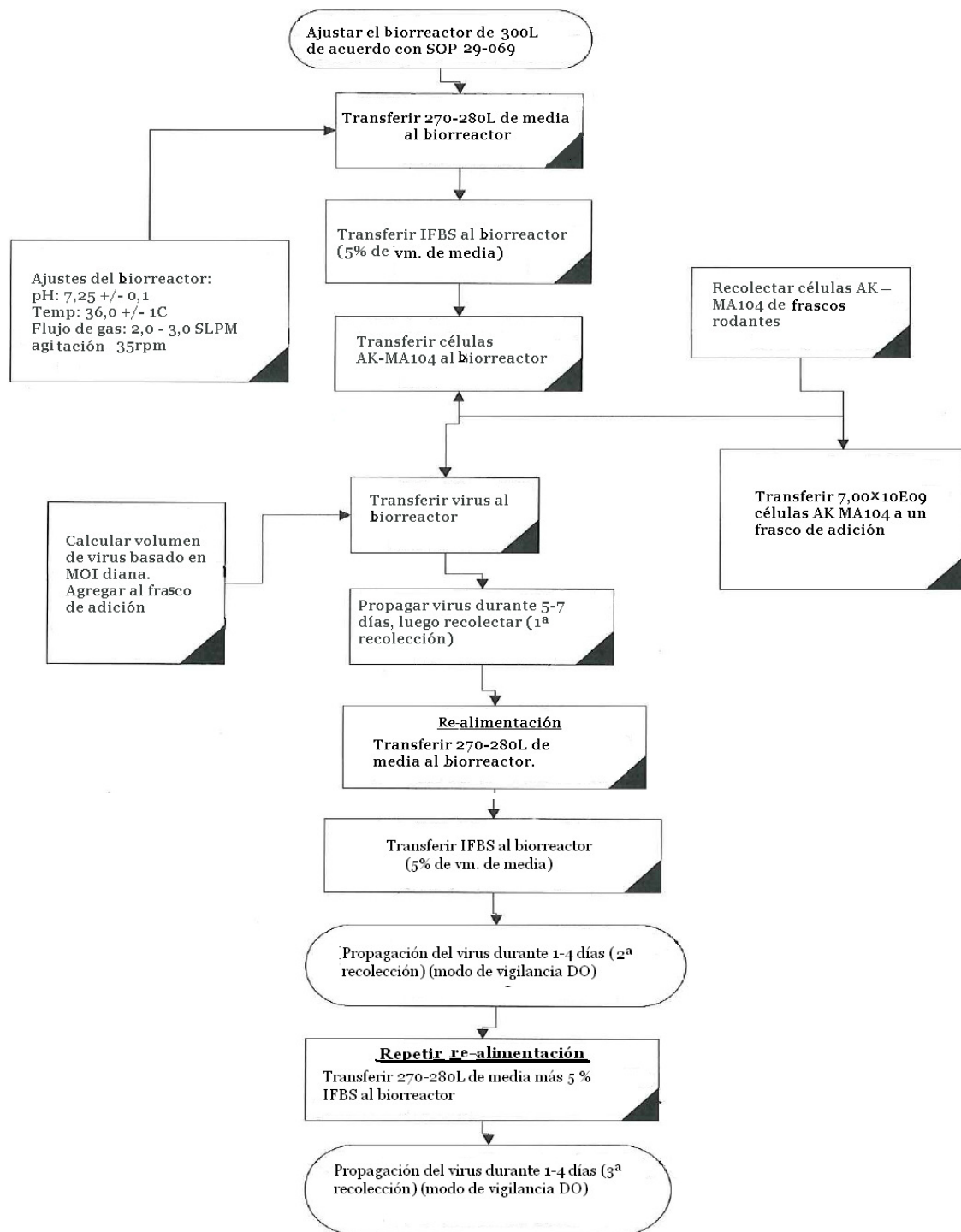
25 b) propagar el virus durante 5 a 7 días post-infección;

 c) llevar a cabo una primera etapa de recolección separando el medio de dicho frasco rodante y aislar del mismo el virus propagado;

- d) reponer el medio en dicho frasco rodante y propagar el virus durante aproximadamente 2 días;
- c) llevar a cabo una segunda etapa de recolección separando el medio de dicho frasco rodante y aislar del mismo el virus propagado;
- 5 f) reponer el medio en dicho frasco rodante y propagar el virus durante aproximadamente 2 días; y
- g) llevar a cabo una tercera etapa de recolección separando el medio de dicho biorreactor y aislar del mismo el virus propagado.

