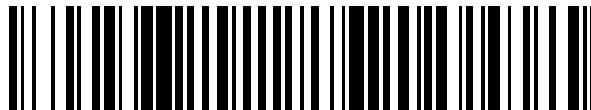


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 072**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/04** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**C07K 14/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2002 E 06011790 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1749885**

54 Título: **Vacuna del virus de la diarrea viral infecciosa bovina**

30 Prioridad:

**06.09.2001 DE 10143813**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**16.04.2013**

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH  
(100.0%)  
BINGER STRASSE 173  
55216 INGELHEIM AM RHEIN, DE**

72 Inventor/es:

**ELBERS, KNUT;  
FETZER, CHRISTIANE;  
VON FREYBURG, MARTINA y  
MEYERS, GREGOR**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 401 072 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Vacuna del virus de la diarrea viral infecciosa bovina

**5 Campo de la invención**

La invención pertenece al campo de la salud animal y, en particular, al Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV). La invención proporciona clones infecciosos del BVDV y métodos para producir dichos clones de BVDV. La invención se refiere, además, a métodos para atenuar dichos clones, a clones de BVDV atenuados y a vacunas que comprenden dichos clones atenuados.

**Antecedentes de la invención**

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV) es el agente causante de la BVD y de la enfermedad mucosa en el ganado (Baker, 1987; Moennig y Plagemann, 1992; Thiel et al., 1996). La infección fetal durante la preñez puede dar como resultado la resorción del feto, abortos, así como el nacimiento de terneros inmuno-tolerantes que están persistentemente infectados con BVDV. Estos terneros carecen o tienen títulos muy bajos de anticuerpos neutralizantes y expulsan continuamente grandes cantidades del virus. Junto con el ganado con infección aguda, estos terneros son la fuente principal de difusión del virus y son, por tanto, de enorme importancia en la epidemiología de esta enfermedad. El fuerte impacto económico de la BVD es consecuencia de los elevados índices de aborto, nacimientos de animales muertos, resorción fetal, momificación, malformaciones congénitas y nacimientos de terneros débiles y de tamaño menor al normal. Para una revisión detallada de la patogenia, se hace referencia aquí al artículo de Moennig y Liess de 1995.

Se han descrito dos principales grupos antigénicos de BVDV (tipos 1 y 2) (Becher et al., 1999), que muestran limitadas reacciones cruzadas de anticuerpos neutralizantes (Ridpath et al., 1994). Las actuales vacunas para la prevención y tratamiento de las infecciones por BVDV siguen teniendo inconvenientes (Oirschot et al., 1999). Las vacunas contra el tipo 1 clásico del BVDV ofrecen sólo una protección parcial frente a la infección por tipo 2 y las vacas vacunadas pueden parir terneros que están persistentemente infectados con el BVDV tipo 2 virulento (Bolin et al., 1991, Ridpath et al., 1994). Este problema tiene probablemente su origen en la gran diversidad antigénica entre las cepas de tipo 1 y tipo 2, que es más pronunciada en la glicoproteína E2, el principal antígeno (Tijssen et al., 1996): la mayor parte de los anticuerpos monoclonales contra las cepas del tipo 1 fracasa en su unión a virus del tipo 2 (Ridpath et al., 1994).

Las vacunas de virus muertos (virus completo inactivado) o las vacunas de sub-unidades (proteínas virales purificadas de forma convencional o expresadas de manera heteróloga) son, con mucha frecuencia, inferiores a las vacunas de virus vivos en lo que respecta a su eficacia para producir una inmunorrespuesta de protección completa, incluso en presencia de coadyuvantes.

Las vacunas de BVDV vivos, aunque atenuadas, se asocian con gran frecuencia a problemas de seguridad. Como se ha mencionado anteriormente, atraviesan la placenta de las vacas preñadas y dan lugar a manifestaciones clínicas en el feto y/o a la inducción de terneros persistentemente infectados. Por lo tanto, no se pueden aplicar al ganado de cría que contenga vacas preñadas. Las vacas preñadas se deben mantener separadas del ganado vacunado para proteger los fetos y no deben ser vacunadas. Adicionalmente, los elementos de reversión de los BVDV vivos atenuados representan una grave amenaza para el ganado. Para los virus atenuados derivados de forma convencional, en los que la atenuación se consigue por múltiples pasajes convencionales, el origen molecular y la estabilidad genética de la atenuación siguen siendo desconocidos y la reversión al tipo salvaje virulento es impredecible.

Las vacunas vivas con mutaciones definidas, como base de la atenuación, superarían los inconvenientes de la presente generación de vacunas atenuadas. Otra ventaja de dichas mutaciones atenuantes radica en su unicidad molecular definida, que se puede utilizar como marca distintiva para los pestivirus atenuados, con el fin de distinguirlos de los pestivirus de campo.

El documento WO 01/39801 describe que la supresión del codón para histidina en la posición 349 del gen E<sup>RNS</sup> de la cepa CP7 de BVDV tipo 1 resulta en una cepa BVDV recombinante que es adecuada como una vacuna contra infección por BVDV-1.

En la técnica, son escasamente conocidos BVDV de identidad genética definida que se asemejen a los virus de tipo salvaje, sobre todo para el BVDV de tipo 2. En la técnica, existe una prolongada necesidad de métodos que generen tales BVDV. Por consiguiente, un problema técnico que subyace a esta invención era proporcionar un BVDV, en particular un BVDV tipo 1 en unión con un BVDV de tipo 2, de identidad genética definida.

**Descripción de la invención**Definiciones de los términos usados en la descripción:

5 Frente a las realizaciones de la presente invención, es preciso destacar que, tal como se usa aquí y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “uno, una, el y la” incluyen también referencias plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “un virus BVDV” incluye una pluralidad de tales virus BVDV, la referencia a la “célula” es una referencia a una o más células y equivalentes de las mismas conocidos para los expertos en la técnica, etc. A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen los mismos significados que los habituales para un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aun cuando se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos aquí en la práctica o comprobación de la presente invención, los métodos, dispositivos y materiales preferidos son los que se describen a continuación. Todas las publicaciones aquí mencionadas se incorporan como referencia al objeto de describir y revelar las líneas celulares, vectores y metodologías sobre las que se informa en las publicaciones que se pueden utilizar en relación con la invención. Nada de lo aquí reseñado se puede entender como admisión de que la invención no está autorizada para adelantarse a dicha descripción en virtud de invenciones anteriores.

20 El término “BVDV”, tal como se usa aquí, se refiere a todos los virus pertenecientes a las especies BVDV1 y BVDV2 en el género pestivirus, dentro de la familia Flaviviridae (Becher et al., 1999). Las cepas BVDV tipo 1, más clásicas, y las cepas BVDV tipo 2, más recientemente descubiertas, muestran algunas diferencias limitadas, pero distintivas, en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos.

25 Un “clon” es un vector de DNA o una cepa de célula huésped en la que se ha introducido ese vector. Preferentemente, el vector de DNA es un plásmido.

30 Un “clon infeccioso” es un vector de DNA con la capacidad de servir como modelo para la transcripción en un RNA que induce la generación del virus cuando se introduce en células susceptibles. Preferentemente, el RNA se produce por transcripción *in vitro* y se introduce en las células por tecnologías de transfección conocidas para el experto en la materia.

35 “Partículas de BVDV” o “partículas virales”, como se usa aquí, hacen referencia a virus de BVD generados por “clones infecciosos” a través de RNA, que inducirá la producción de tales partículas de BVDV cuando se introduzca en células susceptibles.

“Partículas de BVDV atenuado” o “partículas virales atenuadas”, como se usa aquí, se refieren a partículas de BVDV atenuadas por un método según la invención (véase más adelante).

40 “Infectividad” es la capacidad de un virus o partícula viral para inducir un determinado número de placas en un ensayo de placa o una cierta puntuación de TCID<sub>50</sub> en un ensayo de punto final.

Un RNA de longitud total es un RNA que comprende al menos 98% de la secuencia de un RNA que se manifiesta en un aislado de tipo salvaje. Un DNA complementario de longitud total es un DNA que comprende una secuencia complementaria a al menos 98% de un RNA que se manifiesta en un aislado de tipo salvaje.

45 Como se usa aquí, “ternero” se refiere a un animal bovino de seis meses de edad o menos.

50 Virulencia: “Virulencia auténtica”, como se usa aquí, significa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la virulencia de partículas infecciosas de BVDV, según la invención, y aislados de tipo salvaje de BVDV del que se han derivado dichas moléculas de DNA que contienen una secuencia de nucleótidos complementaria al RNA de BVDV, preferentemente un RNA de tipo 2, para al menos un parámetro clínico predominante. Ejemplos de tales parámetros clínicos dominantes son diarrea, fiebre y/o letalidad.

55 Atenuación: “Una partícula de BVDV atenuada”, como se usa aquí, significa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la virulencia de partículas de BVDV atenuadas, según la invención, estando dichas partículas de BVDV atenuadas por un método según la invención, y aislados de BVDV de tipo salvaje, a partir de las cuales se han derivado dichas partículas de BVDV atenuadas, para los parámetros clínicos predominantes diarrea, fiebre y letalidad en animales infectados con la misma dosis, preferentemente  $6 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>. De esta forma, dichas partículas de BVDV atenuadas no provocan diarrea, fiebre ni letalidad y se les puede usar, por tanto, en una vacuna.

60 “RACE” como se usa aquí significa rápida amplificación de extremos de cDNA y se conoce como tal en la técnica (Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 1988, 85:8998-9002)

“Célula susceptible” como se usa aquí es una células que se puede infectar con el virus BVDV o transfectar con RNA de BVDV, en donde dicho virus o RNA, cuando se introduce en dichas células susceptibles, induce la generación de BVDV infeccioso.

5 Un “fragmento”, según la invención, es cualquier sub-unidad de una molécula de DNA o clon de BVDV infeccioso, es decir, cualquier sub-conjunto, que se distingue porque está codificado por una molécula de ácido nucleico más corta que la descrita y que todavía se puede transcribir en RNA.

10 Una “variante funcional” de la molécula de DNA o clon infeccioso de BVDV, según la invención, es una molécula de DNA o clon infeccioso de BVDV que posee una actividad biológica (funcional o estructural) que es sustancialmente similar a la molécula de DNA o clon infeccioso de BVDV según la invención. La expresión “variante funcional” incluye también un “fragmento”, “una variante funcional”, “una variante basada en el código de ácido nucleico degenerativo” o “derivado químico”. Una “variante funcional” de este tipo puede, por ejemplo, ser portadora de uno o varios intercambios, deleciones o inserciones de ácidos nucleicos. Dichos intercambios, deleciones o inserciones pueden  
15 representar 10% de la secuencia completa. Dicha variante funcional conserva al menos su actividad biológica, por ejemplo la función como clon infeccioso o cepa de vacuna o, incluso, muestra una actividad biológica mejorada. Una “variante basada en la naturaleza degenerativa del código genético” es una variante resultante del hecho de que algún aminoácido puede estar codificado por varios tripletes de nucleótidos diferentes. Dicha variante conserva al menos parcialmente su actividad biológica o, incluso, muestra una actividad biológica mejorada.

20 Una “molécula de fusión” puede ser la molécula de DNA o clon infeccioso de BVDV según la invención, enlazado con, por ejemplo, un informador tal como una marca radiactiva, una molécula química tal como una marca fluorescente o cualquier otra molécula conocida en la técnica.

25 Como se usa aquí, un “derivado químico” según la invención es una molécula de DNA o un clon infeccioso de BVDV según la invención, químicamente modificado o que contiene fracciones químicas adicionales que normalmente no forman parte de la molécula. Estas fracciones pueden mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica, etc. de la molécula.

30 Una molécula es “sustancialmente similar” a otra molécula si ambas moléculas tienen secuencias de nucleótidos o actividad biológica sustancialmente similares. De esta forma, siempre que dos moléculas posean una actividad similar, se las considera variantes, puesto que dicho término se usa aquí si la secuencia de nucleótidos no es idéntica, y dos moléculas que tengan una secuencia de nucleótidos similar se consideran variantes, dado que es el término que se usa aquí, incluso si su actividad biológica no es idéntica.

35 El término “vacuna” como se usa aquí, se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un componente inmunológicamente activo que induce una respuesta inmunológica en un animal y posible, pero no necesariamente, uno o más componentes adicionales que potencian la actividad inmunológica de dicho componente activo. Una vacuna puede comprender, adicionalmente, otros componentes típicos de composiciones farmacéuticas.  
40 El componente inmunológicamente activo de una vacuna puede comprender partículas de virus completos tanto en su forma original o como partículas atenuadas en una llamada vacuna viva modificada (MLV) o partículas inactivadas por métodos apropiados en una llamada vacuna muerta (KV). En otra forma, el componente inmunológicamente activo de una vacuna puede comprender elementos apropiados de dichos organismos (vacunas de sub-unidades), en donde estos elementos son generados por la destrucción de la partícula completa, o cultivos de crecimiento que contienen tales partículas y, opcionalmente, etapas subsiguientes de purificación que dan como resultados la o las estructuras deseadas, o por procesos sintéticos que incluyen una manipulación adecuada por medio del uso de un sistema apropiado basado, por ejemplo, bacterias, insectos, mamíferos u otras especies, más los procedimientos subsiguientes opcionales de aislamiento y purificación, o por inducción de dichos procesos sintéticos en el animal que necesita una vacuna por incorporación directa de material genético, utilizando  
45 composiciones farmacéuticas adecuadas (vacunación por polinucleótidos). Una vacuna puede comprender uno o simultáneamente más de uno de los elementos anteriormente descritos.

50 El término “vacuna”, como se entiende aquí, es una vacuna para uso veterinario que comprende sustancias antigénicas y se administra con el fin de inducir una inmunidad específica y activa contra una enfermedad provocada por BVDV. El clon de BVDV según la invención confiere inmunidad activa que se puede transferir de forma pasiva a través de anticuerpos maternos contra los inmunógenos que contiene y, en ocasiones, también contra organismos relacionados de manera antigénica.

60 Componentes adicionales para potenciar la respuesta inmunológica son constituyentes normalmente designados como coadyuvantes tales como, por ejemplo, hidróxido de aluminio, aceites minerales o de otro tipo, o moléculas auxiliares añadidas a la vacuna o generados por el cuerpo tras la correspondiente inducción por tales componentes adicionales, tales como interferones, interleuquinas o factores de crecimiento, sin estar limitados a éstos.

65 Una “composición farmacéutica” consiste básicamente en uno o más ingredientes capaces de modificar funciones fisiológicas, por ejemplo, inmunológicas, del organismo al que se administra, o de organismos que viven en o sobre el organismo. La expresión incluye, pero no está limitada a, antibióticos o antiparasitarios, así como otros

constituyentes normalmente utilizados para alcanzar algunos otros objetivos tales como, pero no limitados a, rasgos de procesamiento, esterilidad, estabilidad, viabilidad para administrar la composición por vías entéricas o parenterales tales como vía oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica u otra vía adecuada, tolerancia tras la administración y propiedades de liberación controlada.

#### 5 Descripción de la invención

La solución al problema técnico anterior se consigue por la descripción y las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

10 Se ha superado la prolongada necesidad de un BVDV (virus de la diarrea viral bovina) vivo de secuencia definida y especificidad correlacionada con la virulencia, que se pueda utilizar para generar BVDV atenuado específico para usar, por ejemplo, en una vacuna. Los inventores han ofrecido por primera vez un método para generar clones infecciosos y partículas de BVDV infecciosas derivadas del mismo, de identidad genética definida que, al mismo tiempo, tiene una patogenia estrechamente similar a las del virus de tipo salvaje. Además, los inventores han descrito por primera vez un clon infeccioso de tipo 2 y partículas infecciosas de BVDV de tipo 2 derivadas del mismo. En tercer lugar, habiendo previsto partículas vivas e infecciosas de BVDV de secuencia definida, los inventores describen igualmente un método para generar partículas atenuadas de BVDV con identidad genética, que se pueden atenuar mediante una modificación en un único sitio de marca genética definido. La descripción permite generar un enlace causal entre la modificación del genoma y la atenuación, que es esencial para comprender el mecanismo funcional de la atenuación y útil, por tanto, para evaluar la calidad en su uso como una vacuna.

