



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-6798

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

LAWSONIA INTRACELLULARIS DE ORIGEN EUROPEO Y VACUNAS,

AGENTES DE DIAGNOSTICO Y METODOS DE USO DE LOS MISMOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 39/02, 39/116, 39/245, A61P 31/04
C12N1/20

71. SOLICITANTE

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC

DOMICILIO

MISSOURI, U.S.A.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

FOTOL
FOLIO 44(2)
FOLIO 1

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicación: 66486736 80466000

Folios: 127

Fecha (ano): 2006-01-25 16:42:32

Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NAL: 411 PRESENTAL

Dependencia: 2020 DIVISION DE MARCAS COMERCIALES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL** 2006-02-25**SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.

2

**S LICITANTE
(71)**Nombre: **BOEHRINGER INGELHEIM
VETMEDICA, INC**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes del estado de Missouri, Estados
Unidos de América.Dirección: 2621 North Belt Highway
St. Joseph
Missouri 64506-2002
Estados Unidos de América.Domicilio: St. Joseph
Missouri 64506-2002
Estados Unidos de América.**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camvp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Michael B ROOF**
3222 Tupelo Circle,
Ames
Iowa 50016
Estados Unidos de América3. **Jeffrey P KNITELL**
4400 Philodendrom Court
Melbourne
Florida 32934
Estados Unidos de América2. **Jeremy J KROLL**
14217 Maple Drive
Urbandale
Iowa 50323
Estados Unidos de América.

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2004/022704Fecha: 15 de julio de 2004Publicación Internacional No. WO 2005/011731 A1Fecha: 10 de febrero de 2005

6

Título (54)**LAWSONIA INTRACELLULARIS DE ORIGEN EUROPEO Y VACUNAS, AGENTES
DE DIAGNOSTICO Y METODOS DE USO DE LOS MISMOS.**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 39/02, C12N 1/20, A61K 39/116, 39/295
A61P 31/04.

8

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

25 de julio de 2003

(31) Número de Solicitud

60/490.001

9

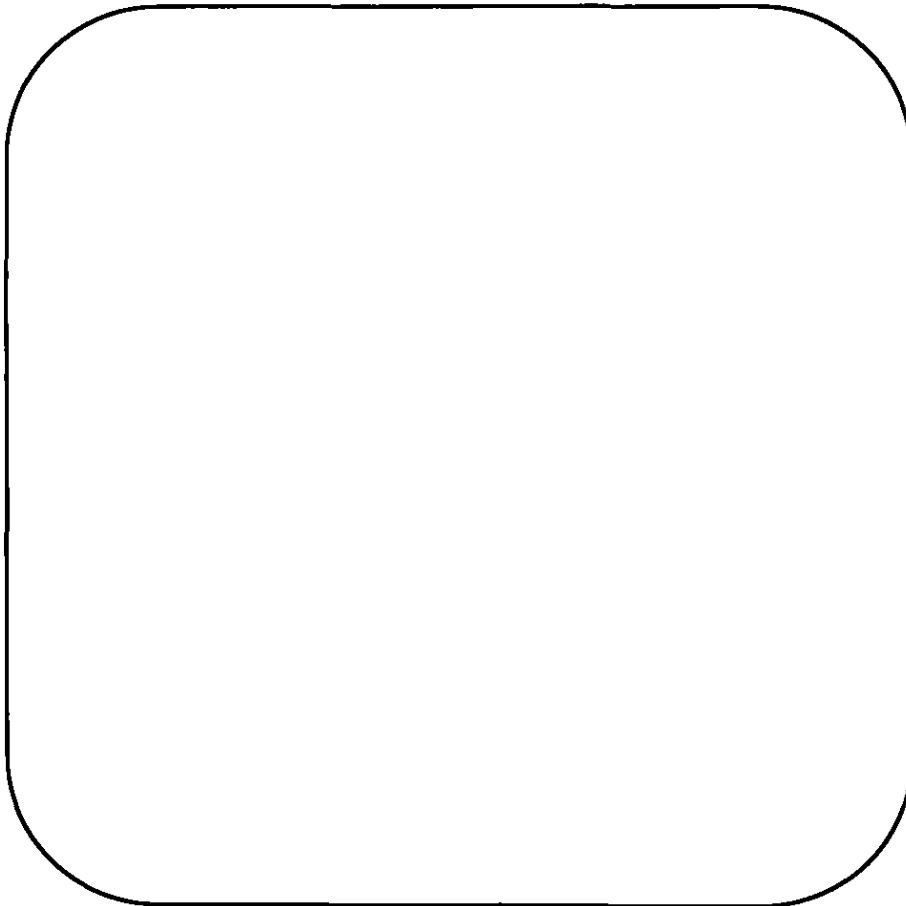
Comprobante de pago No.: 06-4.667Fecha: 23 de enero de 2006

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☒ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA : *Emilio Ferrero*

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2005/011731 A1**

Descripción:

Páginas 41 en el idioma original

Páginas 46 en español

Reivindicaciones: Número (s) 28

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**
3. ☒ **Extracto de publicación.**

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES
EN FASE INTERNACIONAL**

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 February 2005 (10.02.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/011731 A1

- (51) International Patent Classification⁷: A61K 39/02, C12N 1/20
- (21) International Application Number: PCT/US2004/022704
- (22) International Filing Date: 15 July 2004 (15.07.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/490,001 25 July 2003 (25.07.2003) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC. [US/US]; 2621 North Belt Highway, St. Joseph, MO 64506-2002 (US).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): ROOF, Michael, B [US/US]; 3222 Tupelo Circle, Ames, IA 50016 (US). KROLL, Jeremy, J. [US/US]; 14217 Maple Drive, Urbandale, IA 50323 (US). KNITTEL, Jeffrey, P. [US/US]; 4400 Philodendron Court, Melbourne, FL 32934 (US).
- (74) Agents: RAYMOND, Robert, P. et al.; Boehringer Ingelheim Corporation, 900 Ridgebury Road, P.O. Box 368, Ridgefield, CT 06877-0368 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: LAWSONIA INTRACELLULARIS OF EUROPEAN ORIGIN AND VACCINES, DIAGNOSTIC AGENTS AND METHODS OF USE THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to <L>Lawsonia intracellularis</L> vaccines and methods for protecting against and diagnosing <L>L. intracellularis</L> infection. The products and processes of the invention are attainable, in part, as the result of an improved method for cultivating large scale supplies of <L>L. intracellularis</L>, including both a novel isolate of <L>L. intracellularis</L> of European origin and a method of preparing a lyophilized product containing the attenuated European isolate as vaccine product.

WO 2005/011731 A1

**LAWSONIA INTRACELLULARIS OF EUROPEAN ORIGIN AND VACCINES,
DIAGNOSTIC AGENTS AND METHODS OF USE THEREOF**

RELATED APPLICATION

- 5 This application claims benefit to United States Provisional Application serial no. 60/490,001, filed July 25, 2003, the disclosure of which is incorporated by reference in its entirety.

BACKGROUND

- 10 The present invention relates to *Lawsonia intracellularis* vaccines and methods for protecting against and diagnosing *L. intracellularis* infection. The products and processes of the invention are attainable, in part, as the result of an improved method for cultivating large scale supplies of *L. intracellularis*, including both a novel isolate of *L. intracellularis* of European origin and a method of preparing a lyophilized product containing the
15 attenuated European isolate as vaccine product.

- L. intracellularis*, the causative agent of porcine proliferative enteropathy ("PPE"), affects virtually all animals, including: rabbits, ferrets, hamsters, fox, horses, and other animals as diverse as ostriches and emus. *L. intracellularis* is a particularly great cause of losses in
20 swine herds in Europe as well as in the United States.

- A consistent feature of PPE is the occurrence of intracytoplasmic, non-membrane bound curved bacilli within enterocytes in affected portions of intestine. The bacteria associated with PPE have been referred to as "Campylobacter-like organisms." S. McOrist *et al.*, Vet.
25 Pathol., Vol. 26, 260-264 (1989). Subsequently, the causative bacteria have been identified as a novel taxonomic genus and species, vernacularly referred to as *Ileal symbiont* (IS) *intracellularis*. C. Gebhart *et al.*, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, No. 3, 533-538 (1993). More recently, these novel bacteria have been given the taxonomic name *Lawsonia (L.) intracellularis*. S. McOrist *et al.*, Int'l. J. of Systemic Bacteriology,
30 Vol. 45, No. 4, 820-825 (1995). These three names have been used interchangeably to refer to the same organism as further identified and described herein.

L. intracellularis is an obligate, intracellular bacterium which cannot be cultured by normal bacteriological methods on conventional cell-free media and has been thought to require attached epithelial cells for growth. S. McOrist *et al.*, Infection and Immunity, Vol. 61, No. 19, 4286-4292 (1993) and G. Lawson *et al.*, J. of Clinical Microbiology, Vol. 31, No. 5, 1136-1142 (1993) discuss cultivation of *L. intracellularis* using IEC-18 rat intestinal epithelial cell monolayers in conventional tissue culture flasks. In addition, H. Stilla, Infection and Immunity, Vol. 59, No. 9, 3227-3236 (1991) discusses using Intestine 407 human embryonic intestinal cell monolayers and GPC-16 guinea pig colonic adenocarcinoma cell monolayers in conventional tissue culture flasks.

Recently, an *L. intracellularis* vaccine has been approved for use in the United States, which vaccine is based on *L. intracellularis* isolates described and claimed in United States Patent Nos. 5,714,375 and 5,885,823, both of which patents are herein incorporated by reference in their entireties. The above-described vaccine is sold by Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506-2002, under the trademark ENTERISOL[®] Ileitis.

SUMMARY OF THE INVENTION

One object of the invention is to provide an improved *L. intracellularis* vaccine using an isolate of European origin.

Another object of the invention is to provide an improved method for cultivation of *L. intracellularis* on a large scale and improved techniques for production of *L. intracellularis* vaccines.

To achieve these and other objects, and in accordance with the purpose of the invention as embodied and broadly described herein, the present invention provides a newly isolated *L. intracellularis* from Europe, a method of attenuating such an isolate, and the attenuated isolate thereof. Also provided herein is a vaccine comprising the attenuated isolate. Also provided herein is a method for producing a vaccine comprising the attenuated isolate in

lyophilized form for reconstitution at the time of administration and the lyophilized product thereof.

In one embodiment, the newly isolated *L. intracellularis* from Europe, isolate DK 15540, is deposit isolate ATCC accession No. PTA-4927. In another embodiment, the attenuated isolate derived from isolate DK 15540, is designated isolate B3903, ATCC accession No. PTA-4926.

DETAILED DESCRIPTION

As used herein, the term "*L. intracellularis*" means the intracellular, curved gram-negative bacteria described in detail by C. Gebhart *et al.*, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, No. 3, 533-538 (1993) and S. McOrist *et al.*, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 45, No. 4, 820-825 (1995), each of which is incorporated herein by reference in their entirety, and includes but is not limited to the isolate designated DK 15540 which was deposited under the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 on January 9, 2003 and assigned ATCC accession number PTA-4927; the causative bacteria which can be obtained from PPE infected swine or other animals throughout the world given the knowledge in the art and the teachings herein; and variants or mutants of any of the above bacteria, whether spontaneously or artificially obtained.

As used herein, the term "attenuated isolate" means any *L. intracellularis* isolate that is prepared according to the cultivation and passaging techniques taught herein to achieve avirulence while maintaining immunogenic properties when administered to a host animal including but not limited to the attenuated isolate designated B-3903 which was deposited under the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 on January 9, 2003 and assigned accession number PTA-4926.