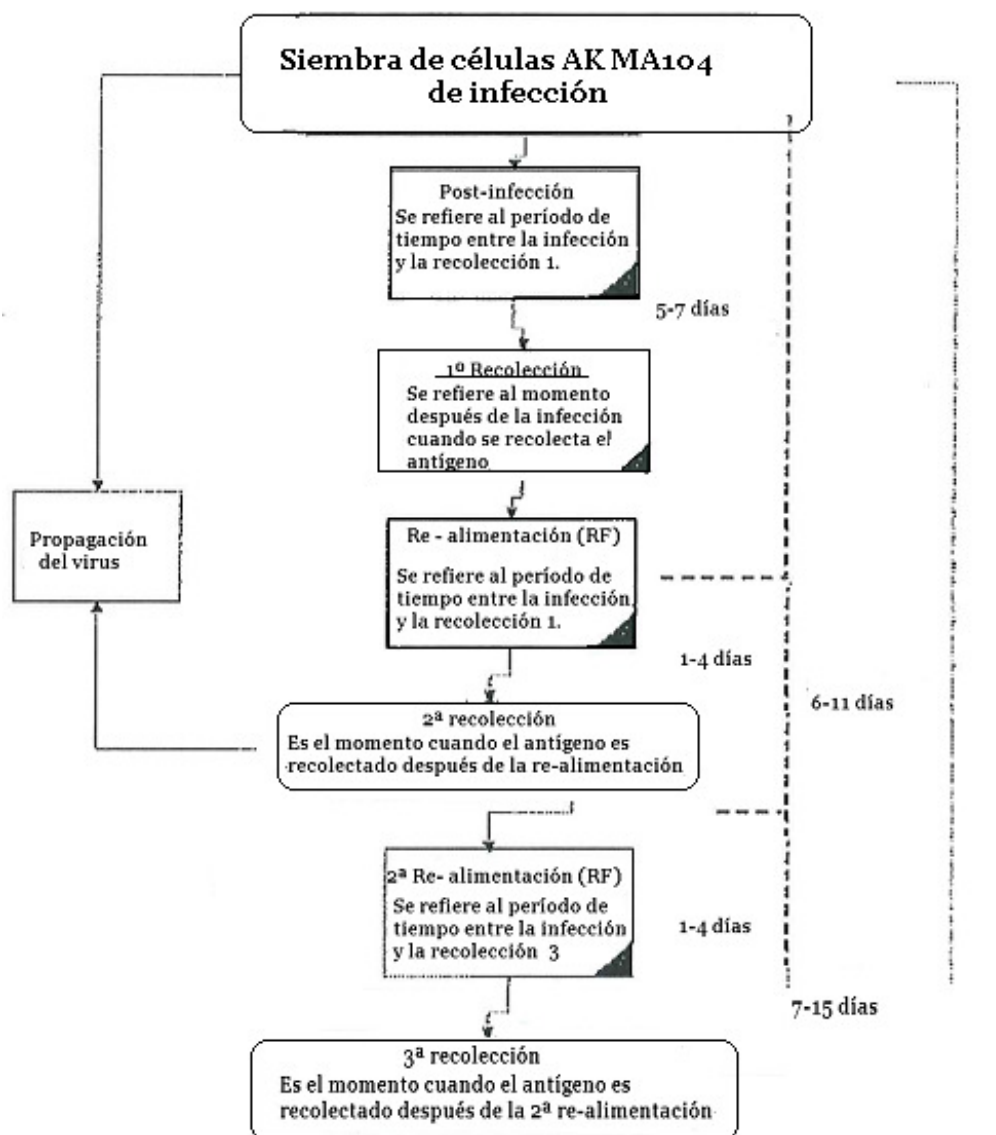
1/8

FIG 1



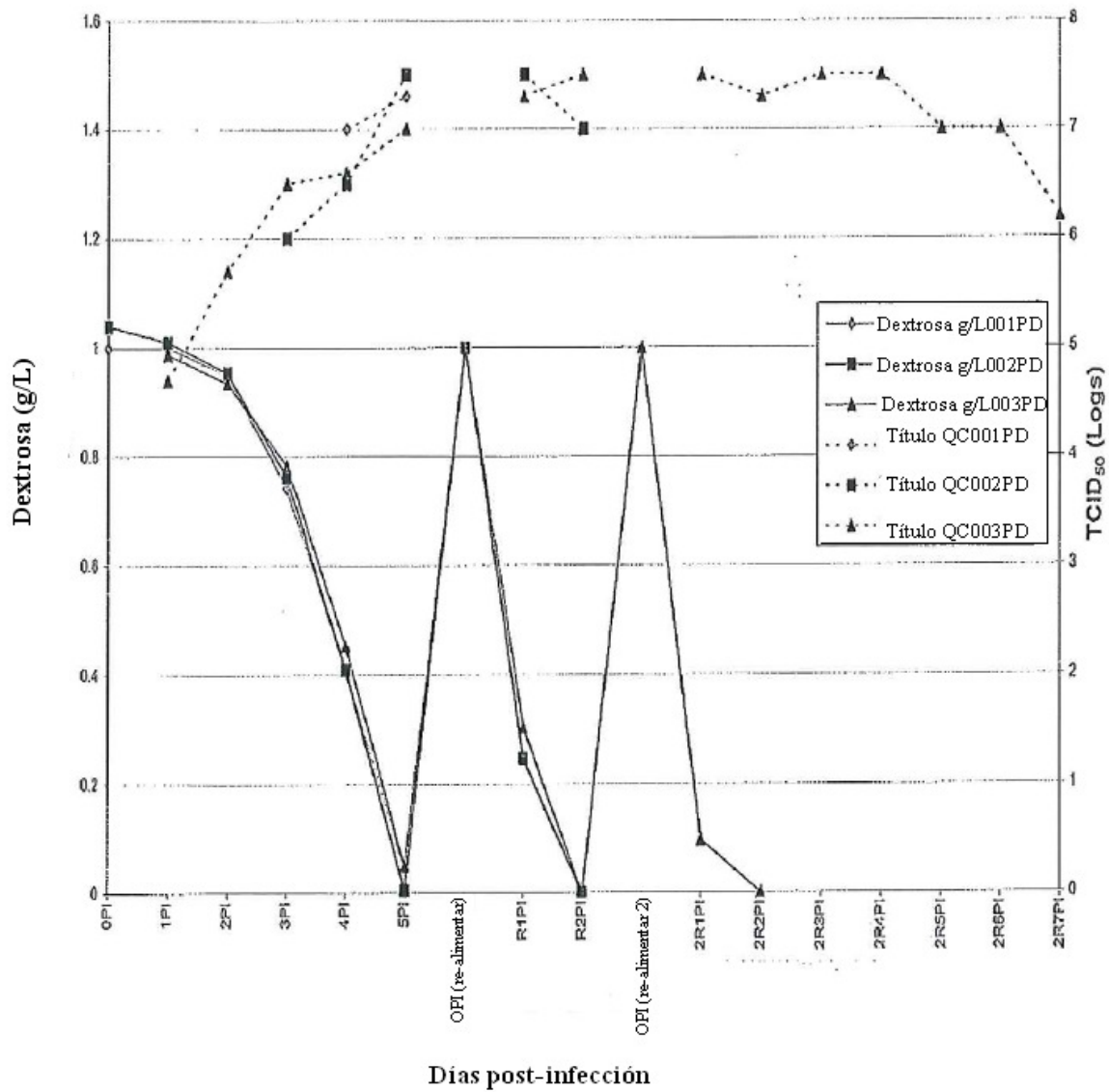
2/8

FIG 2



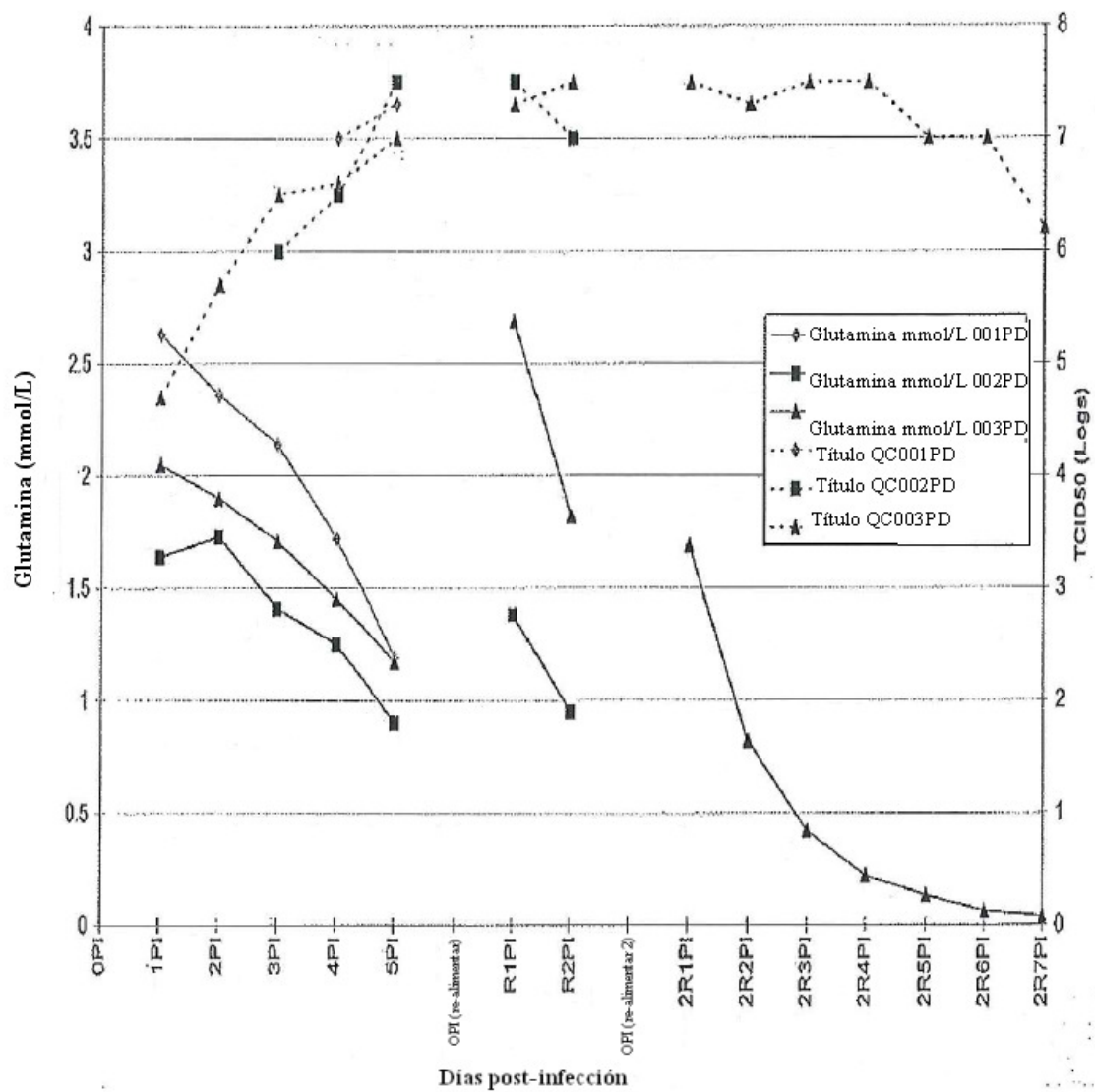
3/8

FIG 3



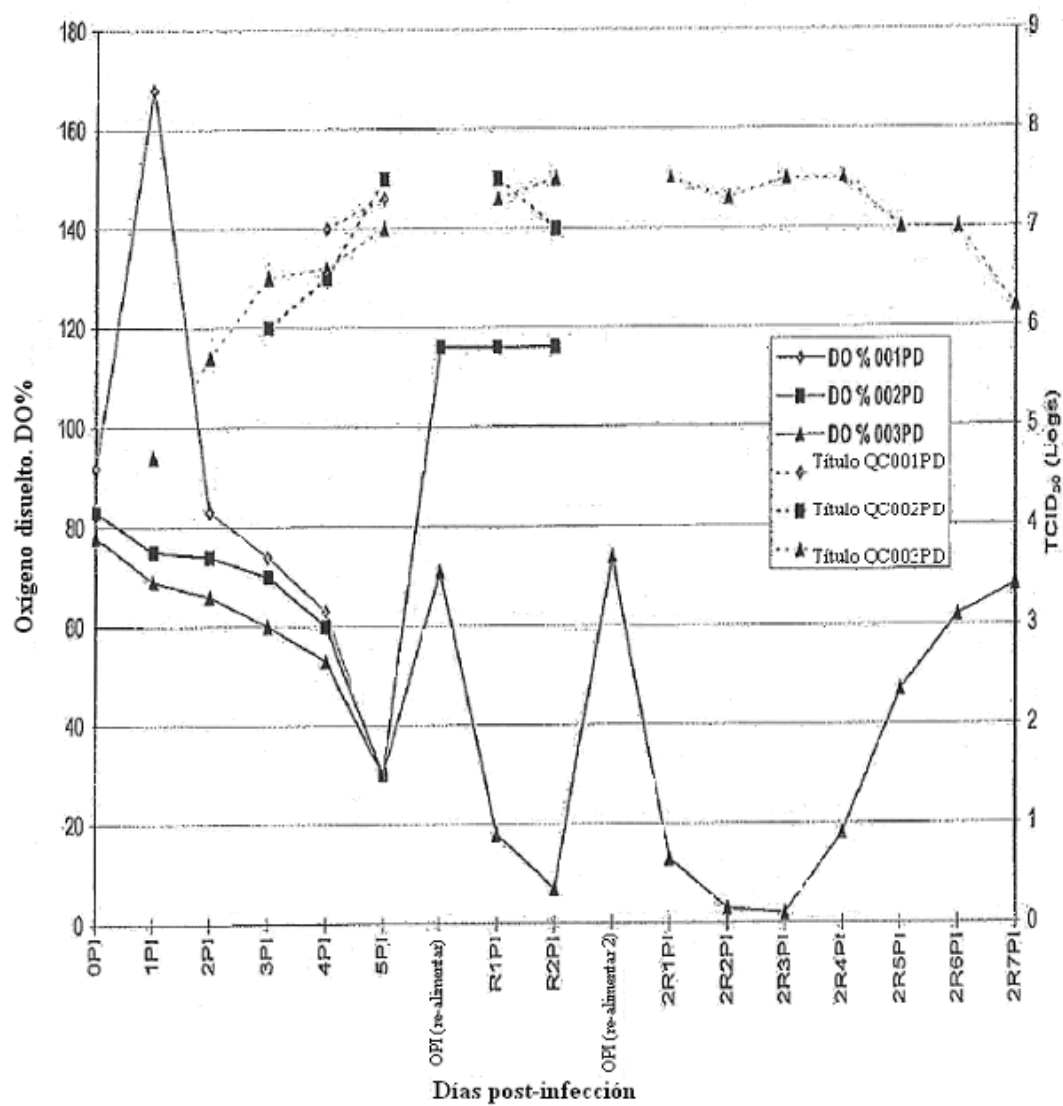
4/8

FIG 4



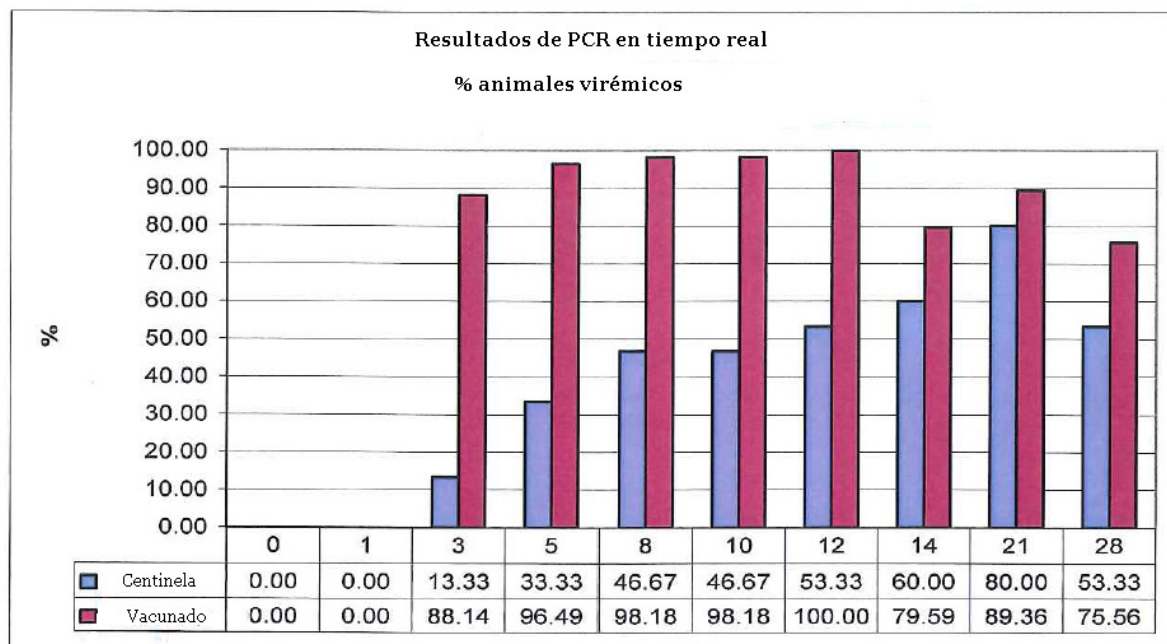
5/8

FIG 5



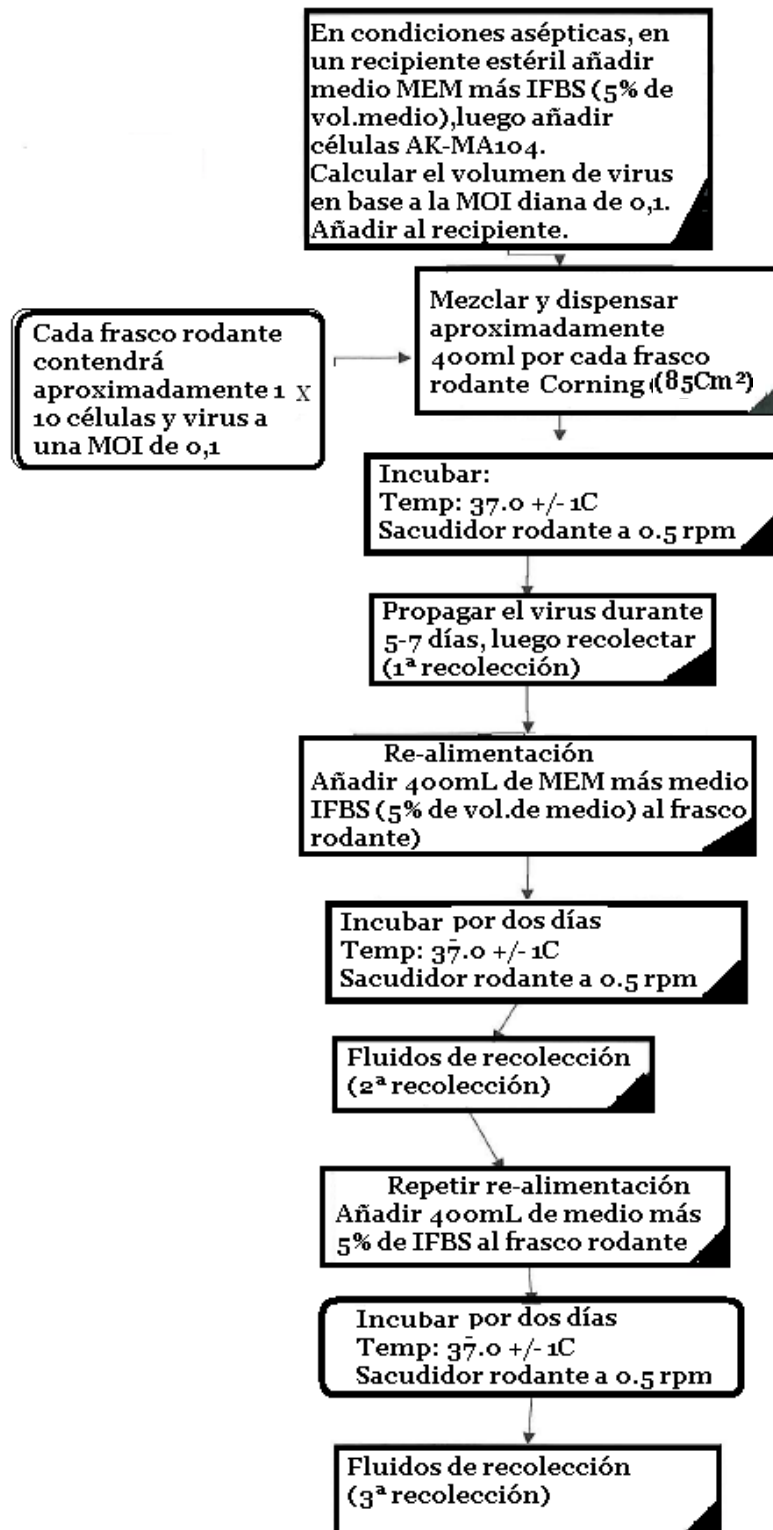
6/8

FIG 6



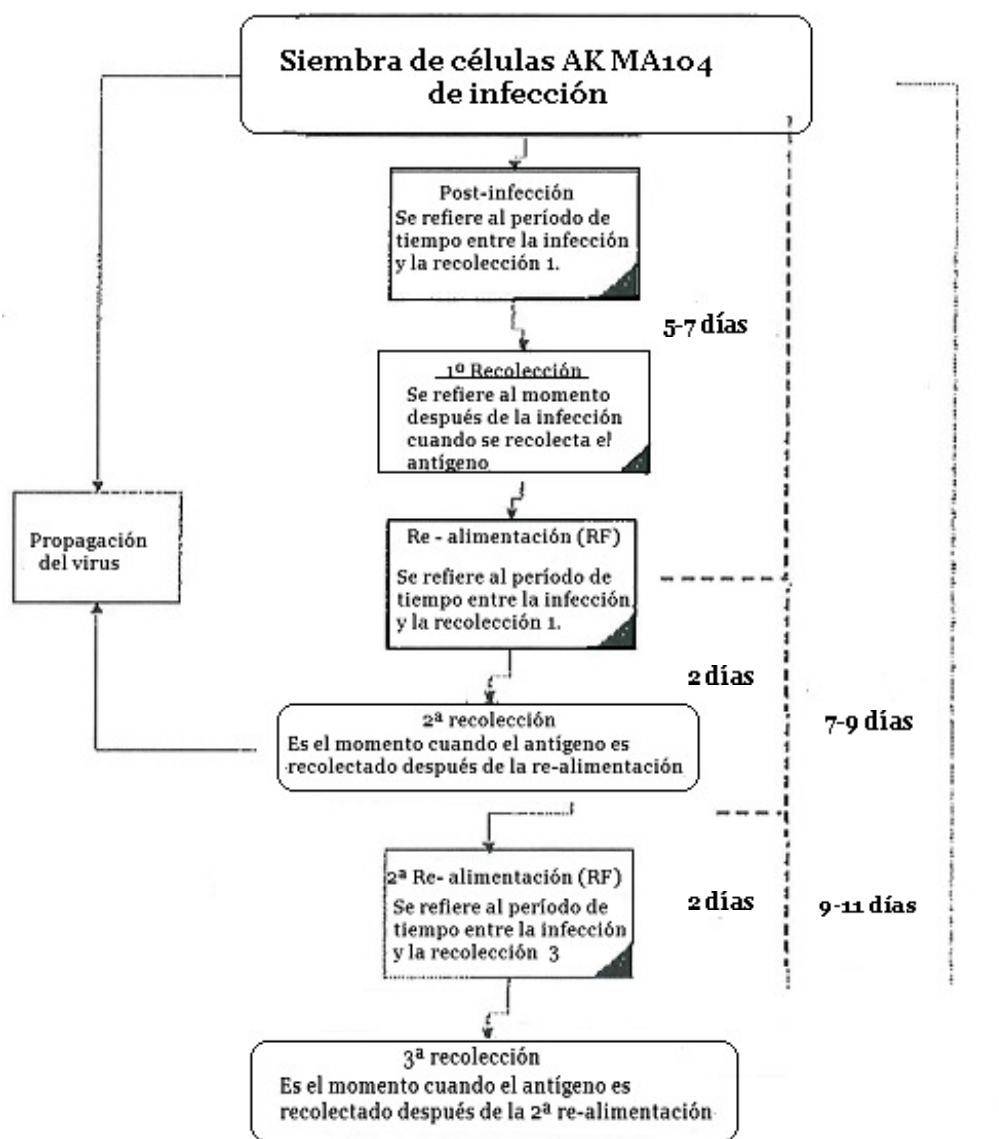
7/8

FIG 7



8/8

FIG 8



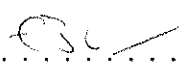