En relación con la invención, se describe una molécula de DNA que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria al RNA de BVDV, en donde dicho RNA, cuando se introduce en células huésped susceptibles, induce la generación de partículas infecciosas de BVDV

- 25 a) con la capacidad de inducir viremia y leucopenia en terneros durante un período de al menos un día y al menos uno de los siguientes síntomas clínicos del grupo que comprende diarrea y/o fiebre de al menos un día de duración cuando la infección de realiza con una dosis de  $6 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>.
- 30 b) con auténtica virulencia, como se ha definido anteriormente, en comparación con un aislado de BVDV de tipo salvaje de la que se ha derivado tal molécula de DNA; y/o
- c) que resultan letales, cuando se infectan terneros que no han estado previamente en contacto con BVDV, a una dosis de  $6 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> de tales partículas, para al menos 30% de tales terneros en un espacio de tiempo de 21 días; y/o
- 35 d) con una virulencia no inferior a 90% de partículas de BVDV que comprenden un RNA con una secuencia complementaria a SEQ ID N° 1; y/o
- e) que comprenden una secuencia complementaria a SEQ ID N° 1.

40 Dicha dosis de  $6 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> de la etapa a) se administra preferentemente como  $2 \times 10^6$  i.m. (músculo glúteo),  $2 \times 10^6$  por vía intranasal y  $2 \times 10^6$  por vía subcutánea (sobre la escápula) para obtener una dosis total de  $6 \times 10^6$ . Dichos síntomas clínicos de la etapa a) se deben observar preferentemente en al menos dos tercios de todos los animales infectados. Dicha leucopenia de la etapa a) será preferentemente una reducción de al menos 35% por debajo del nivel inicial en al menos dos días consecutivos, en donde "valor inicial" se refiere a los valores medios de todos los animales, 10 días antes de la infección. Diarrea es un síntoma típico de la infección con BVDV.

45 Preferentemente, en una molécula de DNA según la invención, como se ha descrito anteriormente, la fiebre de la etapa a) es de al menos 40°C.

Un segundo aspecto se refiere a un clon infeccioso de BVDV, capaz de servir de molde para la transcripción en un RNA, en donde dicho RNA, cuando se introduce en células huésped susceptibles, induce la generación de partículas infecciosas de BVDV

- 50 f) con la capacidad de inducir viremia y leucopenia en terneros durante un período de al menos un día y al menos uno de los siguientes síntomas clínicos del grupo que comprende diarrea y/o fiebre de al menos un día de duración cuando se infecta con una dosis de  $6 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>; y/o
- 55 g) con virulencia auténtica en comparación con un aislado de BVDV de tipo salvaje, a partir del cual se ha derivado tal molécula de DNA; y/o
- h) que resultan letales, cuando se infectan terneros de 3 a 6 meses de edad que no han estado previamente en contacto con el BVDV, a una dosis de  $6 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> con tales partículas, para al menos 30% de tales terneros en un espacio de tiempo de 21 días después de la infección; y/o
- 60 i) con una virulencia no inferior a 90% de las partículas de BVDV que comprenden un RNA con una secuencia complementaria a SEQ ID N° 1; y/o
- j) que comprenden una secuencia complementaria a SEQ ID N° 1.

65 Dicha dosis de  $6 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> de la etapa f) se administra preferentemente como  $2 \times 10^6$  i.m. (músculo glúteo),  $2 \times 10^6$  por vía intranasal y  $2 \times 10^6$  por vía subcutánea (sobre la escápula) para obtener una dosis total de  $6 \times 10^6$ . Dichos síntomas clínicos de la etapa f) se deben observar preferentemente en al menos dos tercios de todos los animales infectados. Dicha leucopenia de la etapa f) será preferentemente una reducción de al menos 35% por debajo del

nivel inicial durante al menos dos días consecutivos, en donde "valor inicial" se refiere a los valores medios de todos los animales 10 días antes de la infección.

Dicho clon infeccioso de BVDV es preferentemente un clon de tipo 1 o tipo 2.

Dado que es importante que dicho clon infeccioso de BVDV sea de auténtica virulencia, el virus que sirve como origen para la construcción de ese clon se obtiene, de preferencia, directamente de un aislado de campo o retransferido a animales y, a continuación, re-aislado del animal con los síntomas clínicos más intensos, sometiéndolo seguidamente a no más de dos pasajes en cultivo celular, preferentemente uno o ninguno en absoluto. El ejemplo (Ejemplo 1) ilustra este procedimiento. El ejemplo demuestra la clonación de cDNA del virus NY93/C que, tras varios pasajes por cultivos celulares, se retransfiere a un animal bovino, se re-aisla y se utiliza para la preparación de RNA y clonación de cDNA tras no más de dos pasajes por cultivos celulares del virus re-aislado.

Otro aspecto importante es una partícula de BVDV generada por transcripción, utilizando la molécula de DNA o el clon de BVDV según la invención, la transfección de células o líneas celulares adecuadas con dicho RNA y la recolección de las partículas de BVDV resultantes producidas por dichas células. Todavía otro aspecto se refiere a una partícula de BVDV generada por la clonación de la molécula de DNA o el clon de BVDV, en el genoma de un DNA-virus adecuado, siendo dichos DNA-virus conocidos para el técnico, seguido de la infección de células adecuadas, dando como resultado la generación de partículas de BVDV producidas por dichas células. Preferentemente también, el DNA o clon infeccioso se puede transfectar en células adecuadas que producen, entonces, el RNA según lo han descrito para el virus de la fiebre porcina clásico (CSFV) van Gennip et al. (1999) para células que expresan de forma estable Polimerasa T7. También preferentemente, el DNA o clon infeccioso según la invención se puede expresar bajo control de un promotor eucariota en células eucariotas que conducen a la generación de partículas infecciosas de BVDV capaces de ser secretadas desde la célula (tal como lo ejemplifican V. Racaniello y D. Baltimore para el poliovirus (1981)).

Un aspecto altamente importante de esta descripción es un clon infeccioso de BVDV tipo 2.

Preferentemente, dicho clon infeccioso de BVDV tipo 2, capaz de servir como modelo para la transcripción en un RNA, en donde dicho RNA, cuando se introduce en células huésped susceptibles, induce la generación de partículas infecciosas de BVDV

- k) con la capacidad de inducir viremia y leucopenia en terneros durante un período de al menos 1 día y al menos uno de los siguientes síntomas clínicos del grupo que comprende diarrea y/o fiebre de al menos un día de duración, cuando se infecta con una dosis de  $6 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>; y/o
- l) con auténtica virulencia en comparación con un aislado de BVDV de tipo salvaje, a partir del cual se ha derivado esa molécula de DNA; y/o
- m) que resultan letales, cuando se infectan terneros de 3 a 6 meses de edad que no han estado previamente en contacto con BVDV, a una dosis de  $6 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>, con tales partículas, para al menos 30% de tales terneros en un período de 21 días después de la infección; y/o
- n) con una virulencia no inferior a 90% de las partículas de BVDV que comprenden un RNA con una secuencia complementaria a SEQ ID N° 1; y/o
- o) que comprende una secuencia complementaria a SEQ ID N° 1.

Un clon de BVDV tipo 2 preferido se puede obtener por un método que se distingue por las siguientes etapas:

- aaa) se aísla una cepa de tipo 2 de BVDV de tipo salvaje;
- bbb) dicha cepa de tipo 2 de BVDV de tipo salvaje se hace pasar por un cultivo celular;
- ccc) dicha cepa de tipo 2 de BVDV sometida a pasaje por cultivo celular se utiliza para infectar animales bovinos y se re-aisla una cepa de BVDV del animal más gravemente infectado;
- ddd) dicha cepa de tipo 2 de BVDV re-aislado se hace pasar no más de dos veces, preferentemente una vez, por un cultivo celular;
- eee) dicha cepa de tipo 2 de BVDV re-aislado se transcribe inversamente y se clona, dando como resultado un clon cDNA de longitud total, clonándose preferentemente los extremos 5' y 3' utilizando la tecnología RACE.

Dicho clon infeccioso de DNA se puede transcribir entonces en RNA bajo condiciones apropiadas, dicho RNA se introduce en células o líneas celulares adecuadas y se recolecta la partícula de BVDV de tipo 2 resultante.

Tal clon se ejemplifica en el Ejemplo 1 y se caracteriza por la secuencia de cDNA SEQ ID N° 1. De esta forma, un clon infeccioso de BVDV de tipo 2 se caracteriza por la secuencia de DNA de SEQ ID N° 1, o un fragmento, variante funcional, variante basada en el código de ácido nucleico degenerativo, molécula de fusión o un derivado químico del mismo. En el Ejemplo 1 se ofrece un ejemplo.

En relación con la invención, una partícula de BVDV de tipo 2 se genera por transcripción in vitro del clon de BVDV en RNA, la transfección de células o líneas celulares adecuadas con dicho RNA y la recolección de las partículas de BVDV resultantes, producidas por dichas células. También preferentemente, el DNA o clon infeccioso se puede transfectar en células adecuadas que, a continuación, producen el RNA como lo han descrito para el virus de la fiebre porcina clásica (CSFV) van Gennip et al. (1999) para células que expresan de forma estable Polimerasa T7. También preferentemente, el DNA o clon infeccioso se puede expresar bajo el control de un promotor eucariota en

células eucariotas que conducen a la generación de partículas infecciosas de BVDV capaces de ser secretadas desde la célula (según lo ejemplifican V. Racaniello y D. Baltimore para el poliovirus (1981)).

Otro aspecto muy importante es una molécula de DNA que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria al RNA de BVDV de tipo 2 de longitud total. Preferentemente, dicha molécula de DNA se distingue por la secuencia SEQ ID N° 1. Por consiguiente, un aspecto adicional en relación con la invención se refiere a una molécula de DNA, según queda caracterizada por SEQ ID N° 1, o un fragmento, variante funcional, variante basada en el código de ácido nucleico degenerativo, molécula de fusión o un derivado químico de la misma. En el Ejemplo 1 se ofrece un ejemplo.

De forma muy preferente, se describe una molécula de DNA, consistente en una secuencia según queda caracterizada por SEQ ID N° 1.

Además, se describe una molécula de RNA complementaria a la molécula de DNA, como se ha descrito anteriormente, o al clon de BVDV, como se ha descrito anteriormente.

También se describe una molécula de RNA que se puede obtener por transcripción de la molécula de DNA, como se ha descrito anteriormente, o del clon de BVDV, como se ha descrito anteriormente.

Otro aspecto importante es un método para la producción de un clon infeccioso de BVDV a partir de un aislado de BVDV de tipo salvaje, siendo dicho clon infeccioso de BVDV complementario a un RNA que tiene auténtica virulencia en comparación con dicho aislado de tipo salvaje, que comprende las etapas de

- p) aislar partículas virales de un animal infectado; haciéndolas pasar preferentemente no más de dos veces en células de cultivo celular adecuado;
- q) preparar RNA a partir de las partículas virales;
- r) generar un DNA complementario de longitud total tras la transcripción inversa del RNA; en donde la transcripción inversa incluye una etapa a temperaturas elevadas suficiente para degradar o reducir las estructuras secundarias del RNA, y el uso de una enzima termoestable para esta etapa, siendo dicha enzima activa a estas temperaturas elevadas;
- s) incorporar el DNA complementario (cDNA) en un vector de plásmido o en un DNA-virus capaz de dirigir la transcripción de cDNA de BVDV en RNA tras la infección de células adecuadas.

Dichas partículas virales se aíslan, preferentemente, durante la viremia (etapa k)). El DNA complementario (cDNA) de longitud total de la etapa m) se puede generar, preferentemente, ensamblando cDNA parcial solapado (véase también el Ejemplo 1).

Otro aspecto preferido se refiere a un método para la producción de un clon infeccioso de BVDV a partir de un aislado de BVDV de tipo salvaje, siendo dicho clon infeccioso de BVDV complementario a un RNA que tiene auténtica virulencia, en comparación con dicho aislado de tipo salvaje, que comprende las etapas de

- ppp) aislar RNA a partir de células de un animal infectado durante la viremia u, opcionalmente, a partir de sus órganos después de sacrificar dicho animal;
- qqq) generar DNA complementario de BVDV de longitud total que, preferentemente, está ensamblado a partir de fragmentos de DNA, tras la transcripción inversa del RNA; en donde la transcripción inversa incluye una etapa a temperaturas elevadas, suficientes para degradar o reducir las estructuras secundarias del RNA, y el uso de una enzima termoestable para esta etapa, siendo dicha enzima activa a estas temperaturas elevadas;
- rrr) incorporar el DNA complementario (cDNA) en un vector de plásmido o en un DNA-virus capaz de dirigir la transcripción de cDNA de BVDV en RNA tras la infección de células adecuadas.

Células adecuadas para el cultivo celular son las células renales bovinas de Madin-Darby (MDBK), células RD (testiculares bovinas) o células bovinas Turbinat (BT). El experto en la técnica conoce otras células adecuadas.

El clon infeccioso producido por el método descrito en esta memoria es un clon de tipo 1 o, preferentemente, un clon de tipo 2.

Otro aspecto importante es un método para la producción de un clon infeccioso de BVDV a partir de un aislado de BVDV de tipo salvaje, siendo dicho clon infeccioso de BVDV complementario a un RNA que tiene una virulencia no inferior a 90% de dicho aislado de tipo salvaje, que comprende las etapas de

- t) aislar partículas virales de un animal infectado;
- u) hacerlas pasar no más de dos veces en células de cultivo celular apropiadas; preferentemente una sola vez o ninguna en absoluto;
- v) preparar RNA a partir de las partículas virales;
- w) generar DNA complementario de longitud total tras la transcripción inversa del RNA; en donde la transcripción inversa incluye una etapa a temperaturas elevadas, suficientes para degradar o reducir las estructuras secundarias del RNA, y el uso de una enzima termoestable para esta etapa, siendo dicha enzima activa a estas temperaturas elevadas;
- x) incorporar el DNA complementario (cDNA) en un vector de plásmido o en un DNA-virus capaz de dirigir la transcripción de cDNA de BVDV en RNA tras la infección de células adecuadas.

Dichas partículas virales se aíslan preferentemente durante la viremia (etapa t)). El DNA complementario (cDNA) de longitud total de la etapa x) se puede generar preferentemente mediante ensamblaje de fragmentos parciales de cDNA solapados (véase también el Ejemplo 1).

5 Hubo una particular dificultad técnica para clonar las regiones 5' y 3' de un BVDV infeccioso. Los inventores desarrollaron un método para obtener auténticas regiones 5' y 3'. Sorprendentemente, esto fue posible aplicando la tecnología RACE. Sin embargo, solamente la modificación efectuada en esta técnica por los presentes inventores condujo a la generación sorprendente e inesperada de clones de BVDV de auténtica virulencia. En un método preferido, el extremo 5' del RNA se genera usando RACE. Sorprendentemente, sólo por medio de la aplicación de la tecnología RACE junto con una polimerasa fue posible disolver eficazmente la estructura secundaria del genoma. El experto en la materia conoce los métodos convencionales de biología molecular que también se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York y Bertram, S. y Gasse, H.G., Gentechnische Methoden, Editorial G. Fischer, Stuttgart, Nueva York, 1991.

15 En un método preferido, RACE se lleva a cabo con una polimerasa termoestable, que permite temperaturas de reacción de al menos 48°C, preferentemente 50-55°C, preferentemente también 56-60°C.