The attenuated isolate of the invention can be used as an immunogen in antimicrobial vaccines for animals, including birds, fish, and mammals such as cattle, swine, horses, and

A

primates. Such vaccines can be prepared by techniques known to those skilled in the art and given the teachings contained herein. Such a vaccine would comprise an immunologically effective amount of the attenuated isolate in a pharmaceutically acceptable carrier. The vaccine could be administered in one or more doses. An

5 immunologically effective amount is determined by means known in the art without undue experimentation, given the teachings contained herein. The amount of avirulent bacteria should be sufficient to stimulate an immune response in disease-susceptible animals while still being avirulent. This will depend upon the particular animal, bacteria, and disease involved. The recommended dose to be administered to the susceptible animal is

10 preferably about 3.0 TCID₅₀ (tissue culture infective dose 50% end point)/dose to about 6.0 TCID₅₀/dose and more preferably about 4.0 TCID₅₀/dose to about 5.0 TCID₅₀/dose. In a preferred embodiment, the titer of the vaccine is about 4.9 TCID₅₀/dose as determined by Tissue Culture Infective Dose 50% endpoint dilution assay (TCID₅₀). The carriers are known to those skilled in the art and include stabilizers and diluents. Such a vaccine may

15 also contain an appropriate adjuvant. The vaccines of the invention may be used in combination with other vaccines, for example, as a diluent of another vaccine. The vaccine preparations may also be desiccated, for example, by freeze drying for storage purposes or for subsequent formulation into liquid vaccines.

20 Accordingly, the invention also comprises a method for inducing an immune response to virulent, wild-type *L. intracellularis* bacteria in an animal host for the purpose of protecting the host from such bacteria. The method comprises administering an immunologically effective amount of the attenuated bacteria or killed bacteria of the invention to the host and, preferably, administering the vaccine of the invention to the host.

25 As used herein, the term "large-scale cultivation" means a level of cultivation of *L. intracellularis* greater than approximately 2.0 to 3.0 liters and includes production on a scale of 100 liters or more. "Cultivation" as used herein, means the process of promoting the growth, reproduction and/or proliferation of *L. intracellularis*.

30

L. intracellularis can be cultivated by methods known in the art, preferably, according to United States Patent Nos. 5,714,375 and 5,885,823. For example, culture cells may first be inoculated with an inoculum comprising *L. intracellularis* bacteria so as to infect the cells with the bacteria. Numerous cell lines can be used in practicing the invention, including, but not limited to, IEC-18 (ATCC 1589)—rat intestinal epithelial cells, HEp-2 (ATCC 23)—human epidermoid carcinoma cells, McCoy's (ATCC 1696)—mouse (non-specified) cells, BGMK (Biowhittaker #71-176)—buffalo green monkey kidney cells, and swine intestinal epithelium cells. The preferred culture cells are HEp-2, McCoy's or IEC-18 cells.

If culture cells are used, prior to being inoculated, the cells may be in the form of a monolayer. To form a monolayer, the cells may be seeded into conventional flasks. Each flask is generally seeded with between about 1×10^5 cells to about 10×10^5 cells per 25, 75, 150, 850 cm² flask or roller bottle mixed with growth media. The growth media may be any media for cell cultivation which includes a nitrogen source, necessary growth factors for the chosen culture cells, and a carbon source, such as glucose or lactose. The preferred media is DMEM fortified with Ham's F 12 with 1-5% fetal bovine serum, although other commercially available media may be used with good results.

Successful cultivation of *L. intracellularis* is enhanced by maintaining the culture cells in a constant state of growth. Therefore, the culture cell monolayer should be at about 20 percent to about 50 percent confluency at the time of inoculation. Preferably, the cells should be at about 30 percent to about 40 percent confluency at the time of inoculation, most preferably at about 30 percent confluency.

Alternatively, the cells, prior to being inoculated, may be grown in suspension, as described *infra*. Preferably, the cells are first grown to 100% confluency in the form of a monolayer in an adherent type system, e.g., a roller bottle system, and then transferred to 3-3000 liters and grown in suspension. Alternatively, the cells can be grown in suspension to the desired cell density, e.g. 2×10^5 cells/ml, within the 3-3000 liter vessel (bioreactor, Fermentor, spinner flask, etc.) using parameters suitable for growth within this system prior to inoculation.

The inoculum may be a pure culture of *L. intracellularis* obtained from infected swine or other animals. Preferably the inoculum may be a pure culture of *L. intracellularis* obtained from ATCC accession No. PTA-4927.

5

The inoculum can be an intestinal homogenate prepared by scraping the mucosa off of the ileum of a swine or other animal infected with PPE. When preparing an intestinal homogenate, ileal sections selected for culture should show severe lesions with gross thickening of the gut. Due to the fragile nature of the bacteria, samples should preferably
10 be stored at -70°C as quickly as possible after necropsy. An antibiotic to which *L. intracellularis* is resistant such as Vancomycin, Amphotericin B or members of the aminoglycoside group of antibiotics, including Gentamicin and Neomycin, to name a few, is preferably added to the inoculum to suppress contaminating bacteria while permitting *L. intracellularis* growth. Whether the inoculum is a pure culture or an intestinal
15 homogenate, inoculation of the culture cells can be performed by various techniques known in the art, given the teachings herein.

The bacteria and/or inoculated culture cells are then incubated under a reduced dissolved O₂ concentration. At dissolved oxygen concentrations greater than 10% *L. intracellularis*
20 growth is less than optimal with cessation of growth eventually occurring at oxygen concentrations outside this range. Preferably, the bacteria and/or inoculated culture cells are incubated in a dissolved oxygen concentration in the range of about 0% to about 10%. More preferably, the bacteria and/or cells are incubated in an oxygen concentration in the range of about 0% to about 8%, with an oxygen concentration of about 0% to about 3.0%
25 being most preferred.

The proper concentration of carbon dioxide is also important to the proper growth of *L. intracellularis*. At carbon dioxide concentrations greater than 0% and less than 4%, non-optimum growth occurs with cessation of growth eventually occurring at carbon dioxide
30 concentrations outside this range. Preferably, the carbon dioxide concentration is in the

range from about 6% to about 10%, with a carbon dioxide concentration of about 8.8% being most preferred.

In addition, the cells are preferably incubated at a hydrogen concentration in the range from about 4% to about 10%. Most preferably, the cells are incubated in about 0 to about 8.0% O₂, about 8.8% CO₂, and about 4% H₂. Nitrogen is used as a "balance" in the gas mixture containing nitrogen (96%) and hydrogen (4%) or nitrogen (80%), carbon dioxide (10%) and hydrogen (10%) for growth of this organism. Cells are preferably incubated at a nitrogen concentration in the range from about 80% to 96%. Therefore, cells are most preferably incubated in about 0 to about 8.0% O₂, about 8.8% CO₂, about 4% H₂ and about 96% N₂.

Inoculated cells may be incubated in a dual gas incubator or other gas chambers which contain the proper hydrogen, oxygen and carbon dioxide concentrations and which allow the cells to be suspended during incubation. The chamber should comprise a means for maintaining the inoculated cells in suspension, and a gas monitor and supply source to supply and maintain the proper gas concentrations. The incubation temperature should be in the range of from 30°C to about 45°C and is more preferably in the range of from about 36°C to about 38°C. Most preferably, the temperature is about 37°C. The necessary equipment for cultivation and attenuation is readily available to those of ordinary skill in the art given the teachings herein. One example of equipment suitable for carrying out the present invention is a dual gas incubator, e.g., model 480 (Lab-Line, Melrose Park, IL) in conjunction with spinner flasks to maintain the cells in suspension. The presently preferred equipment comprises a fermentor, bioreactor, stir plate or rotary shaker containing at least about 2 liters media and capable of maintaining the culture cells in suspension via sparging gas of the appropriate concentration, or other means of mechanical agitation, and continuously monitoring dissolved O₂ levels in the media. New Brunswick, Braun and other companies make suitable fermentors and bioreactors for this purpose.

By maintaining the inoculated cells in a suspended state during incubation, maximum growth of the cells, and hence *L. intracellularis*, is achieved by increasing each individual

cell's exposure to growth media and the proper mixture of hydrogen, oxygen and carbon dioxide. The culture cells can be agitated and maintained in suspension by a variety of methods known in the art including, for example, culture flasks, roller bottles, membrane cultures, biobags, WAVE™ bioreactor systems, fermentors and spinner flasks. The cells
5 may be kept in suspension during incubation by incubating the cells in a spinner flask inside a dual gas incubator or similar apparatus. The term "spinner flask", as used herein, means a flask or other container which employs a paddle, propeller or other means to agitate the culture and keep the cells contained therein in suspension.

10 In a preferred embodiment, the inoculated cells are incubated until the cells reach confluency and then the cells are placed in a spinner flask containing growth media and incubated in a dual gas incubator while spinning the flask. Preferably, the inoculated cells are scraped or trypsinized and passaged into the spinner flask. This can be achieved by a variety of methods known in the art such as using a cell scraper to detach the cells. Once
15 the cells are introduced into the spinner flask, the paddle of the spinner flask is typically rotated in the range of from about 5 to about 500 rpm on a magnetic stir plate in order to maintain the infected cells in suspension.

A portion of the cultivated *L. intracellularis* is then passaged to fresh culture to increase
20 the production of *L. intracellularis* bacteria. The term "passaging" or variations thereof herein means the process of transferring a portion of the cultivated *L. intracellularis* to fresh culture cells in order to infect the fresh cells with the bacterium. The term "fresh", as used herein, means cells which have not yet been infected by *L. intracellularis*. Preferably such cells are on the average no more than approximately one day old.

25 The passage of *L. intracellularis* in suspension cultures may be accomplished by removing a portion of the original culture and adding it to a new flask containing fresh culture cells. If the original culture has a high number of bacteria/ml, for example, greater than about 10^4 bacteria/ml, it is preferable to add between about 1 to 10% (volume to volume) of culture
30 from the infected flask to a new flask containing fresh cells. This is preferably done when 50-100% of the cells are infected. If fewer than 50% of the cells are infected, passaging is

preferably accomplished by splitting the culture 1:2 into a new flask and scaling-up the volume by adding fresh tissue culture cells and media. In either case, cell lysis and other steps are not required, in direct contrast to the passage of monolayer cultures, as in the prior art.

5

After sufficient growth of the culture cells and subsequent infection by *L. intracellularis*, as determined by indirect fluorescent antibody (IFA) staining, TCID₅₀ or another comparable method, at least a portion of the cultivated *L. intracellularis* bacteria is then harvested. Harvesting is typically performed at cell infectivity of about 60% or higher; however, one skilled in the art knows that harvesting could be performed at a cell infectivity of less than 60%. The harvesting step may be performed by separating the bacteria from the suspension by various techniques known to those of ordinary skill in the art, given the teachings herein. Preferably, the *L. intracellularis* bacteria is harvested by centrifuging the contents of all or a portion of the suspension to pellet the culture cells, resuspending the resulting cell pellets, and lysing the infected cells. Typically, at least a portion of the contents is centrifuged at about 3000xg for about 20 minutes in order to pellet the cells and bacteria. The pellet may then be resuspended in, for example, a sucrose-phosphate-glutamate (SPG) solution and passed approximately 20 times through a 25 gauge needle in order to lyse the cells. If further purification is desired, the samples can be centrifuged at about 145xg for about five minutes to remove cellular nuclei and debris. The supernatant may then be centrifuged at about 3000xg for about twenty minutes and the resulting pellet resuspended in an appropriate diluent, such as SPG with fetal bovine serum (to prepare harvested bacteria suitable for lyophilization, freezing, or use as an inoculant) or growth media (to prepare harvested bacteria more suitable for passaging to fresh cells).

25

As previously mentioned, effective growth of *L. intracellularis* for large-scale production is enhanced by keeping the tissue cells actively growing. With monolayers, when cultures become confluent, the rate of cell division decreases substantially. Attempts to grow *L. intracellularis* on monolayer tissue cultures have had limited success and scale-up has not been possible. However, using suspension cultures greatly facilitates keeping the cells actively growing and permits continuous culture expansion and scale-up. Using a

30

fermentor and between about 0 to 3% dissolved O₂ as explained above, enables growth of up to and greater than 10⁸ bacteria/ml.

When using IEC-18 cells, it is preferable to add gelatin, agarose, collagen, acrylamide or silica beads, such as Cultisphere-G porous microcarriers (HyClone Laboratories, Logan Utah), along with the growth media. However, HEp-2 cells and others do not require microcarriers according to the methods used herein.