Health Protection Agency, Porton Down and European Collection of Cell Cultures

This document certifies that

Virus Porcine Respiratory & Reproductive
 Syndrome Virus

Deposit Reference 11012501

has been accepted as a patent deposit, in accordance with
The Budapest Treaty of 1977,
with the European Collection of Cell Cultures on
25 January 2011

.....

ECACC Patent Supervisor

Health Protection Agency Culture Collections, Centre for Emergency Preparedness and Response, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, United Kingdom
☎ +44 (0) 1980 612512 ☎ +44 (0) 1980 611315 ✉ hpacultures@hpa.org.uk 🌐 www.hpacultures.org.uk

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

TO
DR S PESCH
BIOSCREEN GMBH
MENDEL STR 11

INTERNATIONAL FORM

NORTH RHINE WESTPHALIA
MUNSTER
48149

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the
DEPOSITOR:

Porcine Respiratory & Reproductive Syndrome Virus

Accession number given by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:

11012501

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ A scientific description

☐ A proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,
which was received by it on 25 January 2011 (date of the original deposit)¹

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International
Depositary Authority on (date of the original deposit) and
A request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty
was received by it on (date of receipt of request for conversion)

IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: ECACC Patent Supervisor
Address: European Collection of Cell cultures
(ECACC)
Centre for Emergency Preparedness
and Response
The Health Protection Agency
Porton Down
Salisbury SP4 0JG

Signature(s) of person(s) having the power
to represent the International Depositary
Authority or of authorized official(s):