20 Habiendo previsto partículas vivas e infecciosas de BVDV de secuencia definida, los inventores proporcionaron también un método para generar partículas atenuadas de BVDV con una identidad genética definida que, preferentemente, se atenúan en solamente un único sitio de marca genética. Esto permite sorprendentemente la simple determinación de revertientes o la atenuación eficaz, dado que sólo se debe determinar la presencia del sitio de marca genética por métodos de biología molecular conocidos para el técnico. XIKE-B y XIKE-C del Ejemplo 1 son ejemplos de tales partículas atenuadas de BVDV de secuencia definida.

25 Otro aspecto importante es un método de atenuación del virus de BVD mediante la introducción de una o más mutaciones en la molécula de DNA según la invención, como se ha descrito anteriormente, o el clon infeccioso de BVDV como se ha descrito anteriormente, en donde dicha mutación o mutaciones conducen a o aumentan un fenotipo atenuado del virus de BVD recuperado.

30 Todavía otro aspecto importante es un método de atenuación de una cepa de BVDV, que comprende las etapas de  
 y) introducir una o más mutaciones en la molécula de DNA, como se ha descrito anteriormente, o en el clon infeccioso de BVDV, como se ha descrito anteriormente;  
 z) introducir el DNA mutado en células huésped susceptibles, en las que dicho DNA se transcribe en RNA, o introduciendo un RNA transcrito a partir de dicho DNA en dichas células; y  
 35 aa) recolectar las partículas virales producidas por estas células;  
 en las que dicha mutación o mutaciones da como resultado la atenuación.

40 Un aspecto preferido es un método de atenuación, como se ha descrito anteriormente, en el cual la mutación o mutaciones consisten en una sustitución, delección, inserción, adición de un nucleótido, o combinaciones de las mismas.

45 De acuerdo con la invención, "mutación" significa reemplazar un nucleótido por otro (por ejemplo, C por T), la llamada "sustitución", o cualquier otra mutación tal como "delección" o "inserción". "Delección" significa la eliminación de uno o varios nucleótidos o aminoácidos.

50 Dado que estos clones infecciosos de BVDV son virus de auténtica virulencia, semejantes a los virus de tipo salvaje y que, al mismo tiempo, tienen un genotipo definido, dicho virus se debe utilizar como control positivo en experimentos con animales. Dichos clones infecciosos son instrumentos excelentes para generar clones de BVDV específicamente atenuados que se usan, por ejemplo, para la vacunación. La invención comprende clones de BVDV en los que la actividad de la RNasa residente en la glicoproteína<sup>RNS</sup> está inactivada. Preferentemente, dicha actividad de RNasa está inactivada por una delección y/u otra mutación, tal como una sustitución. Preferentemente, dichas delecciones y/u otras mutaciones están localizadas en los aminoácidos en posición 295 a 307 y/o posición 338 a 357.

55 Así, de acuerdo con la invención se proporciona un método de atenuación, en el cual la o las mutaciones se encuentran en la glicoproteína E<sup>ms</sup> y producen la alteración o pérdida de función de la proteína mutada.

Un aspecto más preferido es un método de atenuación, en el cual la mutación consiste en

- bb) delección de toda o parte de la glicoproteína E<sup>ms</sup>; y/o
- cc) delección o sustitución de la histidina en posición 300 de la SEQ ID N° 1; y/o
- 60 dd) delección o sustitución de la histidina en posición 349 de la SEQ ID N° 1.
- ee)

De forma muy preferible, otro aspecto importante es un método para la atenuación de BVDV que comprende la mutación de un clon de BVDV en las posiciones de histidina 300 y/o 349, en la que el triplete de codificación se elimina o sustituye.

65



Todavía otro aspecto importante es un método para la atenuación del BVDV, en la que el codón para histidina 300 se sustituye por un codón para leucina.

5 Todavía otro aspecto importante es un método para la atenuación de BVDV, en el que se elimina el codón para histidina 349.

Otro aspecto importante es un clon atenuado de BVDV o cepa de BVDV que se puede obtener por un método descrito en esta memoria.

10 Otra realización importante de la invención es una vacuna que comprende un clon o cepa de BVDV atenuado según la invención, opcionalmente en combinación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente compatible.

15 La invención se refiere, además, al uso de un clon o cepa de BVDV atenuado según la invención en la fabricación de una vacuna para la prevención y el tratamiento de infecciones por BVDV.

20 Preferentemente, una vacuna de la invención se refiere a una vacuna como se ha definido anteriormente, en la cual un componente inmunológicamente activo es un BVDV vivo en el que la actividad de RNasa en su proteína E<sup>RNS</sup> está inactivada. La expresión "vacuna viva" se refiere a una vacuna que comprende una partícula capaz de replicación, en particular un componente viral de replicación activa.

25 Una vacuna según la reivindicación 1 comprende un virus de BVD de tipo 1 atenuado, combinado con un virus BVD de tipo 2 atenuado, o cualquier otro grupo antigénico y un vehículo o excipiente farmacéuticamente compatible. Dicha vacuna se puede administrar como vacuna combinada. De forma muy preferente, dicho virus de BVD de tipo 1 atenuado según la invención se puede administrar en primer lugar, seguido de la administración de un virus de BVD de tipo 2 atenuado según la invención, tres a cuatro semanas más tarde.

30 Una vacuna según la invención comprende un virus de BVD de tipo 1 atenuado según la invención, en el que la actividad de RNasa en su proteína E<sup>RNS</sup> está inactivada, combinado con un virus de BVD de tipo 2 atenuado, en el que la actividad de RNasa en su proteína E<sup>RNS</sup> está inactivada, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente compatible. Dicha vacuna se puede administrar como una vacuna combinada. De forma muy preferente, dicho virus de BVD de tipo 1 atenuado según la invención, como se ha descrito anteriormente, se puede administrar en primer lugar, seguido de la administración de un virus de BVD de tipo 2 atenuado según la invención, como se ha descrito anteriormente, tres a cuatro semanas más tarde.

35 La invención se refiere preferentemente a un método para tratar un animal bovino infectado por BVDV con un BVDV atenuado según la invención, como se ha descrito anteriormente, en el que dicho BVDV atenuado o la composición de vacuna, como se ha descrito anteriormente, se administra al animal bovino que la necesita a una dosis adecuada, según los conocimientos de los expertos en la técnica, monitorizando la reducción de los síntomas de BVDV tales como viremia y leucopenia y/o fiebre y/o diarrea. Preferentemente, este tratamiento se puede repetir. Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar adicionalmente la presente invención.

### Ejemplo 1

#### 45 MATERIALES Y MÉTODOS

**Células y virus.** Se obtuvieron células MDBK de la American Type Culture Collection (Rockville, Md). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero de ternero fetal al 10% (FCS; analizado para comprobar la ausencia de pestivirus y anticuerpos contra pestivirus) y aminoácidos no esenciales.

50 La cepa de la diarrea viral bovina New York '93 (aislado de campo VLSn<sup>o</sup>399) fue gentilmente proporcionada por E.J. Dubovi (Facultad de Medicina Veterinaria del Estado de Nueva York, Universidad Cornell, Ithaca). El virus se sometió a un pasaje por animal y se designó posteriormente como "New York '93/C".

**Infección de células, ensayo de inmunofluorescencia y ensayo de peroxidasa viral.** Puesto que los pestivirus se asocian en gran medida con sus células huésped, se utilizaron lisados de células infectadas para la re-infección de las células de cultivo. Los lisados se prepararon congelando y descongelando células 3 a 5 días después de la infección y se almacenaron a -70°C. A menos que se indique lo contrario en el texto, se usó una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 0,1 para la infección de las células de cultivo.

60 Para los ensayos de inmunofluorescencia y peroxidasa, las células infectadas se fijaron con acetona:metanol (1:1) helados durante 15 min a -20°C, se secaron al aire y se rehidrataron con solución salina de tampón fosfato (PBS). A continuación, las células se incubaron con una mezcla de anticuerpos monoespecíficos anti-BVDV dirigidos contra E2 (Weiland et al., 1989). Después de tres lavados con PBS, se utilizó un anticuerpo anti-ratón de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dianova, Hamburgo, Alemania) para detectar los anticuerpos fijados en los ensayos de inmunofluorescencia. Para los ensayos de peroxidasa, se utilizó un anticuerpo anti-ratón de cabra (Dianova) conjugado con peroxidasa como segundo anticuerpo. tras la incubación durante una hora a temperatura

ambiente, las células se lavaron tres veces con PBS. Los anticuerpos fijados se detectaron con una solución compuesta por tampón de acetato sódico 50 mM a pH 5,0, aminoetilcarbazol 1  $\mu$ M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,1%.

**Hibridación de Northern (RNA).** Se preparó RNA 48 horas después de la infección por centrifugación de gradiente de densidad de cesio, como se ha descrito anteriormente (Rümenapf et al., 1989). Se llevaron a cabo electroforesis sobre gel, marcaje radiactivo de la sonda, hibridación y lavados post-hibridación de la forma anteriormente descrita (Rümenapf et al., 1989). Como sonda se utilizó un producto de PCR marcado radiactivamente (nucleótidos 4301 a 5302) de la cepa New York 93/C.

**PCR y RT-PCR.** Se efectuó la PCR con *Tfi*-Polimerasa (Promega, Mannheim, Alemania) o con Taq-Polimerasa (Appligene, Heidelberg, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando aprox. 50-100 ng de modelo de DNA y 25 pmol de cada cebador. Las secuencias de los cebadores usados para la amplificación del extremo 5' del genoma fueron, aguas arriba, cebador T<sub>25</sub>V (Display Systems Biotech, Copenhague, Dinamarca); y aguas abajo, CM79: CTCCATGTGCCATGTACAGCAGAG para el primer ciclo y CM86: CTCGTCCACATGGCATCTCGAGAC para la PCR anidada. Los cebadores usados para la amplificación del extremo 3' del genoma fueron, aguas arriba, CM46: GCACTGGTGTCCTTTG para el primer ciclo y CM80: GAGAAGGCTGAGGGTGATGCTGATG para la PCR anidada, y aguas abajo, nls-: GACTTTCCGCTTCTTTTATAGG. La PCR de transcripción inversa (RT-PCR) se llevó a cabo con el sistema de RT-PCR Titan<sup>®</sup> de Un Tubo (Boehringer Mannheim, Alemania), usando 2  $\mu$ g de RNA total como modelo y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores para la amplificación de la región de codificación de E<sup>ms</sup> fueron, aguas arriba: CM28: GGAGAGAATATCACCCAGTG; y aguas abajo, CM21: CTCCACTCCGCAGTATGGACTTGC. Los productos de RT-PCR amplificada se purificaron por electroforesis sobre gel de agarosa preparativa y elución con el kit Nucleotrap (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), según las recomendaciones del fabricante.

**Fosforilación y unión de los DNA-oligonucleótidos a los extremos 3' de RNA.** Para la unión de un cebador de DNA al extremo 3' del genoma del virus, el cebador se fosforiló. Se incubaron 10  $\mu$ g del oligonucleótido nls+: CCTAAAAGAAGCGGAAAGTG con 5 unidades de oligonucleótido-quinasa T4 (New England Biolabs, Schwalbach, Alemania) en 30 l de una mezcla de quinazas (ATP 2 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotritol 10 mM, 25  $\mu$ g/ml de albúmina de suero bovino) durante 40 min a 37°C. El cebador se hizo pasar a través de una columna de rotación Sephadex G-15 (Sambrook et al., 1989) y se purificó adicionalmente por extracción de fenol/cloroformo y precipitación de etanol.

La unión se llevó a cabo usando 5  $\mu$ g de RNA total preparado a partir de células de cultivo infectadas y 150 pmol del oligonucleótido fosforilado con 20 unidades de T4-RNA-Ligase (New England Biolabs, Schwalbach, Alemania) en 50  $\mu$ l de mezcla de ligasas (Tris-HCl 50 mM pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotritol 10 mM, ATP 1 mM, polietilenglicol al 40% y 50 unidades de guardia de RNA (Amersham, Friburgo, Alemania) durante 16 horas a 17°C. El producto se purificó por extracción de fenol/cloroformo y precipitación de etanol.

**Síntesis y adición de colas de DNA de cadena sencilla.** Se generó DNA (-) de cadena sencilla a partir del extremo 5' del genoma viral con DisplayThermo-RT transcriptasa inversa (Display Systems Biotech, Copenhague, Dinamarca) usando 2  $\mu$ g de RNA total procedente de células infectadas y 100 pmol de cebador CM79 (Véase "PCR y RT-PCR") y siguiendo las instrucciones del fabricante (reacción: 65°C durante 10 min, 42°C durante 40 min, 65°C durante 15 min). El DNA se purificó mediante dos extracciones secuenciales de fenol/cloroformo y precipitaciones de etanol con 1/4 vol de acetato de amonio 10 M (Schaefer, 1995).

Se añadió una cola poli-dA a la primera cadena de cDNA con desoxinucleotidil-transferasa Terminal (TdT) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) usando 50% del producto de "primera cadena", 50 unidades de transferasa terminal, dATP 6,25  $\mu$ M y CoCl<sub>2</sub> 1,5 mM en 50  $\mu$ l de tampón TdT, según recomienda el fabricante. Tras la incubación a 37°C durante 30 min, el producto se purificó por extracción de fenol/cloroformo y precipitación de etanol.

**Construcción de una biblioteca de cDNA y secuenciación de nucleótidos.** La síntesis de cDNA, clonación y análisis de la biblioteca se llevaron a cabo por lo general de la forma anteriormente descrita (Meyers et al., 1991). La síntesis de cDNA se cebó con oligos BVD13, BVD14 y BVD15 (Meyers et al., 1991), así como con B22.1R (GTTGACATGGCATTTCGTG), B12.1R (CCTCTTATACGTTCTCACAACG), BVD33 (GCATCCATCATXCC-RTG<sup>A</sup>T<sub>6</sub>AT), N7-3-7 (CAAATCTCTGATCAGTTGTTCCAC), B23-R1I (TTGCACACGGCAGGTCC) y B-3' (GTCCCCCGGGGGCTGTTAAGGGT-TTTCCTAGTCCA). La sonda usada para el análisis de la biblioteca fue el inserto XhoI/AatII de un clon de cDNA de la cepa de BVDV cp7 (n<sup>o</sup> de acceso de GenBank U63479, Meyers et al., 1996b); la hibridación se llevó a cabo a 52°C.

Se utilizaron exonucleasa III y nucleasa S1 para establecer bibliotecas de delección de clones de cDNA (Henikoff, 1987). La secuenciación de nucleótidos de DNA de cadena doble se llevó a cabo con un Kit de Secuenciación BigDye Terminator Cycle (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania). Como norma, se secuenciaron las dos cadenas de los clones de cDNA; los solapamientos entre clones de cDNA independientes se secuenciaron en al menos dos clones. En total, se analizaron alrededor de 47.000 nucleótidos, lo que equivale a una cobertura global de ~ 3,8 para todo el genoma. Los análisis de alineaciones de secuencias se realizaron con el software de Genetics Computer Group (Devereux et al., 1984).

**Construcción del clon de cDNA de longitud total.** Los procedimientos de restricción, clonación y otros convencionales se llevaron a cabo, por lo general, de la forma descrita en la bibliografía (Sambrook et al., 1989). Las enzimas de restricción y de modificación se adquirieron en New England Biolabs (Schwalbach, Alemania), Pharmacia (Friburgo, Alemania), GibcoBRL (Eggenstein, Alemania) y Boehringer Mannheim (Alemania).