For culture maintenance purposes, with HEp-2 cultures, preferably 25% to 50% of the culture is removed and replaced with fresh media at weekly intervals. For cell cultures with microcarriers or beads, preferably 25% to 50% of the culture is removed and replaced with fresh media 1-2 times weekly. For scale-up purposes, an additional 25% to 50% of media, or media with microcarriers, may be added to the culture.

Depending upon the rate at which the culture cells become infected, passage to fresh cells generally occurs between about every 2 to about 7 days. Assuming that the culture cells become at least 70% infected within 2 to 7 days, preferably passage occurs between about every 5 to 7 days.

The present invention also provides vaccines and methods for producing vaccines against a novel isolate of *L. intracellularis* of European origin. Preferably, after maintaining the infected cells in suspension for an extended time (for example, 6-8 months), at least a portion of the cultivated *L. intracellularis* bacteria are harvested and monitored for potential attenuation. Such monitoring is preferably accomplished by host animal or animal model challenges to select for an attenuated isolate. Such attenuated isolates are used in vaccines according to the methods taught herein.

The present invention allows rapid culture expansion, an increase in yields of 100-1000 fold, and reduced cost for production of *L. intracellularis* of European origin. As a result, the abundant supply of *L. intracellularis* bacteria produced is readily attenuated for vaccine production purposes. The method of growing *L. intracellularis* in suspension greatly

increases the ease, speed, and number of bacterium available for this purpose. The more cells and cell divisions which occur, the greater the level of mutations occurring which are advantageous in vaccine development. Thus, growth in suspensions increases the expression of important immunogens controlled by environmentally regulated genes and
5 their expression products.

The resulting attenuated isolates can be cultivated in tissue culture monolayers but are preferably cultivated in suspension cultures. Other means of attenuation can include chemical attenuation by the use of, for example, N-methyl nitrosoguanidine and others
10 known in the art. Whether by multiple passage or chemical means, an attenuated *L. intracellularis* is produced and selected for vaccine preparation. In a preferred embodiment, the resulting attenuated isolate is ATCC accession No. PTA-4926.

The vaccine antigen can be harvested by centrifugation or microfiltration as described
15 above. The antigen is then standardized at a defined level based on the optimum host animal immune response, determined by a dose titration in the host animal species. The bacteria may be inactivated by methods known in the art, e.g., by using 0.3% formalin or other inactivating agents to prepare a killed vaccine. The antigen is then incorporated into a suitable adjuvant, such as aluminum hydroxide or mineral oil to enhance the immune
20 response. The antigen is then used to vaccinate the host via intramuscular or subcutaneous infection, in the case of swine at about 3-4 weeks of age, with a booster dose if necessary.

Preferably, the bacteria is serially passaged to induce and select for an attenuated, avirulent live culture. The culture is tested in the host animal for signs of attenuation. The culture is
25 harvested as described earlier and lyophilized. Swine, for example, are orally vaccinated with 1×10^4 to 1×10^6 bacteria. About twenty-eight days after vaccination, the swine are orally inoculated with about 1×10^7 organisms from a less passaged (less than 30 passages *in vitro* past the original isolation from the intestinal homogenate) virulent culture of *L. intracellularis*. Infected animals are necropsied 21 days after challenge and the small
30 intestines observed for gross lesions as well as microscopic lesions. PCR, indirect fluorescent antibody (IFA) or immunohistochemistry (IHC) should also be performed.

About eighty percent of the control animals will show gross or microscopic lesions and test positive for the presence of *L. intracellularis* in the mucosal cells of the intestines using either PCR, IFA or IHC testing methods. Vaccinated animals will have normal mucosal surfaces as determined by histological observations and will be negative by PCR testing 3
5 to 4 weeks post inoculation.

Generally, an attenuated immunogenic *L. intracellularis* isolate is produced after continuous culture for about 150 days to about 250 days, during which time the culture is passaged about 50-100 times. However, one skilled in the art knows that other attenuated
10 cultures may be produced by varying these figures.

The vaccine product of the invention can be lyophilized. After harvesting, the isolate can be concentrated by various methods known in the art and can be mixed with a stabilizer, e.g. sucrose gelatin stabilizer. The vaccine product can then be subjected to freezing and
15 drying (lyophilization). Generally, the freezing step comprises ramping to about $-45^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ and holding for about 150 minutes to about 480 minutes. The drying step can comprise primary and secondary drying steps. For example, the primary drying step can comprise: (a) ramping to between about -30°C to about -5°C and holding for between about 120 minutes to about 1000 minutes, and, optionally (b) ramping to between about -
20 5°C to about 5°C and holding for between about 150 minutes to about 2000 minutes. The secondary step generally comprises ramping to about $27^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ and holding for between about 330 minutes to about 1120 minutes. One skilled in the art knows that these ranges can be adjusted depending on conditions, e.g., starting volume.

25 A vaccine is then prepared comprising an immunologically effective amount of the attenuated *L. intracellularis* in a pharmaceutically acceptable carrier. In a preferred embodiment, a vaccine comprises ATCC accession No. PTA-4926 in a pharmaceutically acceptable carrier. The combined immunogen and carrier may be an aqueous solution, emulsion or suspension. An immunologically effective amount is determinable by means
30 known in the art without undue experimentation given the teachings contained herein. In general, the quantity of immunogen will be between 5 and 5000 micrograms, and between

$10^{2.0}$ and $10^{9.0}$ TCID₅₀, preferably between $10^{3.0}$ and $10^{6.0}$ TCID₅₀, more preferably between $10^{4.0}$ and $10^{5.0}$ TCID₅₀, when purified bacteria are used.

The present invention also encompasses combination vaccines comprising the attenuated
 5 *L. intracellularis* isolate designated ATCC accession No. PTA-4926 and antigenic material
 from at least one other pathogen, including but not limited to: *Salmonella* spp. (e.g.,
Salmonella choleraesuis, *Salmonella typhimurium*), *Erysipelothrix* spp. (e.g.,
Erysipelothrix rhusiopathiae), *Haemophilus* spp. (e.g., *Haemophilus parasuis*),
Mycoplasma spp. (e.g., *Mycoplasma hyopneumoniae*), *Leptospira* spp., *Clostridium* spp.
 10 (e.g., *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*), *Streptococcus* spp. (e.g., *Streptococcus*
suis), *Brachyspira* spp. (e.g., *Brachyspira hyodysenteriae*), *Bordetella* (e.g., *Bordetella*
bronchiseptica), *Pasteurella* spp. (e.g., *Pasteurella multocida*), circovirus (e.g., porcine
 circovirus type 2), porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus, swine
 influenza virus (SIV), coronavirus (e.g., transmissible gastro-enteritis (TGE) virus, porcine
 15 respiratory corona virus), parvovirus, or *Escherichia coli*; and a pharmaceutically
 acceptable carrier.

In one embodiment, the combination vaccine comprises the attenuated *L. intracellularis*
 isolate designated ATCC accession No. PTA-4926 and antigenic material from *Salmonella*
 20 *choleraesuis*, *Erysipelothrix* spp., *Clostridium* spp., *Brachyspira* spp., transmissible gastro-
 enteritis (TGE) virus, and *Escherichia coli*; and a pharmaceutically acceptable carrier.
 Antigenic material from *Clostridium* spp. can include, but is not limited to, *Clostridium*
perfringens and *Clostridium difficile*. Antigenic material from *Erysipelothrix* spp. can
 include, but is not limited to, *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

25

In another embodiment, the combination vaccine comprises the attenuated *L.*
intracellularis isolate designated ATCC accession No. PTA-4926 and antigenic material
 from *Salmonella choleraesuis* and *Erysipelothrix* spp.; and a pharmaceutically acceptable
 carrier. In another embodiment, the combination vaccine comprises the attenuated *L.*
 30 *intracellularis* isolate designated ATCC accession No. PTA-4926 and antigenic material

from *Salmonella choleraesuis* and *Erysipelothrix rhusiopathiae*; and a pharmaceutically acceptable carrier.

In another embodiment, the combination vaccine comprises the attenuated *L. intracellularis* isolate designated ATCC accession No. PTA-4926 and antigenic material from at least one other pathogen, including but not limited to: *Clostridium* spp. (e.g., *Clostridium tetani*), equine influenza virus (EIV) (e.g., EIV-1, EIV-2), equine herpes virus (EHV) (e.g., EHV-1, EHV-2, EHV-3, EHV-4, EHV-5, EHV-6, EHV-7), alphavirus (e.g., eastern encephalitis virus, western encephalitis virus, Venezuelan encephalitis virus), or West Nile virus; and a pharmaceutically acceptable carrier.

The vaccines according to the invention are generally administered to susceptible animals, preferably swine, in one or more doses. The live or killed vaccine may be administered 1 or 2 times at 2 week intervals. For the attenuated, live vaccines, one dose is preferred. The preferred routes of administration of attenuated live isolates are intramuscular, oral or intranasal, but intramuscular and subcutaneous injection routes are most preferred for the killed vaccine.

Effective diagnosis of PPE has also been hindered by the time required to culture the causative bacteria. As a result of the present invention, development of diagnostic tools promoting rapid and accurate assays for the presence of *L. intracellularis* in biological samples taken from swine and other animals susceptible to PPE is now possible.

The *L. intracellularis* bacteria of European origin of the instant invention, or components derived from such bacteria, can be used as an antigen in an ELISA or other immunoassay, such as an immunofluorescent antibody test ("IFA"), to detect antibodies to *L. intracellularis* in the serum and other body fluids of animals suspected of being infected with the bacteria. The presently preferred immunoassay is an IFA as described in the example below. Alternatively, the bacteria of the instant invention can be used in a Western Blot assay.

The preferred ELISA protocol according to the invention is as follows:

1. Add 0.1 ml/well antigen diluted in coating buffer. Incubate for 18 hours at 4°C.
2. Wash 3 times with PBS.
3. Add 0.25 ml of blocking buffer to each well of plate. Incubate 1 to 2 hours at
5 37°C.
4. Wash 3 times with wash buffer.
5. Dilute serum in blocking buffer and add 0.1 ml to the first wells of plate. Make
serial 1:2 dilutions across the plate. Incubate for 1 hour at 37.
6. Wash 3 to 5 times with wash buffer.
- 10 7. Dilute conjugate in blocking buffer and add 0.1 ml to wells of plate and incubate
for 1 hour at 37°C.
8. Wash 3 to 5 times with wash buffer.
9. Add substrate.
10. Measure absorbance of light with a spectrophotometer.
- 15 11. Wells in which antigen was not added are used as blanks.
12. Positive and negative control swine serum should also be used with each test.

The preferred Western Blot protocol is as follows:

1. Run antigen on 12% SDS-PAGE and transfer to nitrocellulose membrane.
- 20 2. Place membrane in blocking buffer for 2 hours.
3. Remove blocking buffer and rinse with PBS for 1 minute.
4. Dilute serum in blocking buffer and add to membrane. Incubate for 2 hours at
room temperature.
5. Wash 3 times with wash buffer (5 minutes for each wash).
- 25 6. Dilute conjugate in blocking buffer and add to membrane. Incubate for 1 hour at
room temperature.
7. Wash 3 times with wash buffer.
8. Add substrate for 10 minutes or until strong banding occurs.
9. Rinse with PBS.
- 30 10. Air dry and store in the dark.

The *L. intracellularis* bacteria of European origin of the instant invention, or components derived from such bacteria, can also be used to prepare antiserum or antibodies for diagnostic, prophylactic, or therapeutic use. The *L. intracellularis* bacteria of European origin of the instant invention, or components derived from such bacteria, can be
5 administered to a non-human animal in an amount effective to elicit an immune response and the antiserum or plasma containing antibodies to the *L. intracellularis* bacteria, or components derived from such bacteria, can be collected according to methods known in the art and described herein.