Date: 21 JUN 2011

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired

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

INTERNATIONAL FORM

TO
DR S PESCH
BIOSCREEN GMBH
MENDEL STR 11

NORTH RHINE WESTPHALIA
MUENSTER
48149

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY
TO WHOM THE VIABILITY OF STATEMENT
IS ISSUED

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: DR S PESCH BIOSCREEN GMBH MENDEL STR 11 Address: NORTH RHINE WESTPHALIA MUENSTER 48149	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: 11012501 Date of the deposit or of the transfer: 25 January 2011
II. VIABILITY STATEMENT The viability of the microorganism identified under II above was tested on 25 January 2011 ². On that date, the said microorganism was ☒ ³ viable ☐ ³ no longer viable	

- 1 Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- 2 In the cases referred to in Rule 10.2 (a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
- 3 Mark with a cross the applicable box.

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴	
The patent deposit Porcine Respiratory & Reproductive Syndrome Virus 94881 accession number 11012501 was tested according to the depositor's protocol and shown to be infectious and viable.	
II. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Address: ECACC Patent Supervisor European Collection of Cell cultures (ECACC) Centre for Emergency Preparedness and Response The Health Protection Agency Porton Down Salisbury SP4 0JG	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: 21 Jun 2011 ESL ✓

4 Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form BP/9 (second and last page)

Health Protection Agency, Porton Down and European Collection of Cell Cultures

This document certifies that

Virus Porcine Respiratory & Reproductive
 Syndrome Virus

Deposit Reference 11012502

has been accepted as a patent deposit, in accordance with
The Budapest Treaty of 1977,
with the European Collection of Cell Cultures on
25 January 2011

.....
ECACC Patent Supervisor

Health Protection Agency Culture Collections, Centre for Emergency Preparedness and Response, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, United Kingdom
☎ +44 (0) 1980 612512 ☎ +44 (0) 1980 611315 ✉ hpacultures@hpa.org.uk 🌐 www.hpacultures.org.uk

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

TO
DR S PESCH INTERNATIONAL FORM

BIOSCREEN GMBH
MENDEL STR 11

NORTH RHINE WESTPHALIA
MUNSTER
48149

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the
DEPOSITOR:

Porcine Respiratory & Reproductive Syndrome Virus

Accession number given by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:

11012502

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ A scientific description

☐ A proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above,
which was received by it on 25 January 2011 (date of the original deposit)¹

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International
Depository Authority on (date of the original deposit) and
A request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty
was received by it on (date of receipt of request for conversion)

IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: ECACC Patent Supervisor
Address: European Collection of Cell cultures
(ECACC)
Centre for Emergency Preparedness
and Response
The Health Protection Agency
Porton Down
Salisbury SP4 0JG

Signature(s) of person(s) having the power
to represent the International Depository
Authority or of authorized official(s):

Date: 21 Jun 2011

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired

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

INTERNATIONAL FORM

TO
DR S PESCH
BIOSCREEN GMBH
MENDEL STR 11

NORTH RHINE WESTPHALIA
MUENSTER
48149

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY
TO WHOM THE VIABILITY OF STATEMENT
IS ISSUED

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: DR S PESCH BIOSCREEN GMBH MENDEL STR 11 Address: NORTH RHINE WESTPHALIA MUENSTER 48149	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: 11012502 Date of the deposit or of the transfer: 25 January 2011
II. VIABILITY STATEMENT The viability of the microorganism identified under II above was tested on 25 January 2011 ². On that date, the said microorganism was ☒ ³ viable ☐ ³ no longer viable	

- 1 Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- 2 In the cases referred to in Rule 10.2 (a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
- 3 Mark with a cross the applicable box.

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴	
The patent deposit Porcine Respiratory & Reproductive Syndrome Virus 94881 Master Seed Virus accession number 11012502 was tested according to the depositor's protocol and shown to be infectious and viable.	
II. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Address: ECACC Patent Supervisor European Collection of Cell cultures (ECACC) Centre for Emergency Preparedness and Response The Health Protection Agency Porton Down Salisbury SP4 0JG	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: 01 JUN 2011 

4 Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form BP/9 (second and last page)

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

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

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

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2012/052476

International filing date (day/month/year)
14.02.2012

Priority date (day/month/year)
17.02.2011

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/12 C12N7/00

Applicant
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

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

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

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

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

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

Name and mailing address of the ISA:



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

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Brero, Alessandro

Telephone No. +49 89 2399-0



Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-15, 17</u>
	No: Claims	<u>16</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-15, 17</u>
	No: Claims	<u>16</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-17</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item V

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

1 **Documents**

The documents mentioned in the present communication are numbered as listed in the International Search Report (D1-D4).

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

2.1 **Claims 1-15 and 17** are allowable under Article 33(2) PCT.

2.2 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of **claim 16** is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

2.3 **Claim 16** refers to a PRRSV MLV that is characterized via a product-by-process type of definition ("...produced according to the method of any of claims 1-16 ..."). Attention is drawn to the fact that no unified criteria exist among the PCT member states for the assessment of such claims (cf. PCT Guidelines A5.26). One possible interpretation is that a product, which is defined in terms of a process is construed as the product as such, given that it is indistinguishable from the same product produced by any other mean (PCT Guidelines 5.26 and A5.26[1]). Since no defined technical features distinguish a PRRSV MLV produced according to the method of present claims 1-15, it is construed as a PRRSV MLV as such.