Para la construcción del clon de cDNA de longitud total se utilizaron cinco clones de cDNA de la biblioteca: plásmido C3/8 (nucleótidos 35 a 2411), plásmido C5/11 (nucleótidos 22 a 2400), plásmido 8/11 (nucleótidos 3400 a 7814), plásmido 13/27 (nucleótidos 4783 a 9910) y plásmido C4/24 (nucleótidos 8658 a 12322). Por RT-PCR se obtuvo un fragmento "RT-E2" que iba desde la posición de nucleótido 2144 hasta la posición 4447 con cebadores CM29 (GATGTAGACACATGCGACAAGAACC) y CM51 (GCTTCCACTCTTATGCCTTG), usando RNA de células MDBK infectadas con el aislado de campo VLSn<sup>o</sup>399 como modelo. En la descripción siguiente, se subrayan los sitios de restricción del plásmido que flanquean los insertos de cDNA viral.

En primer lugar, se cortó el clon 3/8 con *Aafl* e *HindIII* y se transfirió el inserto de cDNA a pACYC177 cortado con las mismas enzimas. El plásmido resultante se designó pKANE5. El producto de RT-PCR "RT-E2" se insertó en los sitios *NdeI* / *HindIII* de este plásmido tras la restricción con las mismas enzimas; el plásmido resultante fue pKANE8. A continuación, el fragmento *Aafl* del clon 5/11 se transfirió en el sitio *Aafl* de pKANE8, dando lugar al plásmido pKANE14.

El extremo 5' del clon de cDNA recombinante se generó por PCR con cebadores CM87 (GCTCTAGACGGCCGTAATAC-GACTCACTATAGGTATACGAGATTAGCTAAAGAAGCTGATATGGATTGGACGTCAAC) que introduce una secuencia promotora T7 aguas arriba del primer nucleótido de cDNA, y CM79 (véase "PCR y RT-PCR"); se utilizó el plásmido C5/11 como modelo de PCR. El producto de PCR se unió a los sitios *XbaI* y *BsrGI* del clon de cDNA C5/9, dando como resultado el plásmido pKANE22. Posteriormente, se observó que el oligo CM87 contenía un nucleótido falso y se reparó pKANE22 por PCR con los oligos CM88 (GACGGCCGTAATACGACTCACTATAGTATACG) y CM79. El producto de PCR se trató con DNA-polimerasa I de *E. coli* (fragmento de Klenow) para producir extremos romos y a continuación se restringió con *BsrGI*. Se clonó en los sitios *SpeI*<sup>romo</sup> / *BsrGI* de pKANE22, dando como resultado el plásmido pKANE22A.

El inserto del clon de cDNA 8/11 se cortó con *XhoI* y *BamHI* y se clonó en pACYC177 cortado con las mismas enzimas; el plásmido resultante se denominó pKANE6. El fragmento *AvrII* / *BamHI* del clon de cDNA 13/27 se transfirió a pKANE6, dando el plásmido pKANE15. A continuación, se insertó el fragmento *EcoRV* / *MfeI* de pKANE14 en pKANE15, digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante fue pKANE21. pKANE21 se digirió con *SacII* y *EcoRV* y se clonó un fragmento correspondiente de pKANE14 en estos sitios, conduciendo al plásmido pKANE24. Entonces, se clonó el fragmento *SacII* / *SacII* de pKANE22A en pKANE24, cortado con la misma enzima. El plásmido resultante fue pKANE28All.

El extremo 3' del genoma se generó por PCR con cebadores B2-11500 (CCTAACCATGATATATGCCTTCTG) y CM81 (CGGA-ATTCGCCCGGGCTGTTAGAGGTCTTCCCTAGT) que añade un sitio *SrfI* al extremo 3' del genoma. El producto de PCR se cortó con *BamHI* y *EcoRI* y se clonó en pACYC177, dando como resultado el plásmido pKANE17. A continuación, se transfirió el fragmento *SacI* / *KpnI* del clon de cDNA C4/24 a pKANE17; el plásmido se denominó pKANE20. Se escindió el fragmento *StuI* / *EcoRI* de pKANE20 y se clonó en el plásmido pKANE21, que se digirió con *EcoRI* y fue parcialmente digerido con *StuI*. El plásmido resultante fue pKANE23. Por último, se insertó el fragmento *XbaI* / *PshAI* de pKANE28All en el plásmido pKANE23 cortado con las mismas enzimas, dando lugar al clon de cDNA de longitud total pKANE40.

**Mutagénesis dirigida al sitio.** Todos los mutantes se generaron por PCR usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene, Amsterdam, Holanda) siguiendo las instrucciones del fabricante. EL plásmido utilizado para introducir mutaciones en la región que codifica E<sup>79S</sup> fue C5/9, un clon obtenido de la biblioteca de cDNA inicial (nucleótidos 50 a 2411). Los oligonucleótidos para generar H<sup>346</sup>Δ fueron CM126 (GAGTGAATAAAGGTTGGTGTAAC) y CM127 (GTTACACCAACCTTTATTCCACTC), los oligos para el mutante H<sup>297</sup>L fueron CM128 (AACAGGAGTCTATTAGGAATTTGGCCA) y CM129 (TGGCCAAATTCCTAATAGACTCTGTT). La presencia de las mutaciones deseadas y la ausencia de mutaciones de segundo sitio se verificaron por secuenciación de nucleótidos.

### Transcripción *in vitro* y transfección de RNA

La transcripción de RNA y la transfección de células MDBK se efectuaron básicamente de la forma anteriormente descrita (Meyers et al., 1996a). En pocas palabras, se linealizaron 2 µg de la correspondiente construcción de cDNA con *SrfI* y se purificaron por extracción de fenol y precipitación de etanol. La transcripción con RNA-polimerasa T7 (NEB, Schwalbach, Alemania) se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl de mezcla de transcripción (Tris-HCl 40 mM, pH 7,5; MgCl<sub>2</sub> 6 mM; espermidina 2 mM; NaCl 10 mM; ATP, GTP, CTP y UTP 0,5 mM para cada uno; ditiotreitól 10 mM; 10 µg/ml de albúmina de suero bovino) con 50 unidades de RNA-polimerasa T7 en presencia de 15 unidades de guardia RNA (Pharmacia, Friburgo, Alemania). Tras la incubación a 37°C durante 1 h, la mezcla de reacción se hizo pasar a través de una columna de rotación de Sephadex G-50 y se purificó adicionalmente por extracción de fenol y precipitación de etanol.

Si no se especifica lo contrario, la transfección se llevó a efecto con una suspensión de aprox.  $3 \times 10^6$  células MDBK y alrededor de 0,5 µg de RNA transcrito *in vitro* unido a DEAE-dextrano (Pharmacia, Friburgo, Alemania). El complejo RNA/DEAE-dextrano se estableció mezclando RNA disuelto en 100 µl de HBSS (5 g de Hepes, 8 g de NaCl, 0,37 g de KCl, 0,125 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 1 g de dextrosa por litro; pH 7,05) con 100 µl de DEAE-dextrano (1 mg/ml en HBSS) e incubación durante 30 minutos sobre hielo. Las células granuladas se lavaron una vez con DMEM sin FCS, se centrifugaron y se volvieron a suspender en la mezcla de RNA/DEAE-dextrano. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, se añadieron 20 µl de dimetilsulfóxido y la mezcla se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Tras la adición de 2 ml de HBSS, las células se aglomeraron y lavaron una vez con HBSS y una vez con medio sin FCS. Las células se re-suspendieron en DMEM con FCS y se sembraron en una placa de 10,0 cm de diámetro. 48 h a 72 h después de la transfección, las células se separaron y sembraron de forma apropiada para posteriores análisis. Se utilizó electroporación para la determinación de la infectividad específica del RNA. Se mezclaron  $3 \times 10^6$  células MDBK en 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin magnesio ni calcio, con cantidades adecuadas de RNA y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 2 mm. La electroporación se realizó con un pulso de 960 µF, 180 voltios en un Progenetor II Hoefer PG 200. A continuación, las células se sembraron en placas de 3,5 cm y se analizaron por inmunofluorescencia aproximadamente 20 h más tarde.

**Determinación de la actividad de RNAsa.** Las células MDBK se infectaron con los virus recombinantes y se cultivaron durante 48 horas. Las células infectadas con un virus de tipo salvaje sirvieron como controles positivos y se usaron células no infectadas como controles negativos. La preparación de las células y la medición de la actividad de RNAsa se llevaron a cabo de la forma descrita anteriormente (Meyers et al., 1999), con la excepción de que la incubación de las sondas a 37°C fue de 30 min en lugar de 1 hora, porque una incubación más prolongada dio como resultado una actividad de fondo considerable en las células MDBK.

**Experimentos animales.** Se llevaron a cabo dos experimentos con animales para ensayar los virus recombinantes. En el primer experimento, se inocularon por vía intranasal 3 animales de ganado bovino manchado (8 a 10 meses de edad) con  $10^5$ TCID<sub>50</sub> por animal. En el segundo experimento, se infectaron por vía intranasal 6 terneros machos Holstein y Holstein cruzados (7 a 10 semanas de edad) con  $5 \times 10^5$ TCID<sub>50</sub>. En el experimento de estimulación, los animales se inocularon con  $5 \times 10^6$ TCID<sub>50</sub>. Antes de la infección, se comprobó que todos los animales estuvieran libres de antígenos y anticuerpos específicos para BVDV. Los diferentes grupos se albergaron en unidades de aislamiento separadas. Se registraron los parámetros clínicos a diario, según se indica en la sección de resultados. Se extrajo sangre de la vena yugular externa en los tiempos indicados en la sección de resultados y se estabilizó con heparina (aprox. 35 U.I./ml), a menos que se usara para la producción de suero.

Con el fin de determinar la presencia de virus en sangre, se prepararon capas leucocíticas (en inglés, "buffy coats") a partir de todas las muestras de sangre. Se añadieron 5 ml de tampón de lisis helado a una parte alícuota de sangre estabilizada con heparina (que contenía aprox.  $10^7$  leucocitos) y se incubó sobre hielo durante 10 min, seguido de centrifugación. El granulado se lavó una vez con tampón de lisis y dos veces con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  antes de volver a suspenderlo en 2 ml de PBS. Las células MDBK sembradas en placas de 24 pocillos se inocularon con 200 µl de las preparaciones de capas leucocíticas y se incubaron durante 5 días. El antígeno viral se detectó por microscopia de inmunofluorescencia con la mezcla BVDV E2 mAb (véase más arriba).

La presencia de anticuerpos neutralizantes del virus se ensayó en muestras de suero que habían sido inactivadas por incubación a 56°C durante 30 min. Los sueros se diluyeron en etapas de 1:2 en placas de microtitulación de 96 pocillos y se inocularon con una suspensión de la cepa New York '93/C (100 TCID<sub>50</sub> por pocillo) durante 1 hora a 37°C. Se añadieron  $10^{1,75}$  células MDBK a cada pocillo y se incubó durante 5 días. La infección se analizó por inmunofluorescencia, se calculó por el método de Kaerber (Mayr et al., 1974) y se expresó como la dilución final al 50% que neutralizó aprox. 100 TCID<sub>50</sub>.

Para detectar virus en las secreciones nasales, se recogieron muestras de dichas secreciones en los tiempos indicados en la sección de resultados, se diluyeron en 2 ml de tampón de transporte (PBS suplementado con FCS al 5%, 100 U.I./ml de penicilina G, 0,1 ml de estreptomycin y 2,5 µg/ml de anfotericina B) y se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 µm. Se inocularon células MDBK en placas de 24 pocillos con 100 µl de estas preparaciones y se analizaron por microscopia de inmunofluorescencia indirecta después de 5 días.

## RESULTADOS

**Análisis del genoma.** La cepa NY'93/C es el segundo genoma de BVDV de tipo 2 que ha sido completamente secuenciado. El análisis de transferencia de Northern demostró que, al contrario que la cepa 890 (Ridpath y Bolin, 1995), el genoma de NY'93/C no contiene grandes inserciones o deleciones (datos no mostrados). El análisis de secuencia de nucleótidos reveló que el genoma tiene 12332 nucleótidos de longitud y contiene un marco de lectura abierta que codifica una poliproteína de 3913 aminoácidos.

La región 5' no traducida (posición 1 a 385) se determinó por tecnología RACE y demostró ser idéntica a la secuencia de New York '93 publicada por Topliff y Kelling (1998), excepto la posición 21. Al contrario que otros

genomas de tipo 2 conocidos (Ridpath, 1995; Topliff y Kelling, 1998), la cepa NY'93/C tiene en esta posición adenina en lugar de timina.

**Construcción y análisis de un clon de cDNA infeccioso para NY'93/C.** Aunque se ha establecido una serie de clones de cDNA infecciosos para CSFV y BVDV de tipo 1 (Méndez et al., 1998; Meyers et al., 1996a y 1996b; Moormann et al., 1996; Vassilev et al., 1997; Kümmerer y Meyers, 2000), este es el primer informe de un clon infeccioso de una cepa de BVDV de tipo 2. El clon se diseñó para la transcripción de segunda vuelta con RNA-polimerasa T7, que da como resultado un RNA semejante al genoma sin ninguna adición heteróloga.

El clon de longitud total se constituyó a partir de cuatro plásmidos de cDNA seleccionados de la biblioteca inicial de fagos y un producto de RT-PCR que incluyó la región entre las posiciones 2265 y 4301. En el extremo 5', se añadió la secuencia del promotor T7 para la transcripción *in vitro* y se añadió un sitio *SrfI* al extremo 3' para la linealización del plásmido (Fig. 1). El clon de longitud total se denominó pKANE40A.

Se transfectaron células MDBK con RNA generado a partir del modelo linealizado pKANE40A por transcripción *in vitro*. Como control negativo sirvió un transcrito de segunda vuelta del plásmido pKANE28AII que termina 19 codones aguas arriba de la región de codificación NS5B. Tres días después de la transfección, se detectaron señales específicas de BVDV tras la tinción inmunofluorescente en células transfectadas con RNA de pKANE40A, pero no así en los controles. El virus generado a partir del clon infeccioso pKANE40A se denominó XIKE-A. Las células transfectadas se sometieron a dos pasajes y el stock del segundo pasaje se usó para todos los experimentos posteriores. El virus se analizó por secuenciación de RT-PCR, considerando el intercambio de nucleótidos de C a T en la posición 1630 como prueba de la identidad de XIKE-A.

La infectividad específica del RNA derivado de pKANE40A se determinó en comparación con el RNA preparado a partir de células infectadas con el virus de tipo salvaje NY'93/C. A tal efecto, se midió la concentración de RNA viral en muestras usadas para la transfección de células MDBK, en comparación con cantidades definidas del RNA transcrito *in vitro* tras transferencia Northern e hibridación, utilizando un dispositivo de imágenes fosforescentes. Se transfectaron células MDBK con cantidades similares de ambos RNAs y se contaron las placas tres días después de la transfección. En promedio, la infectividad del RNA derivado de pKANE40A fue  $4,32 \times 10^2$  ufp/ $\mu$ g y el RNA de tipo salvaje dio  $4 \times 10^2$  ufp/ $\mu$ g.

Se analizaron las características de crecimiento del virus recombinante a través de una curva de crecimiento, usando el aislado de campo original VLSn<sup>0399</sup> como control en el mismo experimento (Fig. 2). Se infectaron células MDBK con una m.o.i. de 0,1 y se tomaron muestras a siete intervalos desde 2 horas hasta 96 horas después de la infección. La curva de crecimiento del XIKE-A recombinante es algo más plana que la de VLSn<sup>0399</sup>, pero ambos virus alcanzan un título de  $10^{6,39}$  después de 96 horas. Se consideró, por tanto, que XIKE-A es adecuado para posteriores experimentos.