10 The present invention is further described in the following examples which are provided for illustrative purposes only and are not to be construed as limiting. Indeed, other variants of the invention will be readily apparent to one of ordinary skill in the art.

All publications and patents cited herein are incorporated by reference in their entireties.
15

EXAMPLE 1

PRODUCTION OF *L. INTRACELLULARIS* VACCINE

20 Isolation and Attenuation of *L. intracellularis* from the Intestines of European Pigs with Porcine Proliferative Enteropathy (PPE):

L. intracellularis virulent isolate DK 15540 (DK 15540, DK-15540 and 15540 are used interchangeably herein) was isolated by the University of Minnesota from an ileal
25 homogenate of a Danish pig infected with acute porcine hemorrhagic enteropathy. This isolate has been deposited under the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 on January 9, 2003 and assigned accession number PTA-4927. The isolation process included scraping the mucosa from the ileum, homogenizing, trypsinizing for 30 minutes, and passing
30 through a tissue grinder. The ileal homogenate was then passed through a series of filters consisting of 5.0, 1.0, and 0.65 μ m. The homogenate was diluted in sucrose phosphate glutamate buffer with 10% fetal bovine serum (FBS). Aliquots (6x1 ml) of homogenate

were made and stored at less than -70°C. The homogenate was used as inoculum to infect T-75 cm² flasks of McCoy cells. Cultures were monitored daily for McCoy cell infection by scraping McCoy cell monolayers, lysing cells by potassium chloride treatment, and placing the concentrated cell pellet on microscope slides stained by IFA using monoclonal antibodies specific for *L. intracellularis*. After eleven passages on anchorage dependent cell cultures, inoculum from passage eleven was transferred into a 250 ml spinner flask containing McCoy cells and grown in suspension until harvest. The Danish isolate of *L. intracellularis* (ATCC accession No. PTA-4927) was attenuated by continuous *in vitro* passage in McCoy cells for 80 weeks and tested for identity by monoclonal antibodies.

The attenuated isolate was designated B3903 (B3903, B 3903 and B-3903 are used interchangeably herein). Isolate B3903 was deposited under the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 on January 9, 2003 and assigned ATCC accession No. PTA-4926.

15 Cultures:

Identification

Characteristic growth requirements, PCR reactions, and monoclonal antibody reactions were used to identify *L. intracellularis* Master and Working Seed materials.

20

Purity

Purity of Master Seed and Working Seed of *L. intracellularis* was determined by examining cultures with monoclonal antibody stains, conventional extraneous agents tests for bacteria and viruses and by sterility mycoplasma tests.

25

Virulence

Master Seeds of *L. intracellularis* were not virulent as demonstrated by the lack of ability of the Master Seed and Back passage inoculum to produce clinical signs and gross lesions that are observed in susceptible swine following exposure of virulent *L. intracellularis*, as further illustrated in Example 2, *infra*.

30

Range of Subcultures

Final harvested material from production of *L. intracellularis* did not exceed eleven passages from the Master Seed.

5 Medium Composition

EU McCoy Master Cell Stock (MCS) were grown and maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium with Ham's Fortified F12 (DMEM/F12) and 1-10% (v/v) newborn bovine serum (NBS) or fetal bovine serum (FBS) (cell growth and maintenance media).

- 10 Master and Working Seed were stored in DMEM/F12 with 1-10% (v/v) NBS or FBS and 5-15% (v/v) glycerol (master and working seed storage media).

The final harvest product was stored in sucrose gelatin stabilizer (SGS) (final product storage media).

15

Propagation

Master and Working Seed cultures of *L. intracellularis* were propagated in EU McCoy MCS using cell growth and maintenance media as described *supra* and stored at less than or about -35°C.

20

Source of Tissue

L. intracellularis seed and production organisms were grown in McCoy Master Cell Stock (ATCC accession number CRL 1696, batch number F-10422). The mast cell stock was identified as 3894MMCSS at passage X. The master cell stock was passaged an additional six times and identified as EU McCoy MCS X+0. EU McCoy MCS passage X+0 was stored at -70°C ± 5°C or colder. Production vaccine was made in EU McCoy MCS cell line subcultures through the 40th passage.

30

Culture Containers

BU McCoy MCS were propagated in tissue culture flasks with 25-150 cm² surface area, Costar cell cubes, in roller bottles with 850 cm² to 2,2250 cm², in spinner flasks up to 40L capacity, and in bioreactors having 3L to 500L capacity.

5

Seed cultures of *L. intracellularis* were grown in 250-40,000ml spinner flasks, 850 cm² to 2,250 cm² roller bottles, tissue culture flasks with 25-150 cm² surface area, or in bioreactors having 3L to 500L capacity.

- 10 Production cultures of *L. intracellularis* were grown in 6L to 40L spinner flasks or in bioreactors having 3L to 500L capacity.

Methods of Preparing Suspensions for Seeding or Inoculation

Seeding Cultures

- 15 Frozen or fresh *L. intracellularis* Master or expanded Working Seeds were thawed at room temperature (25°C ± 3°C) or at 37°C ± 2°C. Bioreactors, spinner flasks or bottles previously seeded with McCoy cells at a cell density of 50,000 to 500,000 cells/ml were infected with *L. intracellularis* at a concentration of 1 to 10% (v/v) or MOI of 0.08 to 1.0. The infected culture was incubated under reduced oxygen concentrations by overlaying
20 with a gas mixture composed of 86% N₂, 4% H₂ and 10% CO₂. The culture was incubated for 3 to 10 days at 37°C ± 2°C, pH 6.7 to 7.3, and with continuous agitation (10 to 100 rpm) to maintain adequate mixing for the cells to remain in suspension.

Production Cultures

- 25 Frozen or fresh *L. intracellularis* Master or expanded Working Seeds were thawed at room temperature (25°C ± 3°C) or at 37°C ± 2°C. Bioreactors or spinner flasks 3L to 500L capacity) previously seed (0 to 7 days) with McCoy cells at a cell density of 50,000 to 500,000 cells/ml were infected with *L. intracellularis* at a concentration of 1 to 10% (v/v) or MOI of 0.08 to 1.0. The infected culture was incubated under reduced oxygen
30 concentrations by overlaying or sparging with a gas mixture composed of 96% N₂, 4% H₂. The culture was incubated for 3 to 8 days at 37°C ± 2°C, pH 6.7 to 7.3, and with

continuous agitation (10 to 100 rpm) to maintain adequate mixing for the cells to remain in suspension.

Inoculation Techniques for Seed and Production Cultures

5 Seed Cultures

Up to 10% (v/v) of Master or Working Seed are inoculated (MOI=0.08 to 1.0) into bioreactors, spinner flasks or bottles seed with McCoy cells at 0-7 days in growth medium.

Production Cultures

- 10 Up to 10% (v/v) of Production Seed was inoculated (MOI=0.08 to 1.0) into an appropriate volume of growth medium seeded with McCoy cells at 0 to 7 days with the appropriate McCoy cell density in 3L to 500L capacity vessels.

Incubation of Microorganisms

- 15 The cultures were incubated at $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 3 to 10 days in a reduced oxygen atmosphere with agitation to maintain the suspension. Additional medium and/or McCoy cells can be added to continue the growth process.

- 20 Cultures were observed macroscopically during the incubation period for evidence of abnormal growth or signs of contamination.

Harvest:

Handling and Preparation of Cultures

- 25 Cultures were examined for signs of adequate bacterial growth by indirect fluorescent antibody (IFA) staining. Cultures that were ready for harvest exemplified 60 to 100% cell infectivity. Percent infectivity was determined by observation of at least three fields, each field containing enough McCoy cells to fill at least 80% of the area. To be considered infected, approximately 50% of the cell is filled with bacteria.

30

Potency of the harvest culture is tested by titration of the sample on McCoy cells which are fixed and stained using specific monoclonal antibody (anti-*L. intracellularis* monoclonal antibody VPM 53 Lot 31599 or equivalent; anti-mouse IgG-fluorescein conjugate (FITC) (ICN No. 55499) after 6 days of incubation at $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5

Cultures were examined visually for any obvious signs of contamination. Harvest occurred 3 to 10 days post inoculation.

Harvesting Techniques and Specifications

- 10 Cell and fluid contents in the production culture bioreactor, spinner flasks and bottle were partially or fully collected in a sterile receiving vessel. Each production culture bioreactor, spinner flask and bottle was harvested individually or the contents of several vessels were pooled with the addition of SGS and stored at 1°C to 7°C or colder. Harvested production culture was sampled for potency by TCID_{50} and identification by IFA staining.

15

Production cultures exhibited at least $4.9 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ by IFA staining and were free of any evidence of contamination upon microscopic observation.

Preparation of Vaccine Product:

20

Concentration Methods

The vaccine product can be concentrated by various methods, e.g., by allowing the culture to settle with subsequent decanting of the supernatant, by membrane filtration ($0.22 \mu\text{m}$ or smaller), perfusion, or by centrifugation.

25

Sucrose Gelatin Stabilizer (SGS)

Hydrolyzed gelatin solution is prepared by mixing gelatin with deionized water or water for injection at approximately 25% final total volume of SGS batch size and hydrolyzing in an autoclave for 120 minutes at 121°C .

30

The hydrolyzed gelatin solution (40.0 g/L) was then mixed with deionized water or water for injection at approximately 75% final total volume of SGS batch size. Potassium hydroxide (AR) (0.548 g/L), L-glutamic acid (1.440 g/L), dipotassium phosphate (AR) (2.508 g/L), potassium dihydrogen phosphate (AR) (1.030 g/L), and sucrose (AR) (150.00 g/L) were added and the solution was thoroughly mixed. The pH of the stabilizer was then adjusted to 6.8 to 7.0 with hydrochloric acid or sodium hydroxide solutions. Deionized water or water for injection was added to 100% of desired final volume of the SGS. The complete stabilizer was thoroughly mixed, and the entire solution was sterilized by filtration through a 0.1 micron filter.

10

Example of Assembly of Units to Make a Serial is shown in Table 1:

Table 1

<i>L. intracellularis</i>	200,000-300,000 ml
sucrose gelatin stabilizer (SGS)	100,000 ml (25% v/v)
DMEM/F12 (May be added to standardize the product)	0-150,000 ml
TOTAL VOLUME	400,000 ml

15 Volume of an average serial was 50L to 500L.

Lyophilization

The vaccine product was lyophilized according to the procedure outlined in Table 2 for a 10 dose cycle (6.0 ml fill) or Table 3 for a 50/100 dose cycle (10.0 ml fill).

20

25

Table 2

STEPS	°C	Rate (minutes)	Hold (minutes)	Pressure (mT)
PRE-COOL*	5°	Na	Na	Atm
FREEZE	-47° ± 3°	As fast as possible	150	Atm
1° DRYING, 1st	-15° ± 2°	120	120	100-150
1° DRYING, 2nd	0° ± 2°	120	180	100-150
2° DRYING, 1 st	32° ± 2°	240	180	60-80
2° DRYING, 2nd	26° ± 2°	240	As fast as possible	60-80

Total Time: 1352 minutes (22.5 hrs)

*Shelves are pre-cooled to 5° ± 2°C during the loading of the lyophilizer.

5

Table 3

STEPS	°C	Rate (minutes)	Hold (minutes)	Pressure (mT)
PRE-COOL*	5°	N/A	N/A	Atm
FREEZE	-48° ± 3°	60	90	Atm
1° DRYING	-15° ± 2°	60	1500	100-150
2° DRYING	26° ± 2°	60	600	60-80

Total Time: 2370 minutes (39.5 hrs)

*Shelves are pre-cooled to 5° ± 2°C during the loading of the lyophilizer.

10

EXAMPLE 2**SAFETY OF *L. INTRACELLULARIS* VACCINE****Purpose:**

- 5 The objectives of this study were two-fold. The first objective of this study was to observe and compare the incidence of disease caused by three different low passage isolates (two of U.S. origin and one of European origin) of *L. intracellularis* in pigs at 6 ½ weeks of age. The second objective was to observe the safety of two high passage isolates (both of European origin) of *L. intracellularis* in pigs at 6 ½ weeks of age.