D1 (US5989563) discloses a PRRSV MLV comprising a PRRSV formulated with an acceptable adjuvant or carrier for delivery to a pig (D1: Example 1) and is thus prejudicial to the novelty of the subject-matter defined in **claim 16**.

3 **Inventive Step (Article 33(3) PCT)**

Claims 1-5 and 17 are allowable under Article 33(3) PCT because their subject-matter is regarded as inventive for the following reasons.

D1 is regarded as being the closest prior art document to the subject-matter of independent claims **1, 15 and 17** and discloses a method for the commercial scale production of PRRSV (D1: Example 8).

The difference to the methods of present claims 1, 15 and 17 is that (i) host cells and PRRSV are not seeded concurrently, and that (ii) the virus propagation does not comprise three consecutive harvesting/medium-replenishing steps. Said additional features result in a more efficient and cost-effective method for producing PRRSV.

The objective technical problem can thus be formulated as the provision of an improved method to produce PRRSV.

Neither D1 nor any other prior art document disclosing the production of PRRSV, such as e.g. D2-D4, discloses or suggests to concurrently seed host cells and PRRSV and to perform three consecutive harvesting steps to produce PRRSV. Instead, according to said methods host cells are only inoculated after a seeding/culturing step, and only one harvesting step is performed (D1: *vide supra*. D2: Example 5. D3: p 9, l 11 ff. D4: par 2.2). The subject-matter defined in independent **claims 1, 15 and 17** and accordingly in dependent **claims 2-14** is thus regarded as inventive.

4 Industrial Applicability (Article 33(4) PCT)

Claims 1-17 comply with Art. 33(4) PCT.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- 1 In **claim 3** the specification of the cell planting density is missing.
- 2 In **claim 6** the MOI is given as a number of virus particles and not as the ratio between viral particles and target cells.
- 3 **Claim 14** refers to the strain PRRSV 94881, which appears to be an internal designation that is not known in the prior art.

N° de solicitud internacional

PCT/EP2012/052476

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. A61K39/12 C12N7/00

ADD.

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de la clasificación)

A61K C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	US 5 989 563 A (CHLADEK DANNY W [US] ET AL) 23 Noviembre 1999 (23-11-1999)	16
A	ejemplos 1, 8	1-15, 17
A	----- WO 2008/109237 A2 (UNIV WASHINGTON [US]; SRIKUMARAN SUBRAMANIAM [US]; LIU WEIGUO [US]; SH) 12 Septiembre 2008 (12-09-2008)	1-17
A	----- WO 98/35023 A1 (ORIGEN INC [US]) 13 Agosto 1998 (13-08-1998) página 9, línea 11 ff. ----- -/--	1-17

- En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos.
-

- Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo.
-

* Categorías especiales de los documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante
- "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior
- "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento particularmente relevante: la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado
- "Y" documento particularmente relevante: la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

24 Abril 2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

07/05/2012

Nombre y dirección postal de la ISA

Funcionario autorizado

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

N° de solicitud internacional

PCT/EP2012/052476

Oficina Europea de Patentes, P. B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HL Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040,

Fax. (+31-70) 340-3016

Brero, Alessandro

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

N° de solicitud internacional

PCT/EP2012/052476

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	MATANIN ET AL: "Purification of the major envelop protein GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from native virions" , JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 147, n° 1, 25 Octubre 2007 (25-10-2007), páginas 127-135, XP022390479, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2007.08.018 párrafo [02.2] -----	1-17

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familia de patentes

No. de solicitud internacional

PCT/EP2012/052476

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 5989563	A	23-11-1999	NINGUNO
WO 2008109237	A2	12-09-2008	US 2010146653 A1 10-06-2010 WO 2008109237 A2 12-09-2008
WO 9835023	A1	13-08-1998	NINGUNO

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P10 - 0138W01	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2012/052476	International filing date (<i>day/month/year</i>) 14/02/2012	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 17/02/2011
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ 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 (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
- ☐ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/052476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/12 C12N7/00
ADD.

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)
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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 989 563 A (CHLADEK DANNY W [US] ET AL) 23 November 1999 (1999-11-23)	16
A	examples 1,8	1-15,17
A	----- WO 2008/109237 A2 (UNIV WASHINGTON [US]; SRIKUMARAN SUBRAMANIAM [US]; LIU WEIGUO [US]; SH) 12 September 2008 (2008-09-12)	1-17
A	example 5 ----- WO 98/35023 A1 (ORIGEN INC [US]) 13 August 1998 (1998-08-13)	1-17
	page 9, line 11 ff. ----- -/-	



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.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 April 2012

Date of mailing of the international search report

07/05/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Brero, Alessandro

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/052476

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATANIN ET AL: "Purification of the major envelop protein GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from native virions", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 147, no. 1, 25 October 2007 (2007-10-25), pages 127-135, XP022390479, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2007.08.018 paragraph [02.2] -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/052476

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5989563	A	23-11-1999	NONE

WO 2008109237	A2	12-09-2008	US 2010146653 A1 10-06-2010
			WO 2008109237 A2 12-09-2008

WO 9835023	A1	13-08-1998	NONE