**Construcción y análisis de mutantes E<sup>ms</sup>.** Experimentos previos con CSFV (Meyers et al., 1999) habían demostrado que la actividad de RNAsa de la glicoproteína E<sup>ms</sup> se destruye por la sustitución de histidina 297 ó 346 (las cifras representan las posiciones del residuo en la cepa de CSFV Alfort/Tübingen) por leucina o lisina, o por delección del codón "H346". Los virus mutantes son viables, pero están clínicamente atenuados. En la cepa de BVDV NY'93/C, los dos residuos de histidina están localizados en las posiciones 300 y 349, respectivamente. Para ensayar si los efectos de mutaciones en estas posiciones pudiesen ser similares a CSFV en el genoma del BVDV de tipo 2, se desarrollaron por ingeniería dos clones infecciosos con una delección del codón "H349" o una sustitución del codón "H300" por leucina. Los mutantes virales resultantes se denominaron XIKE-B (H349Δ) y XIKE-C (H300L). Ambos mutantes fueron estables en células MDBK durante al menos cinco pasajes, según se determinó por secuenciación de nucleótidos de productos de RT-PCR que comprenden la región de codificación E<sup>ms</sup>. Las características de crecimiento de los dos virus mutantes se compararon con el virus derivado del clon infeccioso de tipo salvaje XIKE-A (Fig. 3).

Se determinó la actividad de RNAsa de XIKE-A, XIKE-B y XIKE-C en extractos celulares brutos de células infectadas con la misma m.o.i. de cualquiera de los virus dos días después de la infección. Se analizó la capacidad de degradar poli(U) de partes alícuotas de las preparaciones; las células infectadas con la cepa de tipo salvaje NY'93/C sirvieron como control positivo y se usaron células no infectadas como controles negativos. Después de 30 min de incubación, precipitó el RNA de alto peso molecular, residual, y la medición de OD<sub>260</sub> de los sobrenadantes reveló la presencia de pequeños fragmentos degradados de RNA (Meyers et al., 1999). Se encontró una elevada actividad de RNAsa en las muestras de NY'93/C y XIKE-A, en tanto que los dos mutantes, XIKE-B y XIKE-C, se encontraron al mismo nivel que el control negativo (Fig. 4).

**Experimentos animales con XIKE-A y NY'93/C.** El propósito del primer experimento animal fue comparar la virulencia y patogenia del virus recombinante XIKE-A derivado del clon de cDNA infeccioso con la cepa de tipo salvaje NY'93/C. Se infectaron dos grupos de tres animales (8 a 9 meses de edad) con  $10^5$ TCID<sub>50</sub> de XIKE-A (animales n° 615, n° 377, n° 091) o NY'93/C (animales n° 275, n° 612, n° 1610). Cada grupo se albergó en una unidad de aislamiento separada. Se registraron a diario la temperatura corporal y signos clínicos; se tomaron muestras de sangre en los días 0, 2 a 16 21 después de la infección para el recuento de leucocitos y detección de viremia. Se recogieron sueros de todos los terneros para la detección de anticuerpos neutralizantes contra NY'93/C

en los días 0, 7, 14, 21, 19 y 35 después de la infección. Se realizaron frotis nasales para aislamiento del virus en los días 0, 2 a 16 y 21 después de la infección.

Aislamiento de virus a partir de preparaciones de capas leucocíticas							Aislamiento de virus a partir de frotis nasales					
Día p.i.	n° 275	n° 612	n° 1610	n° 615	n° 377	n° 091	n° 275	n° 612	n° 1610	n° 615	n° 377	n° 091
-26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	++	-	-	-+	++	++	-	-	-	-	-	-
4	-+	++	++	++	++	-+	-	-	-	-	-	-
5	++	++	+-	++	++	++	-	-	-	-	-	-
6	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
7	++	-+	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
8	++	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	++	-	++	+-	-	++	++	++
10	-	-	-	-	-	-	bac	-	-	+-	bac	+-
11	++	-	-	-	-	-	bac	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	*
15	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	*
16	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	*
21	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	*
Total												
∅	7	4	4	6	7	7	1	1	0	2	1	2
		5			6,7			0,7		1,7		

5 Tabla 1: aislamiento de virus a partir de preparaciones de capa leucocítica y frotis nasales de animales infectados con New York '93/C o XIKE-A. + Virus detectado; - ausencia de detección de virus; bac = bacterias; \* el animal se sometió a eutanasia el día 13 después de la infección.

10 Todos los animales en ambos grupos desarrollaron fiebre (Fig. 5) y un amplio espectro de signos clínicos, incluidos síntomas respiratorios y trastornos gastrointestinales. El animal n° 091 fue sacrificado el día 13 después de la infección por motivos humanitarios. Todos los terneros de ambos grupos mostraron leucopenia que se inició el día 3 después de la infección y que persistió hasta el día 15 después de la infección (Fig. 6). El virus se detectó en las preparaciones de capa leucocítica de animales infectados con NY'93/C durante 5 días y con XIKE-A durante 7 días. Se observó secreción nasal durante 1 ó 2 días (Tabla 1).

15 La identidad de los virus se comprobó por secuenciación de nucleótidos de productos de RT-PCR de RNA preparado a partir de las preparaciones de capa leucocítica de todos los animales. Se secuenció la totalidad de la región de codificación E<sup>rns</sup> (posiciones 1140 a 1780) y se demostró que era idéntica a las secuencias conocidas de NY'93/C o XIKE-A, respectivamente. Se encontraron anti-cuerpos neutralizantes en el suero de todos los terneros a partir del día 14 después de la infección (Tabla 2).

Días p.i.	615	377	091	275	612	1610
-26	<2	<2	<2	<2	<2	<2
0	<2	<2	<2	<2	<2	<2
7	<2	<2	<2	<2	<2	<2
13/14	645	323	406	256	128	40
21	1024	1290	*	1290	512	51
29	2580	4096	*	813	2580	2580
35	3251	3251	*	8192	2580	5161

\* El animal se sometió a eutanasia el día 13

25 Tabla 2. Títulos de anticuerpos neutralizantes determinados en muestras de suero de todos los terneros después de la infección experimental con New York '93/C o XIKE-A. Los resultados se expresan como el recíproco de los títulos de anticuerpos neutralizantes específicos para BVDV en suero contra New York '93/C ( $10^{2,07} \text{TCID}_{50}$ ).

30 Los resultados de este estudio demostraron que el virus recombinante XIKE-A es muy similar al virus de tipo salvaje New York '93/C con respecto tanto a la patogenia como a la inducción de una respuesta inmunológica en el huésped natural. Resulta, por tanto, posible suponer que cualquier desviación de este cuadro clínico que pudiera observarse en un mutante viral generado sobre la base del clon infeccioso pKANE40A estaría causada por la mutación deseada.

**Experimento animal con XIKE-B y XIKE-A.** En el segundo experimento con animales, se analizaron las características clínica e inmunológicas del mutante RNAsa-negativo XIKE-B, en comparación con XIKE-A. El mutante H349Δ recibió precedencia sobre el mutante H300L para minimizar el riesgo de reversión genómica al tipo salvaje.

En dos grupos de tres terneros cada uno (de 7 a 10 semanas de edad) se inoculó una dosis de  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> de XIKE-A (animales n° 387, n° 388, n° 418) o virus XIKE-B (animales n° 415, n° 417, n° 419). Los grupos se albergaron en unidades separadas de aislamiento. Diariamente se controlaron la temperatura rectal y los síntomas clínicos; se tomaron frotis nasales y muestras de sangre en los días -8, 0, 2 a 14, 17 y 21. Se recogieron muestras de suero en los días 0, 8, 12/14, 21, 28 y 38/40.

Nueve a diez días después de la infección, los terneros infectados con XIKE-A desarrollaron fiebre por un período de hasta 3 días; además, el animal n° 387 tuvo fiebre el día 3 después de la infección (Fig. 7), que se acompañó de diarrea y síntomas respiratorios. El ternero n° 388 sufrió convulsiones. El grupo se sometió a eutanasia por razones humanitarias el día 12 después de la infección, en un estado de marcada depresión y anorexia. Ninguno de los terneros infectados con XIKE-B mostró aumento de la temperatura corporal (Fig. 7). Sólo se observaron leves síntomas respiratorios hasta el día 6. Se observó leucopenia en todos los animales; sin embargo, el descenso del número de leucocitos fue más pronunciado en los terneros infectados con XIKE-A de tipo salvaje que en el grupo XIKE-B (Fig. 8).

Se detectó el virus en las preparaciones de capas leucocíticas de todos los animales a partir del día 4 después de la infección; no obstante, la viremia fue más breve para el mutante E<sup>rns</sup> (Ø 4 días) que para el virus con la secuencia de tipo salvaje (Ø 8 días). Se pudo observar secreción nasal del virus durante un período de hasta 8 días (Ø 4,7) en los animales de XIKE-A, pero sólo durante un máximo de 1 día (Ø 0,7) en los animales de XIKE-B (Tabla 3).

Aislamiento de virus a partir de preparaciones de capa leucocítica      Aislamiento de virus a partir de frotis nasales

Días p.i.	n° 415	n° 417	n° 419	n° 387	n° 388	n° 418	n° 415	n° 417	n° 419	n° 387	n° 388	n° 418
-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+-	+-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-
5	++	+-	+-	++	++	++	-	-	-	-	-	+-
6	++	+-	++	++	++	++	-	+-	-	-	-	+-
7	++	++	++	++	++	++	-	-	+-	+-	-	+-
8	-	+-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	+-
9	-	-	-	++	+-	++	-	-	-	++	++	+-
10	-	-	-	++	+-	+-	-	-	-	+-	+-	++
11	-	-	-	++	+-	++	-	-	-	+-	-	+-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
13	-	-	-	*	*	*	-	-	-	*	*	*
14	-	-	-	*	*	*	-	-	-	*	*	*
17	-	-	-	*	*	*	-	-	-	*	*	*
21	-	-	-	*	*	*	-	-	-	*	*	*
total	4	5	3	8	8	8	0	1		4	2	8
Ø		4			8			0,7	1		4,7	

Tabla 3. Aislamiento de virus a partir de preparaciones de capa leucocítica y frotis nasales de animales infectados con el virus recombinante XIKE-A (animales n° 387, n° 388 y n° 418) o el mutante E<sup>rns</sup> XIKE-B (animales n° 415, n° 417 y n° 419). + Virus detectado, - ausencia de detección de virus, \* animales sometidos a eutanasia el día 12 después de la infección.

Nuevamente, se utilizó la secuenciación de nucleótidos de productos de RT-PCR que comprendían la totalidad de la región de codificación E<sup>rns</sup> para la identificación del virus en las preparaciones de capa leucocítica. Como era de esperar, los aislados de los animales n° 387, n° 388 y n° 418 fueron del tipo salvaje. Se confirmó una delección del codón "H349" para los animales n° 415, n° 417 y n° 419. Es interesante destacar que se encontró una mutación puntual adicional en los productos de RT-PCR de dos de estos animales (n° 415 y n° 419): la posición de nucleótido 1246 cambió de guanina a timina, dando como resultado la sustitución del aminoácido Q287H. Se detectaron por primera vez anticuerpos neutralizantes el día 12 después de la infección en el suero de terneros infectados con XIKE-A y el día 14 después de la infección en el suero de terneros infectados con el mutante E<sup>rns</sup> (Tabla 4).

Días p.i.	387	388	418	415	417	419
0	<2	<2	<2	<2	<2	<2
8	<2	<2	<2	<2	<2	<2
12/14	20	8	128	51	203	64
21	*	*	*	512	1024	406
28	*	*	*	2048	1024	4096
38/40	*	*	*	8182	4096	4096

\* los animales se sometieron a eutanasia el día 12.

5 Tabla 4: Títulos de anticuerpos neutralizantes determinados en muestras de suero de todos los terneros después de la infección experimental con XIKE-A (secuencia de tipo salvaje) o XIKE-B (H346?). Los resultados se expresan como el recíproco de los títulos de anticuerpos neutralizantes específicos para BVDV en suero contra New York '93/C ( $10^{1,7}$ TCID<sub>50</sub>).

10 **Ejemplo 2**

Diseño experimental

çSe seleccionaron 12 novillas preñadas de un rebaño negativo para BVDV. Se incluyó en el ensayo el siguiente grupo de 5/7 novillas:

15

	Nº	Inoculación	Virus
<u>Grupo 1:</u>	5	Una administración i.n., 3 ml en cada fosa nasal	XIKE-A
Grupo 2:	5	Una administración i.n., 3 ml en cada fosa nasal	NY-93

20 Las novillas se trasladaron a las instalaciones experimentales 8 días antes de las inoculaciones. Se confirmó la preñez después del transporte a la instalación experimental. Las novillas estaban en el día 60 a 90 de gestación el día de la inoculación. La inoculación se llevó a efecto en todos los animales en un mismo momento con  $2,5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml del correspondiente virus, aplicados en 6 ml de sobrenadante de cultivo de tejido.

25 En las novillas se controló la presencia de signos clínicos de infección por BVDV, incluido el aborto, durante el período de observación. El experimento finalizó 9 semanas después de la infección. Las vacas que no abortaron se sacrificaron y se examinaron y recolectaron sus úteros. Se tomaron muestras de los órganos fetales durante la necropsia de rutina y se examinaron en busca de infección por BVDV.

30 La presencia de infección fetal fue el principal parámetro de evaluación, compuesto por el índice de mortalidad de vacas relacionada con el BVDV, el número de abortos relacionados con el BVDV y el número de fetos BVDV-positivos a término.

Resultados:

30

Grupo 1

35

Animal nº	Conclusión
526	Aborto por BVD
598	Aborto por BVD
615	Aborto por BVD
618	Aborto por BVD
626	Novilla muerta por BVD

40

Grupo 2

45

Animal nº	Conclusión
184	Novilla muerta por BVD
203	Aborto por BVD
232	Novilla muerta por BVD
233	Feto BVD-positivo (virémico)
252	Aborto por BVD
267	Novilla muerta por BVD
306	Aborto por BVD

55



**Bibliografía**

- Baker, J.C. 1987. Bovine viral diarrhea virus: a review. *J. AM. Vet. Med. Assoc.* 190: 1449-1458
- 5 Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M., Thiel, H.J., 1999. genetic Diversity of Pestivirus: Identification of Novel Groups and Implications for Classification. *Virology* 262: 64-71.
- Bolin, S.R., Littledike, E.T. and Ridpath, J.F. (1991): Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhea viruses in a vaccinated herd. *Am. J. Vet. Res.* 52:1033-1037.
- 10 Devereux, J., Haerberli, P. and Smithies, O. (1984): A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12:387-195.
- Flores, E.F., Gil, L.H., Botton, S.A., Weiblen, R., Ridpath, J.F., Kreutz, L.C., Pilati, C., Driemeyer, D., Moojen, V. and Wendelstein, A.C. (2000): Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet. Microbiol.* 77:175-83.
- 15 Henikoff, S. (1987): Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. *Methods Enzymol.* 155:156-165.
- 20 Hulst, M.M., Panoto, F.E., Hoekman, A., van Gennip, H.G. and Moormann, R.J. (1998): Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E(rns) of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus. *J. Virol.* 72:151-7.
- Kümmerer, B.M., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H. and Meyers, G. (2000): The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet. Microbiol.* 77:117-28.
- 25 Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B. and Wittmann, G. (1974): *Virologische Arbeitsmethoden Band I.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- 30 Méndez, E., Ruggli, N., Collett, M.S. and Rice, C.M. (1998): Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 72:4737-45.
- Meyers, G., Tautz, N., Dubovi, E.J. and H.-J- Thiel (1991): Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin-coding sequences. *Virology* 180:602-616.
- 35 Meyers, G., Thiel, H.J. and Rumenapf, T. (1996a): Classical swine fever virus: recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles. *J. Virol.* 70:1588-95.
- 40 Meyers, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J., Kümmerer, B.M. (1996b): Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.* 70:8606-13 (erratum *J. Virol.* 1997, 71:173)
- Meyers, G., Saalmüller, A. and Büttner, M. (1999): Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein Erns of the pestivirus classical swine fever virus leads to virus attenuation. *J. Virol.* 73: 10224-10235.
- 45 Moennig, V. and Liess, B. 1995. Pathogenesis of Intrauterine Infections with Bovine Viral Diarrhea Virus. 11: (3), 477-487.
- 50 Moennig, V. and Plagemann, J. 1992. The pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 41:53-91.
- Moormann, R.J., van Gennip, H.G., Miedema, G.K., Hulst, M.M. and van Rijn, P.A. (1996): Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J. Virol.* 70:763-70.
- 55 Oirschot van, J.T., Brusckhe, C.J.M., Rijn van, P.A., 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 64:169-183.
- Racaniello, V.R. and Baltimore, D., 1981. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 214:916-919.
- 60 Ridpath, J.F., Bolin, S.R. and Dubovi, E.J. (1994): Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* 205:66-74.
- 65 Ridpath, J.F. and Bolin, S.R. (1995): The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology* 212:39-46.