10

Materials and Methods:**Test Substances**

1. *L. intracellularis* low passage U.S. isolate N343
2. *L. intracellularis* low passage U.S. isolate N101494.
- 15 3. *L. intracellularis* low passage EU isolate DK 15540 p20
4. *L. intracellularis* high passage EU isolate DK 15540 p60
5. *L. intracellularis* high passage EU isolate DK 15540 p80 (Master Seed designation B3903).

Formulation of Test Substances

- 20 Low passage isolates were grown continuously for 10-20 weeks after isolation in McCoy cell suspension. High passage isolates were grown continuously for 60-80 weeks after isolation in McCoy cell suspension. All cultures were harvested via centrifugation at 10,000 RPM for 15 minutes. The McCoy cell culture pellets containing Lawsonia were resuspended in Sucrose-Phosphate-Glutamine (SPG) solution with 10% FBS.

25

Storage of Test Substances

Harvested cultures were stored at -70°C until the day of challenge. Challenge cultures of the same isolate but from various harvest dates were thawed and combined into plastic vaccine bottles, labeled, and stored at 4°C or on ice until the time of challenge.

- 30 **Assay of Test Substances**

TCID₅₀ was performed on all pooled challenge isolates at the time of challenge (day 0). The average titers (n=3) (TCID₅₀/ml) were as follows in Table 4:

Table 4

Test Substance	Average Titer (TCID ₅₀ /ml)
<i>L. intracellularis</i> N343	6.4
<i>L. intracellularis</i> N101494	6.1
<i>L. intracellularis</i> DK 15540 p20	6.2
<i>L. intracellularis</i> DK 15540 p60	6.87
<i>L. intracellularis</i> DK 15540 p80	7.4

5

Study Design

The study consisted of five experimental groups and one control group. On day 0 of the study, Group 1 (10 pigs, 6 ½ weeks of age) received one 10ml or equivalent intragastric (IG) dose of *L. intracellularis* low passage U.S. isolate N343. Group 2 (10 pigs, 6 ½ weeks of age) received one 10ml or equivalent IG dose of *L. intracellularis* low passage U.S. isolate N101494. Group 3 (10 pigs, 6 ½ weeks of age) received one 10ml or equivalent IG dose of *L. intracellularis* low passage EU isolate DK15540 p20. Group 4 (10 pigs, 6 ½ weeks of age) received one 10ml or equivalent IG dose of *L. intracellularis* high passage EU isolate DK15540 60 week. Group 5 (20 pigs, 6 weeks of age) received one 10ml or equivalent dose of *L. intracellularis* high passage EU isolate DK 15540 p80. Group 6 (10 pigs, 6 ½ weeks of age) designated as "Strict Controls" did not receive a treatment.

Daily health observations were made from initiation of study to the day of challenge of appropriate test animals. Clinical health (behavior, appetite, body condition, hair coat, and stool consistency on a scale of 1 to 4 were scored daily from day of challenge (day 0) to termination of study (day 21). Average daily weight gains (ADWG) were calculated from day of challenge (day 0) to termination of study (day 21). Fecal shedding of *L. intracellularis* was evaluated on days 0, 7, 14, and 21. The one animal that died (from Group 1) throughout the study was examined for gross and microscopic lesions. Death

was determined to be due to lesions associated with PPE confirmed by histology and PCR analysis; the animal was not replaced. Qualitative analysis of Lawsonia content in feces was evaluated by PCR along with histological evaluation for *L. intracellularis* on the ileum and colon. Serum was collected on days 0, 7, 14, and 21 of the study.

5

Results:
Summary of Study Results

Table 5

Group	Treatment	No. of Pigs	Titer (TCID ₅₀ /ml)	Serology	Fecal Shedding	PCR	FA	Histology	Gross Lesions	ADWG	Clinical Scores
1	N343	9	7.4	19%	11%	0%	11%	44%	1	0.61	5.23
2	N101494	10	7.1	10%	10%	10%	30%	30%	1.2	0.8	5.15
3	DK15540p20	10	7.2	18%	13%	30%	10%	20%	1.2	0.86	5.01
4	DK15540p60	10	7.87	5%	0%	0%	0%	10%	1	0.9	5
5	DK15540p80	20	8.4	0%	0%	0%	0%	0%	1	1.05	5
6	Strict Controls	10	0	0%	0%	0%	0%	0%	1.05	0.91	5

10

General Observations

Daily health observations were made until challenge. The clinical condition of the animals was evaluated daily following challenge for the duration of the study. Observations included: behavior, appetite, body condition, hair coat, and stool consistency. The clinical conditions of these animals were evaluated based on a numerical point system, which reflects the severity of illness. Scores ranged from 1 to 4 for each parameter. A score of 1 was given to an animal with a normal, healthy appearance, a score of 3 for an animal demonstrating severe clinical signs, and a score of 4 for an animal that has deceased. The average daily score for the strict controls, DK15540 p60, and DK15540 p80 was 5.0. The average daily scores for low passage material was N343 (5.23), N101494 (5.15), and DK15540 p20 (5.01). Statistical analysis on these results indicated no differences among treatment and control groups using Kruskal-Wallis Rank Sum Test.

20

Average Daily Weight Gains (ADWG)

Average daily weight gains were calculated from the time of challenge (day 0) to the termination of the study (day 21). The average weight gain per day for the strict control group was 0.9 pounds. The average weight gain for the low passage treatment groups was only 0.6 (N343), 0.8 (N101494), and 0.86 (DK15540 p20) pounds/day. The high passage treatment groups revealed the same or increased average weight gain per day compared to the strict control group that didn't receive challenge with 0.9 pounds/day (DK15540 p60) and 1.05 pounds/day (DK15540 p80) respectively. The mean difference in average daily weight gains was significantly lower in the N343 treatment group compared to higher passage treatment groups (DK15540 p60 and p80) and strict control group at day 21 of the study. (Pearson Chi-square $p < 0.05$).

Seroconversion

Seroconversion to *Lawsonia* exposure in pigs was measured by testing for the presence of anti-*Lawsonia* antibodies using an IFAT assay. On day 0, only the N343 treatment group observed detectable seroconversion in 2/10 pigs. Day 7 observed 2/9 pigs (N343) and 1/10 pigs (DK15540 p20) IFA positive for *Lawsonia* antibodies. On day 14, 2/9 pigs were IFA positive in N343 treatment group, 1/10 in DK15540 p20 and p60 respectively. Day 21 revealed 1/10 pigs (N343), 4/10 pigs (N101494) and 6/10 pigs (DK15540 p20) were IFA positive while high passage treatment groups (DK15540 p60 and p80) show no detectable seroconversion. Seroconversion to *Lawsonia* exposure increased in treatment groups receiving low passage *L. intracellularis* of both the U.S. and EU isolates day 21 of the study.

Fecal Shedding

PCR testing of the feces demonstrated shedding of *L. intracellularis* beginning on day 14 where 4/9 in the N343, 4/10 in the N101494, and 5/10 in the DK15540 p20 low passage animals tested positive. Both high passage treatment and strict control groups were PCR negative for day 14. On day 21, DK15540 p20 treatment group had 1 animal PCR positive while all other treatment and control groups were PCR negative. No evidence of shedding

was observed in high passage isolate groups (DK15540 p60 and p80) using PCR throughout the study. PCR positive animals indicating active shedding of *Lawsonia* in their feces were more significant in the low passage isolate groups (N343, N101494, and DK15540 p20) on day 14 of the study than high passage isolate groups and strict controls
5 (Pearson Chi-square $p < 0.05$).

PCR at Day 21: Ileums and Colons

PCR testing of mucosal scrapings from ileums and colons was performed after necropsy (day 21). Samples that were PCR positive for *L. intracellularis* colonization were (2/10
10 colons) in N101494 and (2/10 ileums, and 4/10 colons) in DK 15540 p20 low passage isolate groups. All other treatment and control groups were PCR negative in tissues day 21 of the study. Results indicated ileums and colons of pigs in DK15540 p20 were significantly more colonized with *L. intracellularis* compared to all treatment and control groups (*Pearson Chi-square $p < 0.05$).

15

Histology

Sections of the terminal ileum and colon were collected at necropsy (day 21) and placed in buffered formalin for histological analysis. Presence of intracellular bacteria and crypt hyperplasia was observed in tissues stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and
20 Warthin-Starry silver reagents of 4/9 pigs (N343), 3/10 pigs (N101494), 2/10 pigs (DK15540 p60) and 1/20 pigs (DK15540 p80). Lesion development was confirmed by fluorescent antibody staining using monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis* in 1/9 pigs (N343), 3/10 pigs (N101494), and 1/10 pigs (DK15540 p60). FA detected no lesions caused by *Lawsonia* in the colons of all treatment and control groups. FA results
25 indicated significant lesion development in ileums of pigs in N101494 treatment group compared to all treatment and control groups. H&E / silver staining showed significant lesion development associated with PPE in N343 treatment group compared to all treatment and control groups. (Pearson Chi-square $p < 0.05$).

30

Gross Scores

Ileums and colons were scored at the time of necropsy (day 21) for lesions associated with PPE. Tissues were given a score of 1 for normal appearance (no lesion development), a score of 2 for lesions demonstrating mild thickening, 3 for moderate thickening, and a score of 4 for severe thickening. Strict controls had an average clinical score of 1.05, N343 (1.0), N101494 (1.2), DK15540 p20 (1.2), and DK15540 p60 and p80 (1.0). Average gross lesion scores indicated no statistical difference between control and treatment groups using ANOVA test for multiple comparisons.

Conclusions:

Based on the data collected, this study demonstrated that pigs challenged with a low passage dose of N343, N101494, and DK15540 with a TCID₅₀ greater than 1×10^7 bacteria/dose increases the incidence of PPE in these animals. High passage isolates (DK15540 p60 and p80) given to pigs of the same age with a TCID₅₀ greater than 1×10^7 were proven safe and show reduction of colonization and lesion development associated with PPE. This conclusion was based on PCR on the mucosa of the ileum, histopathology, and FA stains of tissue sections.

A reduction of shedding *L. intracellularis* in the feces determined by PCR was evident in high passage isolates compared to low passage isolates. Average daily weight gains calculated for all treatment and control groups support this conclusion by demonstrating positive uniform daily weight gain in groups given the high passage isolate and strict controls compared to groups given low passage isolates especially animals in the N343 treatment group. This observation indicates reduction of weight gains in animals given low passage material which supports adequate and similar grow performance of animals given high passage material with animals receiving no challenge material. Compared to the strict controls, the high passage isolates showed no negative impact on weight gain and overall health based on clinical scores.

EXAMPLE 3**EFFICACY AND MINIMAL PROTECTIVE TITER****Purpose:**

- 5 The objectives of this study were to determine the minimal protective titer of a vaccine comprising isolate B3903 (lyophilized) (DK 15540, passage 80) ("B3903 (Lyophilized) vaccine" and "B3903 vaccine" are used interchangeably herein) administered by oral drench in pigs 3 weeks of age and to demonstrate efficacy against a virulent heterologous pure culture challenge with low passage *L. intracellularis*, the causative agent of Porcine
- 10 Proliferative Enteropathy (PPE) in swine.

Materials and Methods:

Test Substance: Attenuated Live Culture of *L. intracellularis*, Isolate B3903

15 **Formulation of B3903 (Lyophilized) Vaccine**

- DK 15540 isolates were grown continuously for 80 weeks after isolation in McCoy cell suspension. All cultures were harvested via centrifugation at 10,000 RPM for 15 minutes. The McCoy cell culture pellets containing Lawsonia were resuspended in Sucrose-Phosphate-Glutamine (SPG) solution with 10% FBS. Desiccation was performed as
- 20 described in Example 1, *supra*. The lyophilized product is reconstituted in water, q.s. ad 2.0 ml, for injections.

Storage of B3903 (Lyophilized) Vaccine

- The vaccine was stored at 2°C-8°C until ready for use. After resuspension, the vaccine
- 25 was stored on ice until administration.

Doses of B3903 (Lyophilized) Vaccine

1. High dose (Treatment Group 1): 1 x 2mL (6.0 logs/dose) via direct oral drench on day 0 of the study.
- 30 2. Medium dose (Treatment Group 2): 1 x 2mL (4.9 logs/dose) via direct oral drench on day 0 of the study.

3. Low dose (Treatment Group 3): 1 x 2mL (3.8 logs/dose) via direct oral drench on day 0 of the study.

Test Substance: Placebo

- 5 A placebo consisting of uninfected McCoy tissue culture cells suspended in DMEM/F12 growth medium fortified with 5% NBS was given to treatment Groups 4 (challenge control) and 5 (negative control) on day 0 of the study. This substance was administered to piglets in treatment Group 4 by direct oral drench and given 1 x 2mL of placebo per test animal.

10

Test Substance: *L. intracellularis* N101494 Virulent Challenge

L. intracellularis N101494 was obtained from the intestines of a 12 week old pig from an Indiana farm (United States Patent 5,714,375).

- 15 **Formulation of *L. intracellularis* N101494 Virulent Challenge**

- L. intracellularis* challenge material was grown continuously in McCoy cell suspension no more than 30 passes after initial isolation from infected gut tissue. Active cultures (2 x 3L) identified as SF 1422 and SF 1423 in addition to (1L) SF 1421 were grown in McCoy cell suspension for 7 days to 15-30% McCoy cell infection. On the day of challenge (day 21),
20 active cultures were harvested via centrifugation at 10,000 RPM for 15 minutes and cell pellets resuspended in 350mL total volume with SPG stabilizer. Harvested active culture was pooled with 300mL of frozen 10X to 20X concentrated challenge stocks of low passage N101494 at various passages (pass 24 to 27 post isolation).

- 25 **Storage of *L. intracellularis* N101494 Virulent Challenge**

Final formulations ready for challenge were stored at 2°C to 8°C or on ice until inoculation.

Pre/ Post-Vaccination and Challenge Titers

- 30 Results from the TCID₅₀ assay verified the amount of live *L. intracellularis* administered to each test animal per dose during vaccination and challenge. The average titers (n=5) of

pre and post titrations for the B3903 vaccine and the challenge material (*L. intracellularis* N101494) were as follows in Table 6:

Table 6

Group	Treatment (logs/dose)	Average logs/dose (2ml) Pre-vaccination (TCID ₅₀ /ml)	Average logs/dose (2ml) Post-vaccination (TCID ₅₀ /ml)	Total Average logs/dose
1	B3903 vaccine high dose	6.07	5.89	6.0
2	B3903 vaccine medium dose	4.94	4.84	4.9
3	B3903 vaccine low dose	3.9	3.5	3.8
4	Challenge Controls	7.85	7.57	7.71

5

Study Design

Sixty-five healthy *L. intracellularis* negative weaned piglets at 3 weeks of age were randomly divided into 5 treatment groups and housed separately throughout the study. On day 0, treatment Group 1 (15 pigs) received a 2mL dose (6.0 logs/dose) of B3903 vaccine by direct oral drench. Treatment Group 2 (15 pigs) received 1 x 2mL dose of B3903 vaccine titrated at 4.9 logs/dose by direct oral drench. Treatment Group 3 (15 pigs) received 1 x 2mL dose of B3903 vaccine titrated at 3.8 logs/dose by direct oral drench.

10

Treatment Groups 4 and 5 (10 pigs/group) received 1 x 2mL dose of placebo by direct oral drench.

15

On day 21 of the study (3 weeks post vaccination), test pigs in treatment Groups 1 - 4 received 1 x 10mL dose of virulent low passage pure culture *L. intracellularis* heterologous isolate N101494 by gastric gavage.

20

On day 42 of the study (3 weeks post challenge), all treatment Groups (1 - 5) were euthanized and necropsied for gross and microscopic lesion analysis for PPE.

Daily health observations were made from study initiation to the day of challenge for each test animal. Clinical health (diarrhea, behavior, and body condition) were scored daily from day of challenge (day 21) to termination of study (day 42). Weights were taken on day of vaccination (day 0), day of challenge (day 21) and on day of study termination (day 42) to calculate average daily weight gains of each treatment group. Fecal shedding of *L. intracellularis* was evaluated by polymerase chain reaction (PCR) by testing fecal swabs (f-PCR) on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, and 42 of the study. All animals euthanized at study termination (day 42) were examined for gross and microscopic lesions. Qualitative analysis of bacterial content in tissues was evaluated by PCR (t-PCR) along with histological evaluation for *L. intracellularis* in the ileum, colon, tonsil, and mesenteric lymph node day 42 of the study. Serum was collected on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, and 42 of the study. Serum was tested using the indirect florescent antibody test (IFAT) to detect anti-Lawsonia antibodies in test animals. Treatment group comparisons were made by data analysis of average daily weight gains post vaccination and post challenge, clinical scores, seroconversion rates (IFAT), colonization (t-PCR), fecal shedding (f-PCR), gross lesion, and microscopic lesion development by immunohistochemistry (IHC).

20

38

Results:
Summary of Primary Results

Table 7

Treatment Group	Pigs per Group	Treatment Group ID (logs/dose)	Average Gross Lesion Scores (ileum)	Average Gross Lesion Scores (colon)	Average Micro-Lesion scores (ileum)	Average Micro-Lesion Scores (colon)
1	15	B3903 vaccine high dose (6.0)	1.5 ab	1.2 a	0.2 ab	0.1 a
2	15	B3903 vaccine medium dose (4.9)	1.2 ab	1.0 a	0.4 ab	0.0 a
3	15	B3903 vaccine low dose (3.8)	2.5 b	1.5 b	1.0 b	0.3 a
4	10	Challenge Controls	3.6 c	2.2 b	2.4 c	1.5 b
5	10	Strict Controls	1.0 a	1.0 a	0.0 a	0.0 a

5 *Like letters indicate no significant difference (p<0.05)

Final test results for each treatment group revealed significant gross and microscopic lesion development of the ileum and colon in non-vaccinated, challenges control pigs (Group 4) compared to vaccinated pigs regardless of dose (high, medium, and low) in Groups 1, 2, and 3 (p<0.05). Average gross lesion scores of the vaccine-low dose colons were not significantly different than challenge controls. The vaccine-low dose group (Group 3) is the only treatment group that received vaccine and had significant lesion development (gross and microscopic) in comparison to the strict control group which did not receive a vaccination, placebo, or challenge throughout the study.

15

Clinical Scores

Clinical scores were recorded for each animal daily from day of challenge (day 21) to necropsy (day 42). Clinical scores were calculated to obtain an average daily clinical score reflecting the severity and duration of sickness among treatment groups due to receiving a virulent challenge of *L. intracellularis*. Average clinical scores for each treatment group are summarized in Table 8.

Table 8

Treatment Group	Group Identification	Average Clinical Score
1	B3903 vaccine – high dose	3.1 a
2	B3903 vaccine – medium dose	3.0 a
3	B3903 vaccine – low dose	3.0 a
4	Challenge Control	3.0 a
5	Strict Control	3.0 a

*Like letters denote no significant differences among average clinical scores from the day of challenge to necropsy ($p < 0.05$).

Statistical analysis of clinical scores was accomplished by reviewing the data in relation to treatment groups receiving average clinical scores using 1-way ANOVA. There was no evidence of significant differences among non-vaccinated, challenge controls and strict controls compared to the high, medium, or low dose vaccine groups.

Average Daily Weight Gains

Average daily weight gains (ADWG) were calculated from the time of vaccine administration (day 0), to challenge administration (day 21), to the termination of the study (day 42). Statistical analysis of weight gain differences (lbs. = pounds) between vaccine-high dose and non-vaccine, challenge control treatment groups revealed evidence of a significant difference from the time of challenge administration to necropsy ($p < 0.05$). The weight data is summarized in Table 9.

Table 9

Treatment Group	Group Identification	Average Initial Weight (lbs.)	ADWG (day 0 – 21) (lbs.)	ADWG (day 21 – 42) (lbs.)	ADWG Total (lbs.) (Vaccination to Necropsy)
1	B3903 vaccine high dose	17.8 a	0.94 a	1.63 a	1.29a
2	B3903 vaccine medium dose	17.7 a	1.00 a	1.60 ab	1.30a
3	B3903 vaccine low dose	18.0 a	0.94 a	1.48 ab	1.21a
4	Challenge Control	17.7 a	0.96 a	1.45 b	1.21a
5	Strict Control	17.7 a	0.94 a	1.63 ab	1.28a

*Like letters denote no significant differences between treatment groups in ADWGs from day of vaccination to challenge and from day of challenge to necropsy ($p < 0.05$).

5 Seroconversion (IFAT)

Serum samples were collected weekly from all test animals in each treatment group and tested for presence of anti-Lawsonia IgG antibodies on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, and 42 of the study. Positive and negative IFAT control samples were 100% accurate in all assays performed in this study. On days 0 through 21 (3 weeks post vaccination), all test animals in each treatment group were IFA negative. On day 28 (1 week post challenge) of the study, 1/15 (6.7%) test animals in the vaccine-high dose treatment group were IFA positive while all others tested IFA negative. On day 35 (2 weeks post challenge) of the study, 4/15 (26.7%) pigs in the vaccine-high dose and medium dose treatment groups and 1/10 (10%) pigs in the non-vaccine, challenge control treatment group were IFA positive for Lawsonia antibodies. Both vaccine-low dose and strict control treatment groups were IFA negative on day 35. On day 42 (3 weeks post challenge) of the study, 8/10 (80%) pigs in the challenge control group, 6/15 (40%) pigs in the vaccine-medium dose group, 5/15 (33.3%) pigs in the vaccine-low dose group, and 3/15 (20%) pigs in the vaccine-high dose group were IFA positive. The strict control treatment group was IFA negative at study termination (day 42).

Seroconversion data was analyzed using the Chi-square statistic. For results obtained in the strict control treatment group, a chi-square statistic was not computed due to the 100% negative responses found for each test animal throughout the study. In treatment groups receiving a vaccine or placebo, IFAT results were compared using Chi-square statistic with an estimation of exact p-value (Monte-Carlo). Positive IFAT results obtained from challenge groups receiving a virulent pure culture challenge were significantly higher than those receiving vaccine-high dose and vaccine-low dose ($p<0.05$) at day 42 (3 weeks post challenge) of the study.

10 Fecal Shedding of *L. intracellularis* (PCR)

Fecal swabs were collected weekly from all test animals in each treatment group and tested for the presence of *L. intracellularis* by PCR on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, and 42 of the study. Positive and negative DNA extraction and PCR reaction controls were 100% accurate for each assay conducted in this study. All test animals in each treatment group were fecal PCR negative for *L. intracellularis* from day 0 (vaccination) to day 21 (challenge). Pigs in the strict control group remained fecal PCR negative for *L. intracellularis* in their feces throughout the study. Fecal shedding of *L. intracellularis* (fecal PCR positive) was evident in various treatment groups each week after challenge inoculation. These results are summarized in Table 10.

20

Table 10

Treatment Group	Group Identification	Day 28 (1 week post challenge)	Day 35 (2 weeks post challenge)	Day 42 (3 weeks post challenge)
1	B3903 vaccine high dose	0/15 (0%) a	2/15 (13.3%) a	0/15 (0%) a
2	B3903 vaccine Medium dose	6/15 (40%) ab	5/15 (33.3%) a	0/15 (0%) a
3	B3903 vaccine low dose	4/15 (26.7%) ab	8/15 (53.3%) ab	2/15 (13.3%) ab
4	Challenge Control	4/10 (40%) b	7/10 (70%) b	4/10 (40%) b
5	Strict Control	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)

* Like letters denote no significant difference among treatment groups receiving a challenge ($p<0.05$).