- Ridpath, J.F., Neill, J.D. (2000): Detection and characterization of genetic recombination in cytopathic type 2 bovine viral diarrhea viruses. *J. Virol.* 74:8771-4.
- 5 Ridpath, J.F., Neill, J.D., Frey, M., Landgraf, J.G. (2000): Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet. Microbiol.* 77:145-55.
- Rümenapf, T., Meyers, G., Stark, R. and Thiel H.-J. (1989): Hog cholera virus characterization of specific antiserum and identification of cDNA clones. *Virology* 171:18-27.
- 10 Sambrook, S.E., Fritsch, F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schaefer, B.C. (1995): Revolutions in Rapid Amplification of cDNA Ends: New Strategies for Polymerase Chain Reaction Cloning of Full-Length cDNA Ends. *Anal. Biochem.* 227:255-273.
- 15 Thiel, H.-J., Stark, R., Weiland, E., Rümenapf, T. and Meyers, G. (1991): Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* 65:4705-4712.
- Thiel, H.-J., Plegemann, G.W. and Moennig, V. 1996. The pestiviruses. In *Fields Virology*, eds. Fields, B.N., Knipe, D.M., and Howley, P.M. (Lippincott-Raven, Philadelphia), pp. 1059-1073.
- 20 Tijssen, P. Pellerin, C., Lecomte, J. (1996): Immunodominant E2 (gp53) sequences of highly virulent bovine viral diarrhea group II viruses indicate a close resemblance to a subgroup of border disease viruses. *Virology* 217:356-361.
- 25 Topliff, C.L. and Kelling, C.L. (1998): Virulence markers in the 5' untranslated region of genotype 2 bovine viral diarrhea virus isolates. *Virology* 250:164-72.
- Van Gennip, H.G., van Rijn, P.A., Widjoatmodjo, M.N., Moormann, R.J. (1999): Recovery of infectious classical swine fever virus (CSFV) from full-length genomic cDNA clones by a swine kidney cell line expressing bacteriophage T7 RNA polymerase. *J. Virol. Methods* 78:117-128.
- 30 Vassilev, V.B., Collett, M.S. and Donis, R.O. (1997): Authentic and chimeric full-length genomic cDNA clones of bovine viral diarrhea virus that yield infectious transcripts. *J. Virol.* 71:471-8.
- 35 Weiland, E., Thiel, H.-J., Hess, G. and Weiland, F. (1989): Development of monoclonal neutralizing antibodies against bovine viral diarrhea virus after pre-treatment of mice with normal bovine cells and cyclophosphamide. *J. Virol. Methods.* 24:237-244.
- 40

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH
- 5 <120> Virus infeccioso de la diarrea viral bovina
- <130> 1-1249
- <140> no asignada
- 10 <141> 2001-09-06
- <160> 25
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- 15 <210> 1
- <211> 12332
- <212> DNA
- <213> Virus de la diarrea viral bovina (BVDV)
- 20

ES 2 401 072 T3

<400> 1  
gtatacagaga ttagctaaag aactcgtata tggattggac gtcaacaaat ttttaattgg 60  
caacgtaggg aaccttcccc tcagcgaagg ccgaaaagag gctagccatg cccttagtag 120  
gactagcaaa agtaggggac tagcggtagc agtgagttcg ttggatggcc gaaccctga 180  
gtacagggga gtcgtcaatg gttcgacact ccattagtctg aggagtctcg agatgccatg 240  
tggacgaggg catgcccacg gcacatctta acccatgctg gggttgcatg ggtgaaagcg 300  
ctattcgtgg cgttatggac acagcctgat aggggtgtagc agagacctgc tattccgcta 360  
gtaaaaactc tgctgtacat ggcacatgga gttgttttca aatgaacttt tatacaaaac 420  
atataaacia aaaccagcag gcgtcgtgga acctgtttac gacgtcaacg ggcgccact 480  
gtttggagag agcagtgact tgcacccgca gtcaacacta aaactaccac accaacgagg 540  
cagcgccaac atcctgacca atgctaggtc cctaccgctg aaaggtagct gccggagagg 600  
taatgtgtat ggaccggtga gtggcatcta tatcaaacca ggaccgatct actaccagga 660  
ttatgtgggc cccgtctatc atagagcccc actggaacta ttagggagg caagtatgtg 720  
cgaacaactc aggagagttg gcagagtgac cggtagtgat gggaaattat atcatatcta 780  
catctgcata gatgggtgta tcctcctgaa gaggcgact aggaaccaac cagaagtcct 840  
gaaatgggta tacaacagat taaattgtcc tttatgggtc accagctgct ccgatgaagg 900  
gagcaagggt gctacaagta agaagcagcc taagccagat aggatagaaa aaggtaagat 960  
gaaaatagcc ccaaaagaga cagaaaaaga ttgcaaaacc agaccccccg acgcgactat 1020  
agtagtagaa ggggttaagt accaggtgaa gaaaaaagga aaggtaaggg gaaaaaatac 1080  
tcaagatggg ttatatcaca acaagaataa gccccctgaa tcaagaaaaa aattggaaaa 1140  
ggcactgctg gcttgggcca tcttagcagc ggtcctgctt cagctggtaa caggagagaa 1200  
tatcaccggg tggaaactga tggacaacgg caccgaggga atacagcaag cgatgttct 1260  
aagagggggt aacaggagtc tacatggaat ttggccagag aaaatttgca cgggagtacc 1320  
aactcactta gcaacagact atgagcttaa agagatagtg gggatgatgg acgcgagtga 1380  
gaagaccaac tacacgtggt gcaggttgca aagacatgag tgggaataaac atggttggtg 1440  
taactggggt catatagaac cgtgggatg gttgatgaac aaaaccctg acaactctgac 1500  
agaagggcaa ccgcttaggg agtgtgctgt gacttgtagg tatgacaagg aaacagaatt 1560  
gaacatcgtg acacaggcta gggacagacc tacaactctg acaggttgca agaaaggcaa 1620  
gaatctctct ttcgcagggt ttatactgga tgggcccctg aactttaag tatcgggtga 1680  
agatgtgctg ttcaaggagc acgattgctg caacatgctg caagagaccg cgatacagct 1740  
actcgatggg gcaaccaaca ccattgaggg agcaagggtg gggacggcca agttgacaac 1800  
ctgggttaggg aagcaattag ggatccttgg taagaagtgt gagaacaaaa gcaagcatg 1860  
gtttggtgca catgcagcaa gtccatactg cggagtggag aggaagatcg gttacgtatg 1920  
gtatacaaaa aactgcactc cagcttgctt tccaagaaac actagaataa taggcccccg 1980  
gaaatctgat accaacgccc aagatggaaa aatactccat gagatggggg ggcacctctc 2040  
agaatctgtc ctattgtcct tgggtggtct gtctgacttt gccccggaaa ccgcgagcgt 2100  
catctacttg gttctacatt ttgcatccc gcaaagccac gttgatgtag acacatgcca 2160  
caagaaccag ctgaatttaa cggtagcaac cacagtagca gaggtcatal cagggacagt 2220  
gtggaaccta gggagtatg tctgcataag accagactgg tggccatatg agacgacgac 2280  
agtcttcgtc atagaggaag ctgcccactc cacagcttct ttaatctttt tagtaaaagc 2400  
cttaactagg atatggaatg ctgcccactc cacagcttct ttaatctttt tagtaaaagc 2400  
actgagggga caactaatcc aagggtatt gtggctgatg ctaataacag gagcacagg 2460  
cttccctgaa tgcaagagg gcttccaata tgccatctct aaagacagga aatgggggt 2520

ES 2 401 072 T3

attggggcca gagagcttaa ctacaacatg gcacctcccc accaaaaaaa tagtggattc 2580  
 catgggtgcat gtatgggtg agggaaaaga cttgaaaata ttaaaaatgt gcacaaagga 2640  
 agagaggat ctagtggctg tgcacgagag agccttatca accagtgccg agtttatgca 2700  
 gatcagtgat gggacaatag gccacagcgt gatagatatg cctgatgact ttgagtttgg 2760  
 actctgccct tgtgactcaa aaccagtgat aaagggcaaaa ttaaatgcc a gcttactgaa 2820  
 tggaccagct ttccagatgg tatgccca ggggtggact ggtacaatag aatgcccct 2880  
 agcgaacc aa gacaccttgg acacaactgt cattaggaca tatagaagaa ctaccccatt 2940  
 tcagcggaga aaatgggtga cctatgaaaa aataataggg gaagatatct atgaatgcat 3000  
 tctaggtgga aactggacat gcataaccgg tgaccatagc aggtgaaag acggacctat 3060  
 caagaagtgt aagtgggtg gccatgactt cgtcaactca gaggggctac cacactacco 3120  
 aataggcaag tgcatgctca tcaacgagag tgggtacagg tatgtagatg acacctcttg 3180  
 cgataggggt ggtgtagcca tagttccatc tggcaccgta aagtgtagaa taggtaacgt 3240  
 cacggtgcaa gttatcgcta ctaacaatga tctgggacct atgccttgca gcccaactga 3300  
 agtgatagca agtgaaggac cagtggaaaa gactgcatgc acattcaact attcaaggac 3360  
 tctaccta at aggtattatg agccaaggga cgggtacttc caacaatata tgttaaaagg 3420  
 ggagtggcaa tattggttcg acctggattc tgtagaccac cacaaagact acttctcaga 3480  
 gttcataatc atagcagtg tgcgcttgtt ggggtgtaag tacgtactgt ggctcttgat 3540  
 aacatacaca atactgtctg agcagatggc tatgggtgct ggagtgaata ctgaagagat 3600  
 agtcatgata ggcaatttgc tgacagacag tgatattgag gttgtggttt atttcttct 3660  
 tctgtactta atagttaaag aggaaactgg gaggaatgg attatactgg tataccacat 3720  
 ccttgtagcc aaccctatga aaacaattgg ggtcgtctta ctaatgctag ggggagtggt 3780  
 gaaggccagc agaatcaatg ctgatgacca aagtgctatg gaccatgct ttcttctcgt 3840  
 gacaggcgtg gtggctgttt tgatgatcgc tagaagagaa cctgccacat taccactgat 3900  
 tgtagcattg ctagcaataa gaacatcagg attcctactg cccgctagca ttgatgtaac 3960  
 tgtagcagta gtattaattg tacttttgtt ggctagctac ataacagact acctagata 4020  
 taaaagagtg cttcaactct tatttagtct gatagctggg atctttatta taaggagctt 4080  
 aaaacata at aaccagatgg aggtaccaga aatatctatg ccaagttgga gacctctagc 4140  
 tctggtcctt ttctatataa catctacagc aataaccact aattgggaca ttgacttagc 4200  
 aggtcttctg ctgcaatggg cgccagcagt gatcatgatg gctaccatgt gggcagactt 4260  
 tttgactctg atcatagtcc tgcccagtt a cgagttatct aagctttact tcctaaagaa 4320  
 cgtcaggaca gacgtggaaa agaactggct cggcaaatg aaatacagac agatcagttc 4380  
 agtttatgac atctgtgaca gtgaggaagc agtgtaacta tttccatcaa ggcataagag 4440  
 tggaaagcagg ccagatttca tattaccttt tttgaaagcc gtgttaataa gctgcatcag 4500  
 cagccaatgg caagtgggtt acatttctta ctaataactg gaaattacat actatatgca 4560  
 caggaaaatc atagatgagg tgtcaggagg agcaaatttt ctatcaagac tcatagcagc 4620  
 catcatagaa ttaaatggg ccatagatga tgaggaatgt aaaggactga agaaactgta 4680  
 tctcttctga gggagagcga agaatttgat agttaaact aaggtaagaa atgaagcgt 4740  
 ccacagatgg tttggtagg aggaaatata cggggcacc aaggatgca ctatcataaa 4800  
 agctagtacc ctaagtaaaa acaggcactg cataactctg acgatctgtg aagggaaaga 4860  
 atggaatgga gccactgccc caaagtgtgg aagacaagga aagcccataa catgtggaat 4920  
 gacactcgca gactttgagg agaaacatta caaaaagata tttataagag aagaatcttc 4980  
 ttgtcctgtg ctttttgatc cttcttgcca ttgtaattat tttcgccacg atgggccttt 5040  
 caggaaagag tataaggggt acgtccaata cacagccaga ggacaactct ttctgaggaa 5100  
 cctaccaatt ctagcgacga agatgaagct ataatgggt ggaacactcg gcgagaaat 5160  
 tggcagcctg gaacatctag gatgggtact gagagggcca gccgtgtgca aaaaaattac 5220  
 caaccatgag aagtgccacg taacatcat ggataagcta actgcatttt ttggaatcat 5280  
 gcctagaggc acgaccctta gggcacctgt gaggttcccc acagcactac taaaagttag 5340  
 aagggggcta gagacgggat gggcttacac gcaccaagga gggatcagct cggtagacca 5400  
 tgtcacagcc gaaaggatt tactagtgtg tgacagtatg ggcaggacca gggttgtctg 5460  
 tcatagtaac aataagatga ctgatgagac tgagtaggc atcaagaccg actcaggtg 5520  
 tcccgaaggt gcaggtgtt acgtgtctaaa cccagaagct gttaacattt ctggcaciaa 5580  
 aggagctatg gtacacctcc agaaaacggg gggggagttc acatgtgtca ctgcctcagg 5640  
 gacccggct ttcttcgatc tgaaaaatct aaaaggctgg tccgggctac caatttttga 5700  
 agcatccagt ggcaggggtg ttggtagggg gaaagtggc aagaatgagg attccaagcc 5760  
 caccaaaacta atgagcggaa tccagacagt gtctaagaac cagacagacc tagcggacat 5820  
 cgtaaaaaaa ttgactagta tgaacagagg agagttcaaa cagataacat tagcactgg 5880  
 ggcaggaact actacggaac tgccaaggtc cgtcatagag gagatagga ggcacaaaag 5940  
 ggtcttagtc ctgataccat tgagagcagc agcagagtca gtgtatcagt atatgagagt 6000  
 gaagtacca agtatatctt tcaattttag aataggagat atgaaggaag gtgacatggc 6060  
 cactggtatc acctacgcct catatgggta cttttgtcag cttcctcagc ccaaactgag 6120  
 agctgccatg gttaggtact catatatatt ctttagatgag taccactgtg ctacaccoga 6180  
 gcaattagca ataattggaa agatacacag gtttgctgaa aatcttagag tggtagcaat 6240  
 gacagcaacc ccagctggaa cggtcacaac gactggctcag aaacacccta tagaggagtt 6300

ES 2 401 072 T3

catagcccca gaggtgatga aaggtgaaga tctaggtagt gaatacttgg atattgcagg 6360  
 gttgaagata ccgactgaag agatgaaagg caacatgctc gtgttcgcmc caactaggaa 6420  
 catggcagta gaaacagcta agaaattgaa ggctaaggga tacaactctg gatactatta 6480  
 cagtggggaa aaccagaga acttgagggt ggtaacctcg caatccccgt atgtgtagt 6540  
 agccaccaat gccatagagt caggtgtgac attaccagac ttagacacag ttgtagacac 6600  
 tggactaaag tgtgagaaga gggtaggat ttcttcaaaa atgccctca ttgtaacagg 6660  
 acttaagaga atggcagtca caatcggaga gcaagcccag cgcaggggta gagttagaag 6720  
 agtcaagcca ggtaggtagt ataggagtca agaaacagct tcaggggtcaa aagattacca 6780  
 ttacgacctt ctgcaagccc agaggtagcg aatagaagat ggaattaatg taacaaagtc 6840  
 attcagggag atgaactatg attggagcct ttacgaagag gacagcttga tgataactca 6900  
 actcgaggtc cttacaacc tccttataatc agaagacctg cctgccgcag tgaagaacct 6960  
 catggccccg accgatcacc cagaacccat acaactggcc tatacagtt atgaaaacca 7020  
 aattccagtg ctgttcccaa agatcaaaaa tggtaggtg acagacagtt atgaaatta 7080  
 cacatatctc aatgcaagaa aattaggaga ggacgtgccg gcatatgtgt acgccacaga 7140  
 ggatgaggat ctacgagtgg atcttctggg tatggattgg cggaccag gcaaccaaca 7200  
 ggtgtagag acagggaggg cattaanaaca agtaactggc ttatccacag cagaaaacgc 7260  
 cctcttgata gccctattcg gctacgtcgg gtaccagaca ctttcaaaa ggcacatacc 7320  
 catgattact gacatctata caactgaaga ccacaggctt gaggacaaa cccacctcca 7380  
 gtttccccca aacgctataa ggaccgacgg caaggactca gagttgaagg aattagctgt 7440  
 gggagacctt gataaatatg tggacgcact ggtagactac tccaaacaag ggatgaaatt 7500  
 catcaaagtc caagctgaaa aggtcagaga ctcccagctc acgaaggag gcttgcaaac 7560  
 cattaaggag tatgtggata agtttataca atcactaaca gagaataagg aggagatcat 7620  
 caggtatgga ctatggggag ttcacacggc actctacaaa agcttggcag cgagactggg 7680  
 gcatgaaaca ctttttgcaa ctttagtggg aaaatgggtg gcttttgggg gcgaaaacgt 7740  
 atctgctcac atcaagcaag tagcagttga tctagtagta tattatatca tcaacaaacc 7800  
 atcttttctt ggagatacag agaccaaca agaggggagg aagtttgtgg ctagtctttt 7860  
 tatactctgca ctacgaacct acacataata aacctggaat tacaacaatc tgcaacgggt 7920  
 tgtcgaacct gccttagctt acctcccata tgctacaagt gccttgaagt tgttcacacc 7980  
 cacaagatta gagagtgtgg tcatactcag ttctacaatt tacaagacat acctctctat 8040  
 aaggaagggt aagagtgcag gcttgttagg taccagcata agtgcagcca tggagactct 8100  
 aaacccaaac ccaatctcag taggtatctc tctagtagctg ggggtaggtg ccatcgcmc 8160  
 ccataatgca atagaatcta gtgaacagaa aagaactttg ctgatgaagg tctttgtaaa 8220  
 aaacttctta gaccaagcag caacagatga gctagtcaaa gagaaccctg aaaaaataat 8280  
 catggctcta tttgaagcag tccagacctt aggaaacccc ctaagactca tctaccatct 8340  
 gtacgggggt tactataagg ggtgggaagc aaaagaactc gcagagaaaa ctgctggccg 8400  
 caacttattc acattgatca tgtttgagcc ctttgagctt ttaggtatgg actcagaagg 8460  
 aaagataaga aacttgtcag gcaactacat actggactta atctcaact tgcataataa 8520  
 ataaacaag gggctcaaaa aactagtcct tgggtgggct cctgcacctt tgagctgtga 8580  
 ttggacacca agtgatgaga gaataagcct acctcataac aactacttaa gggtagaac 8640  
 caggtgtcct tgtggctatg agatgaagcc aataaaaaat gttgctggta aattgacaaa 8700  
 agttgaagaa aaggggtcct tcctatgcag gaatagatta gggagaggac ctccaaactt 8760  
 caaagtaaca aagtctatg atgataactt gatagaagtc aagccagtag ctaggctaga 8820  
 aggcagggtg gacctctatt acaaggaggt aacagctaag ttagactaca caatgggaa 8880  
 agtactgtta gctaccaaca agtgggaggt ggaccacgct ttctgacca gactagttaa 8940  
 gaagcacaca gggatagggt ttaaagggtc atatttgggt gaccgaccag accatcaaga 9000  
 tcttgtcgat agagattgtg caactataac gaagaactca gtacagttcc taaaaatgaa 9060  
 gaagggttgc gctttcacat atgacctaac aatctctaac cttgtcaggc ttattgaaact 9120  
 agtcataag aataatttac aagaaagaga gatccctacc gtgacagtaa ctactgggt 9180  
 tgcataattct tttgtcaatg aagacctggg gactatcaag cctgtattgg gggagaaagt 9240  
 catcccagaa cccccgagg agttgagtct ccaaccacc gtgagactag tcaccactga 9300  
 aacagcaata accataacag gggaggctga agtgatgacg acagggatca caccagtggt 9360  
 agagatgaaa gaagaacctc agctggacca ccagtcaact accctaaagg tagggtgaa 9420  
 ggaaggggaa tatccagggc caggagttaa ccctaacct ttagcagagg tgatagatga 9480  
 gaaagatgac aggccttttg tcctaatactc ggtaacaaa ggttctacct cgaacagagc 9540  
 aagaacggcc aagaatatac ggtgtacaaa cgaacacac ccaagagaga tcagggactc 9600  
 gatgagccaa ggaagaatat tgacgggtgc tctaaaaagag ttggaccggg aattaaaaga 9660  
 attagtagat tacaagggga cctttctcaa tagggaagct ttagaagccc taagcttagg 9720  
 taagccaatc aagaggaaaa ccacaacagc aatgatcagg aggttaatag agccagagg 9780  
 tgaggaggaa ctaccagatt ggttccaagc ggaagaacc ctattttgg aagcaaaaa 9840  
 acagaatgac ttataaccacc taattggcag tgtagatagt ataaaaagca aagcaagga 9900  
 attaggggcc acagataaca caaagatag ggaaggaagt ggggctagga cctatacag 9960  
 gaaattgagc agctggagca cacaagttac aaaaaacag atgagtctag cccctctct 10020  
 tgaagagctg ttattaaagt gccctccatg tagtaaaatt tcaaagggac atatgggtgc 10080

ES 2 401 072 T3

```

agcataccaa ctggctcaag gaaactggga acccctcggg tgtggggtct atatgggaac 10140
cataccagct aggcgtctca agatccaccc ttatgaggct taccttaaac tcaaagagct 10200
ggtggaagtt gaatcttcga gggccactgc aaaagaatcc atcataagag aacataaac 10260
ctggatcctg cggaaggtga gacatgaagg gaacctaaaga accaaatcaa tgatcaacc 10320
tgggaaaata tcagatcagc tatgcagaga tggacacaaa agaaacatat ataataagat 10380
cataggctca acaatggcct ctgctggtat taggctggag aaactgccag tagtccgagc 10440
ccaaactgac acaaccagtt tccaccaagc cataagagaa aaaattgata aaacagaaaa 10500
caagcagacc cctgaattgc atgaagaact aatgaaggtc ttcgactgct taaagatccc 10560
agagctgaag gaatcgtatg atgaagtffc atgggaacaa ttagaagccg ggataaaccc 10620
taagggtgca gcaggctatc tagagagcaa gaacataggg gaagtcctag acacagagaa 10680
acacatagta gagcagctga tcaaggatct gaggaagggg aagaagatta ggtactatga 10740
aacagccatc cccaagaatg agaagagaga cgtcagcgac gactgggaag cgggagagtt 10800
cgttgatgaa aagaaaccaa gagtaatcca gtaccggac gccaaagtga gactggccat 10860
tacaaaagtg atgtacaaat gggtaaagca aaaaccagtg gtgatacccg gctatgaagg 10920
taaaacacct ctatttgaca tattcaacaa agtgaagaag gaatgggatt cattccagga 10980
ccccgtagca gtgagctttg acaccaaagc gtgggataca caagtcacca gtagagacct 11040
aatgttgata aaggatatcc agaaatatta tttcaagaga agtatacaca aatttttaga 11100
tacaataaca gaacacatgg tggaggtacc tgtcattaca gcagacggtg aagtttacet 11160
aaggaatggt cagaggggta gtggccaacc cgacacaagt gctggttaata gtatggtgaa 11220
tgctctaacc atgatatatg ctttctgtaa aagtacagge ataccttaca ggggattcag 11280
cagagtggca agaatccatg tgtgtggtga tgatggcttt ttgataacag agagaggact 11340
gggagtgaat ttctctgaga agggatgca gatattacat gaggccggga agccccaga 11400
aataactgaa ggggacaaaa tgaaagtggc atacagattc gaggacatag agttttgttc 11460
ccatactccc gtgccagtca gatgggcaga taaccaccag agttacatgg cagggaggag 11520
cacagccact atactagcta agatggcaac caggctggat tccagcggag agaggggtag 11580
cacagcttat gagaaggccg tagccttcag cttccttttg atgtactcat ggaatcccgt 11640
agttagaagg atctgcttac tgggtgtgtc acagttcca gaaatatccc catccaaaaa 11700
cacaatatac tactaccaag gggatcccat agctgcgtac agagaagtga tagggaaaca 11760
gctgtgtgaa ctgaaaagaa caggatttga gaagctggct ggtctgaatt tgagtatgac 11820
cactctaggc atctggacaa aacatactag taaaagacta atccaagcct gtgtagaaat 11880
aggtaagaga gaaggtacct ggttagttaa tgctgacaga ctgattgcag gaaagactgg 11940
gaagttttac atcccaagca ctgggtgtcac tctgttggga aaacactatg aggaaattaa 12000
cttaaagcaa aaggcggcac aaccgccgat agagggggtt gacagatata agttgggccc 12060
catagttaat gttatcttga gaaggctgag ggtgatgctg atgacagttg ccagcgggaag 12120
ctggtgaatc cgtccggagc gtcgtgccct cactcaaggt ttttaattgt aaatattgta 12180
aatagacagc taagatattt attgtagttg gatagtaatg cagtgatagt aaatacccca 12240
atthaacact acctccaatg cactaagcac tttagctgtg tgaggttaac tcgacgtcca 12300
cggttggact agggaagacc tctaacagcc cc 12332

```

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR

10 <400> 2

ctccatgtgc catdtacagc agag

24

<210> 3

<211> 24

15 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR

20

<400> 3

ctcgtccaca tggcatctcg agac

24

<210> 4

25 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

# ES 2 401 072 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR	
5	<400> 4 gcactggtgt cactctgtg	20
	<210> 5	
	<211> 25	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR	
15	<400> 5 gagaaggctg agggatgatc tgatg	25
	<210> 6	
	<211> 21	
20	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR	
25	<400> 6 gactttccgc ttcttttag g	21
	<210> 7	
30	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR	
	<400> 7 ggagagaata tcaccagtg	20
40	<210> 8	
	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR	
	<400> 8 ctccactccg cagtatggac ttgc	24
50	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 9 cctaaaaaga agcggaaagt c	21
60	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	



	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
5	<400> 10 gttgacatgg cattttcgt g	21
	<210> 11 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
15	<400> 11 cctcttatac gttctcaca cg	22
	<210> 12 <211> 21 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
25	<400> 12 gtatccatca tcrtgatga t	21
	<210> 13 <211> 24 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
35	<400> 13 caaatctctg atcagttgt ccac	24
	<210> 14 <211> 17 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
45	<400> 14 ttgcacacgg caggctcc	17
	<210> 15 <211> 35 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
55	<400> 15 gtcccccggg ggctgtaag ggtttctca gtca	35
	<210> 16 <211> 25 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR	
65	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR	

# ES 2 401 072 T3

	<400> 16 gatgtagaca catgcgacaa gaacc	25
5	<210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR	
15	<400> 17 gctccactc ttatgccttg	20
20	<210> 18 <211> 78 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR	
25	<400> 18 gctctagacg gccgtaatac gactcactat aggtatacga gattagctaa 60 agaactcgta tatggattgg acgtcaac 78	
30	<210> 19 <211> 32 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR	
40	<400> 19 gacggccgta atacgactca ctatagtata cg	32
45	<210> 20 <211> 24 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR	
55	<400> 20 cctaaccatg atatatgcct tctg	24
60	<210> 21 <211> 36 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR	
65	<400> 21 cggaattcgc cggggctgtt agaggtcttc cctagt	36
	<210> 22 <211> 24 <212> DNA <213> Secuencia artificial	

# ES 2 401 072 T3

	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
5	<400> 22 gagtggaata aaggttggtg taca	24
	<210> 23 <211> 24 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
15	<400> 23 gttacaccaa cctttattcc actc	24
	<210> 24 <211> 27 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
25	<400> 24 aacaggagtc tattaggaat ttggcca	27
	<210> 25 <211> 27 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
35	<400> 25 tggccaaatt cctaatagac tctgtt	27
40		
45		
50		

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna que comprende un virus de BVD de tipo 1 atenuado, en donde la actividad de RNasa en su proteína  $E^{RNS}$  está inactivada, combinada con un virus de BVD de tipo 2 atenuado, en donde la actividad de RNasa en su proteína  $E^{RNS}$  está inactivada, y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable, caracterizada porque dicho virus de BVD de tipo 1 atenuado y dicho virus de BVD de tipo 2 atenuado se han producido por un método para la atenuación de BVDV, que comprende la mutación de un clon de BVDV en las posiciones de histidina 300 y/o 349 de la  $E^{RNS}$ , en donde el triplete codificante está suprimido o sustituido, y en donde el virus de BVD de tipo 2 atenuado es codificado por una secuencia de nucleótidos que es SEQ ID N° 1, pero en donde el codón histidina en la posición 300 y/o 349 de la  $E^{RNS}$  está suprimido o sustituido.
- 15 2. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho virus de BVD de tipo 1 atenuado y dicho virus de BVD de tipo 2 atenuado se han producido por un método para la atenuación de BVDV, que comprende la mutación de un clon de BVDV en las posiciones de histidina 300 y/o 349 de la  $E^{RNS}$ , en donde los tripletes codificantes están suprimidos o sustituidos.
- 20 3. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un virus de BVD de tipo 1 atenuado, en donde la actividad de RNasa en su proteína  $E^{RNS}$  está inactivada por una delección del codón histidina 349 de la  $E^{RNS}$ , combinado con un virus de BVD de tipo 2 atenuado, en donde la actividad de RNasa en su proteína  $E^{RNS}$  está inactivada por una delección de histidina 349 de la  $E^{RNS}$ , y un soporte o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 25 4. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un virus de BVD de tipo 1 atenuado, en donde la actividad de RNasa en su proteína  $E^{RNS}$  está inactivada por una sustitución del codón histidina 300 de la  $E^{RNS}$  por leucina, combinado con un virus de BVD de tipo 2 atenuado, en donde la actividad de RNasa en su proteína  $E^{RNS}$  está inactivada por una sustitución de histidina 300 de la  $E^{RNS}$  por leucina, y un soporte o excipientes farmacéuticamente aceptables.