Statistical analysis using Chi-square statistic with an estimation of the exact p-value (Monte Carlo) compared the positive responses in each vaccine treatment group to the non-vaccine, challenge control group only. Results from the strict control group were
5 withdrawn from group comparisons because each pig was 100% fecal PCR negative for *L. intracellularis* throughout the study. On day 28 (1 week post challenge), pigs receiving a high dose of vaccine had significantly less shedding of *L. intracellularis* than non-vaccinated, challenged pigs ($p = 0.017$). On day 35 (2 weeks post challenge), pigs receiving a high dose ($p = 0.0024$) and medium dose ($p = 0.041$) of vaccine had
10 significantly less shedding of *L. intracellularis* in their feces than non-vaccinated challenged pigs. On day 42 (study termination), again, pigs receiving a high and medium dose of vaccine ($p = 0.017$) had significantly less shedding of *L. intracellularis* in their feces compared to the non-vaccinated, challenged pigs. Pigs in the low dose group were not significantly less PCR positive than the challenge controls on any day post challenge.

15

L. intracellularis Tissue Colonization (PCR)

Polymerase Chain Reaction testing of tissue sections of the terminal ileum, colon, tonsil, and mesenteric lymph node were performed after necropsy (day 42 of the study). In the vaccine-high dose group, 1/15 (6.7%) pigs were PCR positive for *L. intracellularis*.
20 colonization in the tonsil while all other treatment groups were PCR negative. Ileitis PCR testing of mesenteric lymph tissue revealed 3/10 (30%) pigs in the non-vaccinated, challenge controls were positive for *L. intracellularis* colonization while all other treatment groups were PCR negative. Ileitis PCR testing of mucosal scrapings of the terminal ileum revealed 4/10 (40%) pigs in the challenge controls, 4/15 (26.7%) pigs in the vaccine-low
25 dose group, 2/15 (13.3%) pigs in the vaccine-medium dose group, and 1/15 (6.7%) pigs in the vaccine-high dose group PCR positive for *L. intracellularis* colonization. Ileitis PCR testing of the colon revealed 3/10 (30%) pigs in the challenge controls, 5/15 (33.3%) pigs in the vaccine-low dose group, 1/15 (6.7%) pigs in the vaccine-medium dose group, and 2/15 (13.3%) pigs in the vaccine-high dose group PCR positive for *L. intracellularis*
30 colonization. No evidence of *L. intracellularis* colonization was seen in tissues of the strict control group.

Statistical analysis of Ileitis PCR positive results were compared among treatment groups using Chi-square statistic with Monte Carlo approximation of the exact p-value.

- 5 Mesenteric lymph node PCR results indicated evidence of a significant difference among non-vaccinated, challenge controls and all treatment groups receiving a vaccine treatment ($p = 0.054$). No statistical significance was evident among treatment groups in *L. intracellularis* colonization in the ileum, colon, or tonsil at day 42 of the study.

Histology (IHC / H&E)

- 10 Sections 2 to 4cm in length of tonsil, mesenteric lymph node, terminal ileum, and colon were collected at necropsy (day 42) and placed in 10% buffered formalin for histological analysis. *Lawsonia intracellularis* was not detected by IHC staining of tonsil sections in all treatment groups at necropsy. The strict control group was negative for *L. intracellularis* by IHC in all tissue samples taken at necropsy. Presence of *L.*
- 15 *intracellularis* and microscopic lesions associated with PPE were found in the ileums of 9/10 (90%) pigs of the non-vaccinated, challenge controls, 6/15 (40%) pigs of the vaccine-low dose group, 3/15 (20%) pigs of the vaccine-medium dose group, and 1/15 (6.7%) pigs of the vaccine-high dose group respectively. Microscopic lesions were evident in the colon of 8/10 (80%) pigs in the challenge control group, 3/15 (20%) pigs in the vaccine-low dose
- 20 group, and 1/15 (6.7%) pigs in the vaccine-high dose group. The vaccine group receiving a medium dose was IHC negative for *L. intracellularis* in the colon. Stained sections of mesenteric lymph node produced only 1/10 (10%) pigs in the challenge control that had *L. intracellularis*. Positive IHC results in sections of the ileum and colon among treatment groups correlated well to the presence of marked crypt hyperplasia demonstrated by H&E
- 25 methodology.

- Statistical analysis of quantitative IHC data was accomplished using 1-way ANOVA and Kruskal-Wallis Rank Sum tests followed by specific contrasts of p-values between the challenge group and strict control groups to each vaccine dosage group. Statistical
- 30 analysis reveal evidence of a significant lesion development due to *L. intracellularis* in the ileum and colon of the challenge control group compared to vaccinated pigs regardless of

dose on day 42 of the study ($p < 0.001$). Statistical significance was not evident in average IHC lesion scores of the ileum and colon in vaccinated animals receiving a high or medium dose of vaccine compared to the strict control treatment group ($p > 0.05$). Pigs receiving a low dose of vaccine had significantly higher mean microscopic lesion scores due to *L. intracellularis* in the ileum compared to the strict control group ($p < 0.05$).

Gross Scores

The ileum and colon of each test animal were scored at the time of necropsy (day 42) for gross lesions associated with PPE. Tissues from test pigs in the strict control were normal, did not contain lesions, and received average lesion scores of 1.1 (ileum) and 1.0 (colon). Tissues of test animals in the non-vaccinated, challenge control group received the highest average gross lesion score for the ileum (3.6) and colon (2.0) among treatment groups. Test pigs in the vaccine-low dose group received average gross lesion scores of 2.5 (ileum) and 1.5 (colon). Vaccine-medium dose test pigs received average gross lesion scores of 1.5 (ileum) and 1.0 (colon). Tissues of the vaccine-high dose group received average gross lesion scores of 1.5 (ileum) and 1.2 (colon).

Statistical analysis of average gross lesion scores among treatment groups was accomplished by using 1-way ANOVA. Average gross lesion scores indicated evidence of a significant difference between ileums in non-vaccinated, challenge control group and vaccine-medium and high dose groups respectively ($p < 0.001$). Evidence of a significant difference was observed among average gross ileum scores of the challenge control compared to the vaccine-low dose group ($p < 0.01$). Average gross lesion scores of the colon were significantly higher in the challenge control group compared to the vaccine-medium and high dose groups respectively ($p < 0.05$). In addition, significant gross lesion development was observed in the ileum of the vaccine-low dose group compared to the strict control group ($p < 0.001$). No evidence of a statistical significance in average gross lesion scores (ileum and colon) were evident in vaccine-medium and high dose groups compared to the strict control treatment group.

30

Conclusions

This study demonstrated protection in 3-week-old pigs against PPE was accomplished when given an oral 2mL dose of B3903 (Lyophilized) vaccine containing a minimum of 4.9 logs of live *L. intracellularis* per dose. Similar if not slightly better protection was

5 evident in the vaccine-high dose treatment group that received 6.0 logs/dose 3 weeks prior to challenge. The low dose vaccine group (3.8 logs/dose) did not indicate adequate protection against a virulent pure culture heterologous challenge compared to the test animals receiving a high or medium dose of the experimental vaccine. Statistical differences were evident among the vaccine-low dose group and non-vaccinated, challenge

10 controls regarding the severity of microscopic lesions in the ileum and colon ($p < 0.001$) and average gross lesion scores of the ileum ($p < 0.01$). However, significant PPE lesions were observed in the ileum (microscopic lesions) and colon (gross lesions) of this group compared to the strict control group that did not receive vaccine or challenge.

15 In summary, the data from this study demonstrated that: (1) the minimum protective titer of a single oral administration of B3903 (Lyophilized) vaccine to 3 week old pigs is 4.9 logs/dose; (2) B3903 (Lyophilized) vaccine is efficacious against a virulent low passage pure culture *L. intracellularis*, heterologous isolate N101494; and (3) B3903 (Lyophilized) vaccine aids in the reduction of gross and microscopic lesions, tissue colonization, and

20 fecal shedding of *L. intracellularis* in vaccinated pigs compared to non-vaccinated pigs.

What is Claimed is:

1. A virulent isolate of *Lawsonia intracellularis*, wherein said virulent isolate is *Lawsonia intracellularis* deposit isolate ATCC No. PTA-4927 or a *Lawsonia intracellularis* isolate having all of the identifying characteristics of deposit isolate ATCC No. PTA-4927.
2. An avirulent isolate of *Lawsonia intracellularis*, wherein said avirulent isolate is *Lawsonia intracellularis* deposit isolate ATCC No. PTA-4926 or a *Lawsonia intracellularis* isolate having all of the identifying characteristics of deposit isolate ATCC No. PTA-4926.
3. A vaccine for the immunization of an animal, comprising a pharmaceutically effective amount of a killed virulent isolate of *Lawsonia intracellularis*, wherein said virulent isolate is the virulent isolate according to claim 1 or claim 2, and a pharmaceutically acceptable carrier.
4. The vaccine according to claim 3 wherein the pharmaceutically effective amount of the avirulent isolate of *Lawsonia intracellularis* is about 10^3 TCID₅₀ to about 10^6 TCID₅₀ per dose.
5. A vaccine for the immunization of an animal, comprising the avirulent isolate of *Lawsonia intracellularis* according to claim 2 and antigenic material from at least one of the following pathogens: *Salmonella* spp., *Erysipelothrix* spp., *Haemophilus* spp., *Mycoplasma* spp., *Leptospira* spp., *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Brachyspira* spp., circovirus, porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus, swine influenza virus (SIV), transmissible gastro-enteritis (TGE) virus, parvovirus, and *Escherichia coli*; and a pharmaceutically acceptable carrier.
6. A vaccine for the immunization of an animal, comprising the avirulent isolate of *Lawsonia intracellularis* according to claim 2 and antigenic material from *Salmonella*

choleraesuis, *Erysipelothrix* spp. transmissible gastro-enteritis (TGE) virus, *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., and *Brachyspira* spp.; and a pharmaceutically acceptable carrier.

5

7. A vaccine for the immunization of an animal, comprising the avirulent isolate of *Lawsonia intracellularis* according to claim 2 and antigenic material from *Salmonella choleraesuis* and *Erysipelothrix* spp.; and a pharmaceutically acceptable carrier.

10

8. A vaccine for the immunization of an animal, comprising the avirulent isolate of *Lawsonia intracellularis* according to claim 2 and antigenic material from at least one of the following pathogens: *Clostridium* spp., equine influenza virus (EIV), equine herpes virus (EHV), alphavirus, and West Nile virus; and a pharmaceutically acceptable carrier.

15

9. A method for stimulating the immune system of an animal to respond to an immunogenic antigen of pathogenic *Lawsonia intracellularis*, comprising administering to said animal an immunogenic composition containing the avirulent isolate of *Lawsonia intracellularis* according to claim 2.

20

10. A method of immunizing an animal against porcine proliferative enteropathy comprising administering a pharmaceutically acceptable amount of the avirulent isolate of *Lawsonia intracellularis* of claim 2, wherein the pharmaceutically effective amount of the avirulent isolate of *Lawsonia intracellularis* is about 10^3 TCID₅₀ to about 10^6 TCID₅₀ per dose.

25

11. A method for making a vaccine for inducing an immune response to *Lawsonia intracellularis* bacteria in an animal, comprising the steps of: (a) incubating a *Lawsonia intracellularis* isolate according to claim 1 or claim 2 in culture cells which are in suspension at an oxygen concentration of less than about 10 percent to cultivate

30

said bacteria; and (b) mixing said cultivated bacteria with a pharmaceutically acceptable carrier.

12. The method according to claim 11 further comprising the step of killing said cultivated
5 bacteria to prepare a vaccine containing killed *Lawsonia intracellularis*.

13. The method according to claim 11 further comprising the step of cultivating said bacteria for a sufficient time to produce an attenuated isolate.

10 14. A method for cultivating *Lawsonia intracellularis* comprising:

- (a) infecting cultured cells with an inoculum comprising the virulent isolate of *Lawsonia intracellularis* according to claim 1,
- (b) incubating said infected cells at an oxygen concentration of less than about 10 percent while maintaining said infected cells in suspension by agitation of said
15 cells for a sufficient period of time to increase the production of said *Lawsonia intracellularis*, and
- (c) harvesting at least a portion of said *Lawsonia intracellularis*.