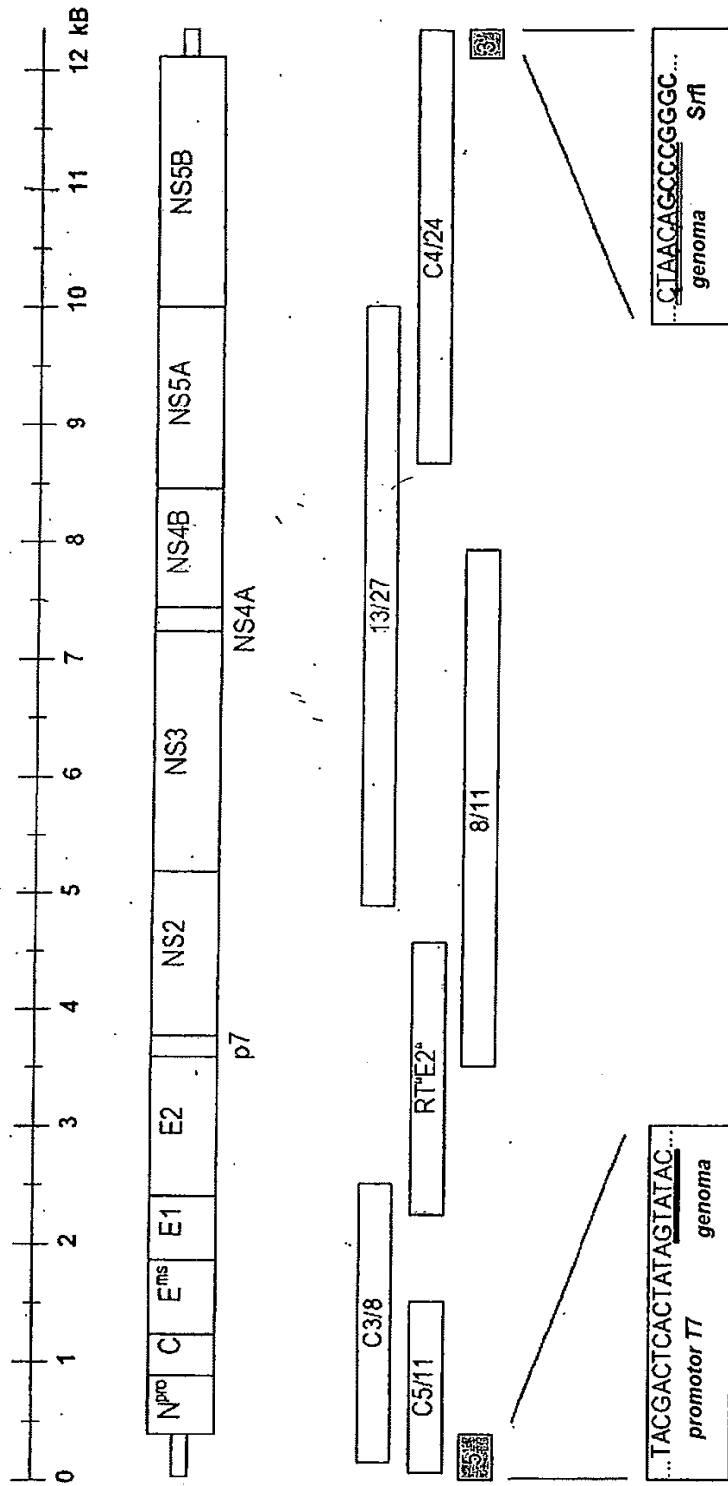


FIG. 1. Construcción del clon infeccioso de cDNA. La parte superior esquematiza un genoma de BVDV (kB) y la poliproteína codificada. La parte central muestra los clones de cDNA (blancos), el producto de TR-PCR (gris claro) y los productos de PCR (gris oscuro) usados para la producción por ingeniería del clon de cDNA, y la parte inferior presenta los extremos de las secuencias genómicas de cDNA (subrayados) y las secuencias añadidas a los extremos

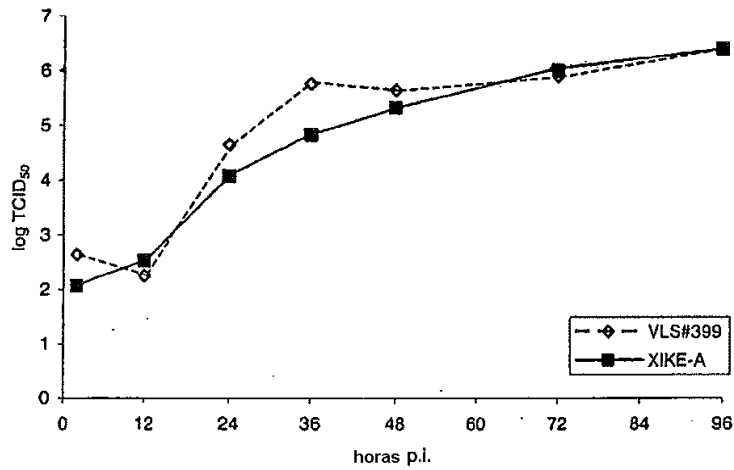


Fig. 2: Curvas de crecimiento del virus recombinante XIKE-A y del aislado VLS n° 399 del BVDV de tipo salvaje. Se infectaron células MDBK con los virus a una m.o.i. de 0,1 y se cosecharon por congelación y descongelación en los intervalos indicados. Los títulos se determinaron tras la infección de nuevas células MDBK por tinción de inmunofluorescencia 72 h después de la infección.

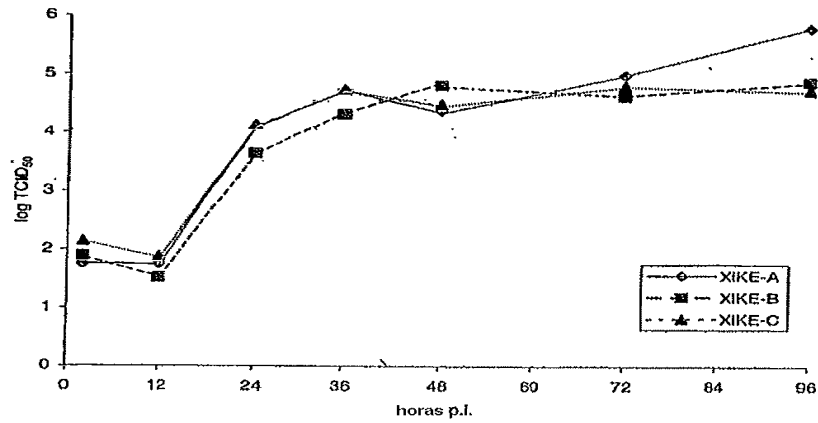


Figura 3. Curvas de crecimiento del virus recombinante XIKE-A y de los mutantes E<sup>NS</sup> y XIKE-B (H349Δ) y XIKE-C (H300L). Se infectaron células MDBK con los virus a una m.o.i. de 0,1 y se cosecharon por congelación y descongelación en los intervalos indicados. Se determinaron los títulos tras la infección de nuevas células MDBK por tinción de inmunofluorescencia 72 h después de la infección.

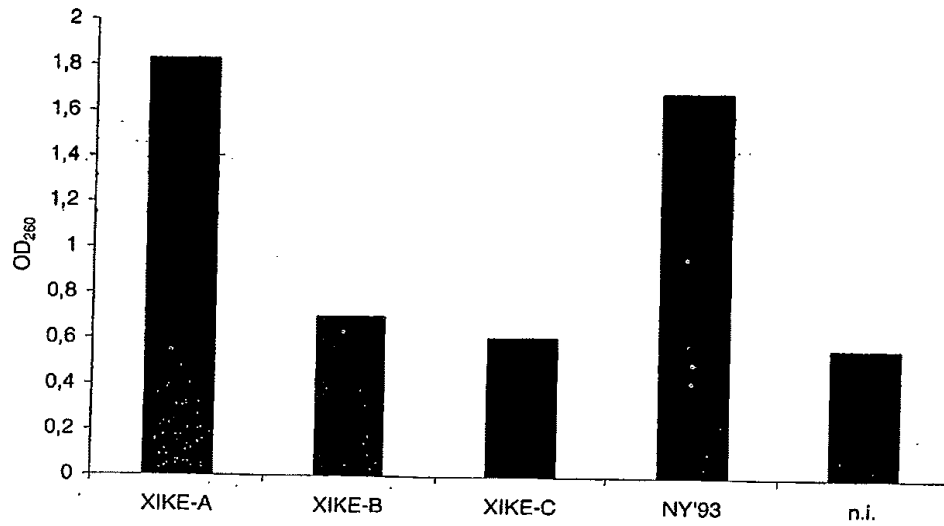
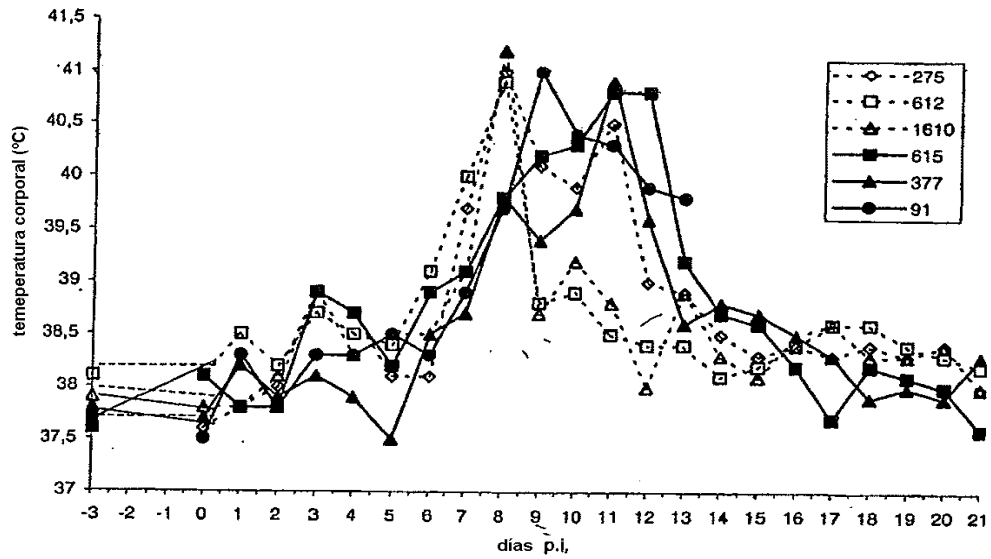


Fig. 4: Determinación de la actividad de RNAsa de los virus recombinantes XIKE-A (secuencia de tipo salvaje), XIKE-B (H394 Δ) y XIKE-C (H300L) en comparación con la cepa de tipo salvaje New York '93/C, procedente de extractos brutos de células MDBK infectadas con los correspondientes virus. Como controles negativos se utilizaron células MDBK no infectadas (n.i.). La degradación enzimática de poli (U) se determinó midiendo la OD<sub>260</sub> como marca de la liberación de pequeños fragmentos de RNA en el sobrenadante.



Fig. 5: Temperaturas corporales de animales sinfectados con New York '93/C (animales nº 275, nº 612 y nº 1.610, líneas de puntos) o XIKE-A (animales nº 615, nº 377 y nº 091, líneas continuas)



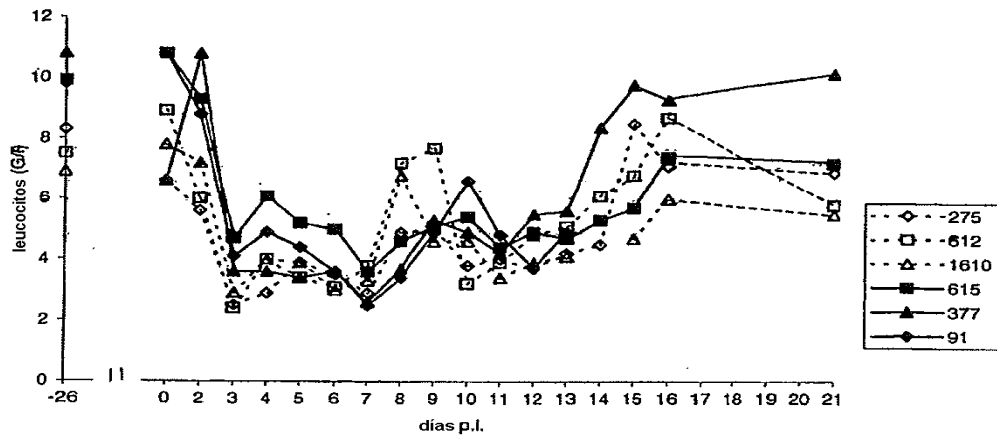


Fig. 6: Recuentos de leucocitos de animales infectados con New York '93/C (animales n° 275, n° 612 y n° 1.610, líneas de puntos) o XIKE-A (animales n° 615, n° 377 y n° 091, líneas continuas)

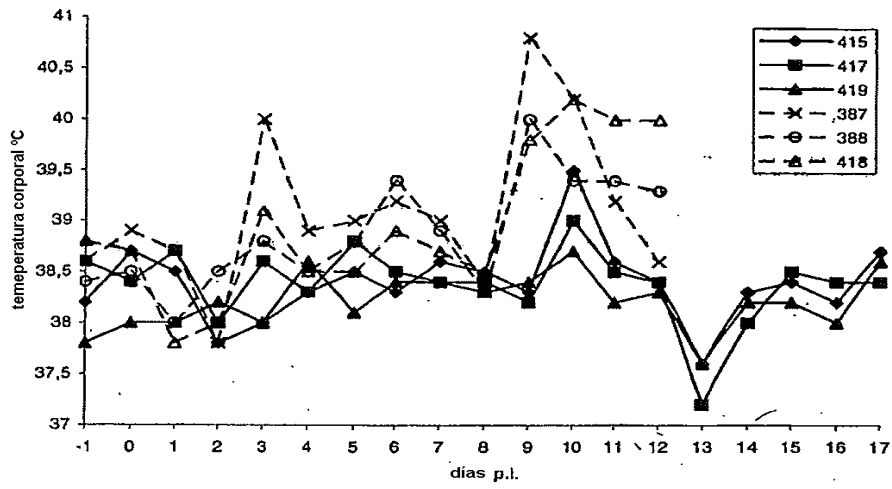


Fig. 7: Temperaturas corporales de animales infectados con XIKE-A (animal nº 387, nº 388 y nº 418, líneas de puntos) o XIKE-B (animal nº 415, nº 417 y nº 419, líneas continuas).

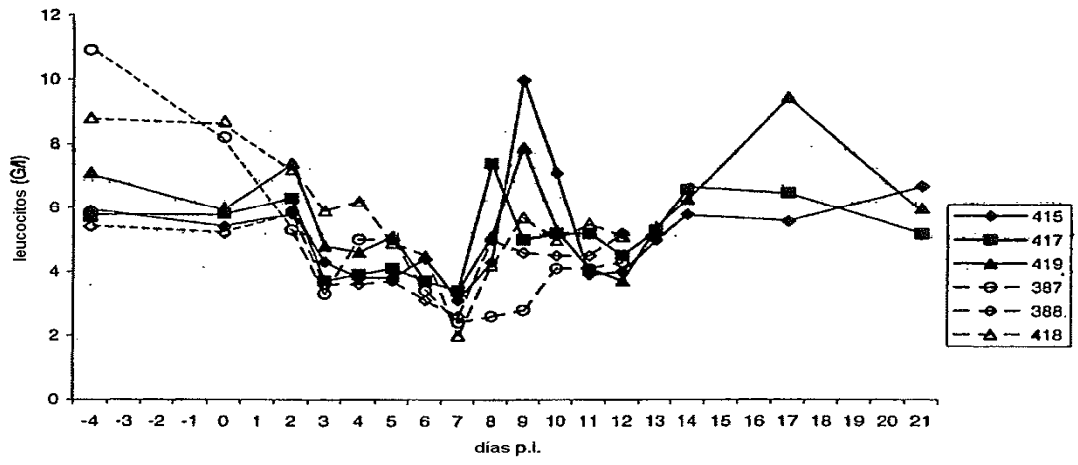


Fig. 8: Recuentos de leucocitos de animales infectados con XIKE-A (animal nº 387, nº 388 y nº 418, líneas de puntos) o XIKE-B (animal nº 415, nº 417 y nº 419, líneas continuas).