15. The method according to claim 14 wherein the oxygen concentration is in the range of
20 about 0 percent to about 8 percent.

16. The method according to claim 15 wherein the oxygen concentration is in the range of about 0 percent to about 3 percent.

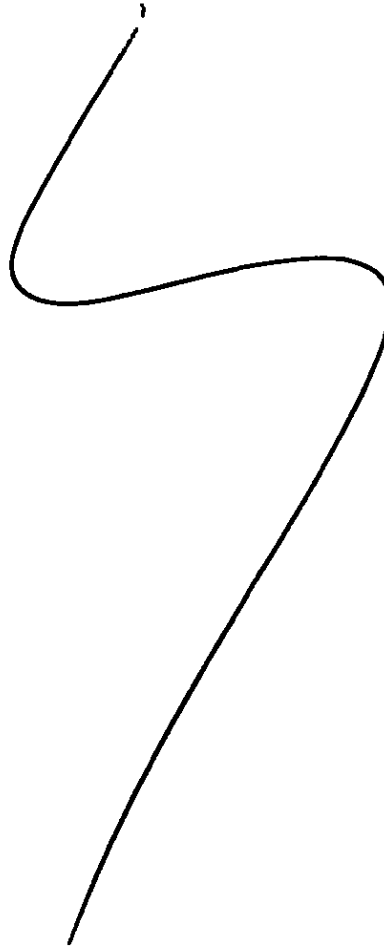
25 17. The method according to claim 14 wherein said incubation occurs at a carbon dioxide range of about 6 percent to about 10 percent.

18. The method according to claim 14 wherein said cultured cells are selected from the group consisting of: HEp-2, McCoy, and IEC-18 cells.
30

19. The method according to claim 18 wherein said IEC-18 cells are cultured on microcarriers.
20. The method according to claim 14 wherein the infected cells are incubated according to step (c) for a period of about 2 to about 10 days.
21. The method according to claim 14 further comprising a step (d) of cultivating said bacteria for a sufficient time to produce an attenuated isolate.
22. The method according to claim 21 wherein the bacteria are cultivated according to step (d) for a period of about 150 days to about 250 days.
23. The method according to claim 22 further comprising a step (e) of lyophilizing said attenuated isolate.
24. The method according to claim 23 wherein said lyophilizing comprises a primary drying step and a secondary drying step.
25. A lyophilized attenuated isolate produced by the method according to claim 23.
26. A method for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy comprising performing an assay to detect antibodies to *Lawsonia intracellularis* in a non-human animal subject comprising:
- (a) contacting a sample from the subject with the *Lawsonia intracellularis* isolate according to claim 1 or claim 2 to form an antigen-antibody complex; and
 - (b) detecting the formation of said complex,
- wherein the presence of said complex correlates positively with a diagnosis of porcine proliferative enteropathy.

27. The method according to claim 26 wherein the assay comprises an assay selected from the group consisting of: radioimmunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay, fluorescence immunoassay, and immunoelectrophoresis assay.

- 5 28. A method for producing antisera against *Lawsonia intracelluris* in a non-human animal comprising:
- (a) administering the *Lawsonia intracelluris* isolate of claim 1 or claim 2 to a non-human animal in an amount effective to elicit an immune response; and
 - (b) collecting antiserum or plasma containing antibodies to said *Lawsonia*
- 10 *intracelluris*.



**LAWSONIA INTRACELLULARIS DE ORIGEN EUROPEO Y VACUNAS,
AGENTES DE DIAGNÓSTICO Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS**

SOLICITUD RELACIONADA

- 5 Esta solicitud reivindica beneficio a favor de la Solicitud Provisional de Estados Unidos con el n° de serie 60/490.001, depositada el 25 de julio de 2003, cuya descripción se incorpora como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

- 10 La presente invención trata de vacunas de *Lawsonia intracellularis* y de métodos para proteger frente a, y diagnosticar, una infección por *L. intracellularis*. Los productos y procesos de la invención son posibles, en parte, como resultado de un método mejorado para cultivar provisiones a gran escala de *L. intracellularis*, incluyendo tanto una nueva cepa clínica de *L. intracellularis* de origen europeo como un método para preparar un
15 producto liofilizado que contiene la cepa clínica europea atenuada como un producto de vacuna.

- L. intracellularis*, el agente causal de la enteropatía proliferativa porcina ("PPE"), afecta prácticamente a todos los animales, incluyendo: conejos, hurones, hámsters, zorros,
20 caballos y otros animales tan distintos como avestruces y emus. *L. intracellularis* es una causa particularmente grande de pérdidas en el ganado porcino de Europa, así como de los Estados Unidos.

- Una característica uniforme de la PPE es la aparición de bacilos curvados
25 intracitoplasmáticos no unidos a la membrana dentro de los enterocitos de las porciones afectadas del intestino. La bacteria asociada con la PPE se ha denominado "organismos de tipo *Campylobacter*." S. McOrist y col., Vet. Pathol., Vol. 26, 260-264 (1989). Posteriormente, se ha identificado la bacteria causal como un nuevo género y especie taxonómicas, comúnmente denominada *Ileal symbiont* (IS) *intracellularis*. C. Gebhart y
30 col., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, n° 3, 533-538 (1993). Más recientemente, estas nuevas bacterias han recibido el nombre taxonómico de *Lawsonia (L.) intracellularis*.

S. McOrist y col., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 45, n° 4, 820-825 (1995). Estos tres nombres se han usado de forma intercambiable para referirse al mismo organismo, según se identificará y describirá adicionalmente en este documento.

- 5 *L. intracellularis* es una bacteria intracelular obligada que no puede cultivarse mediante los métodos bacteriológicos normales en un medio acelular convencional, y se ha creído que requiere de células epiteliales adheridas para su crecimiento. S. McOrist y col., Infection and Immunity, Vol. 61, n° 19, 4286-4292. (1993) y G. Lawson y col., J. of Clinical Microbiology, Vol. 31, n° 5, 1136-1142 (1993) discuten sobre el cultivo de *L.*
- 10 *intracellularis* usando monocapas de células IEC-18 epiteliales intestinales de rata en matraces de cultivo tisular convencionales. Además, H. Stills, Infection and Immunity, Vol. 59, n° 9, 3227-3236 (1991) discuten el uso de monocapas de células Intestine 407 intestinales embrionarias humanas y monocapas de células colónicas de adenocarcinoma GPC-16 de cobaya en matraces de cultivo tisular convencionales.

15

- Recientemente se ha aprobado una vacuna de *L. intracellularis* para su uso en los Estados Unidos, vacuna que está basada en las cepas clínicas de *L. intracellularis* descritas y reivindicadas en las patentes de Estados Unidos n° 5.714.375 y 5.885.823, estando ambas patentes incorporadas al presente documento como referencia en su totalidad. La vacuna
- 20 descrita anteriormente es comercializada por Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506-2002, con el nombre comercial ENTERISOL® Ileitis.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 25 Un objeto de la invención es proporcionar una vacuna mejorada de *L. intracellularis* usando una cepa clínica de origen europeo.

- Otro objeto de la invención es proporcionar un método de cultivo mejorado de *L. intracellularis* a gran escala y técnicas mejoradas para la producción de vacunas de *L.*
- 30 *intracellularis*.

Para conseguir estos y otros objetos, y según el propósito de la invención, según se ejemplifica y se describe ampliamente en este documento, la presente invención proporciona una nueva cepa clínica de *L. intracellularis* de Europa, un método para atenuar dicha cepa clínica y la cepa clínica atenuada del mismo. En este documento
5 también se proporciona una vacuna que comprende la cepa clínica atenuada. En este documento también se proporciona un método para producir una vacuna que comprende la cepa clínica atenuada en forma liofilizada para su reconstitución en el momento de su administración y el producto liofilizado de la misma.

10 En una forma de realización, la nueva cepa clínica *L. intracellularis* de Europa, la cepa clínica DK 15540, es la cepa clínica depositada en la ATCC con el n° de acceso PTA-4927. En otra forma de realización, la cepa clínica atenuada derivada de la cepa clínica DK 15540, se denomina cepa clínica B3903, con el n° de acceso de la ATCC PTA-4926.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Según se usa en este documento, el término "*L. intracellularis*" significa la bacteria intracelular curvada gramnegativa descrita detalladamente por C. Gebhart y col., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, n° 3, 533-538 (1993) y S. McOrist y col., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 45, n° 4, 820-825 (1995), cada uno de las cuales se incorpora
20 al presente documento como referencia en su totalidad, e incluye, pero no se limita a, la cepa clínica denominada DK 15540 que se depositó bajo el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 el 9 de enero de 2003 y se le asignó el número de acceso de la ATCC PTA-4927; bacteria causal que puede obtenerse a partir de cerdos o de otros animales infectados
25 por PPE por todo el mundo dados los conocimientos en la materia y las enseñanzas de este documento; y variantes o mutantes de cualquiera de las anteriores bacterias, obtenidas tanto espontánea como artificialmente.

Según se usa en este documento, el término "cepa clínica atenuada" significa cualquier
30 cepa clínica de *L. intracellularis* que se prepara según las técnicas de cultivo y de pase enseñadas en este documento para conseguir la avirulencia manteniendo a la vez las

propiedades inmunógenas cuando se administra a un animal hospedador, incluyendo, pero no limitándose a, la cepa clínica atenuada denominada B-3903 que se depositó bajo el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 el 9 de enero de 2003 y se le asignó el número
5 de acceso PTA-4926.

La cepa clínica atenuada de la invención puede usarse como inmunógeno en vacunas antimicrobianas para animales, incluyendo aves, peces y mamíferos tales como vacas, cerdos, caballos y primates. Dichas vacunas pueden prepararse mediante las técnicas
10 conocidas por los expertos en la materia y dadas las enseñanzas contenidas en este documento. Dicha vacuna comprendería una cantidad inmunológicamente eficaz de la cepa clínica atenuada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La vacuna podría ser administrada en una o más dosis. Una cantidad inmunológicamente eficaz se determina mediante los medios conocidos en la materia sin una experimentación ilícita, dadas las
15 enseñanzas contenidas en este documento. La cantidad de bacterias avirulentas debería ser suficiente para estimular una respuesta inmune en animales susceptibles a la enfermedad siendo todavía avirulentas. Esto dependerá del animal en particular, de las bacterias y de la enfermedad implicada. La dosis recomendada a administrar al animal susceptible es preferiblemente de aproximadamente una $TCID_{50}$ (dosis infectiva del cultivo tisular al 50%
20 del punto final)/dosis de 3,0 hasta aproximadamente una $TCID_{50}$ /dosis de 6,0, y más preferiblemente de aproximadamente una $TCID_{50}$ /dosis de 4,0 hasta aproximadamente una $TCID_{50}$ /dosis de 5,0. En una forma de realización preferible, el título de la vacuna es de aproximadamente una $TCID_{50}$ /dosis de 4,9, según se determina mediante el ensayo de Dosis Infectiva Del Cultivo Tisular al 50% de dilución del punto final ($TCID_{50}$). Los
25 vehículos son conocidos por los expertos en la materia, e incluyen estabilizantes y diluyentes. Dicha vacuna también puede contener un coadyuvante apropiado. Las vacunas de la invención pueden usarse en combinación con otras vacunas, por ejemplo, como diluyente de otra vacuna. Las preparaciones de la vacuna también pueden desecarse, por ejemplo, mediante liofilización, con el propósito de su almacenamiento o para su
30 subsiguiente formulación en vacunas líquidas.

Consecuentemente, la invención también comprende un método para inducir una respuesta inmune ante bacterias virulentas naturales de *L. intracellularis* en un hospedador animal con el propósito de proteger a ese hospedador de dichas bacterias. El método comprende la administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de bacterias atenuadas o de bacterias muertas de la invención al hospedador, y preferiblemente, la administración de la vacuna de la invención al hospedador.

Según se usa en este documento, el término "cultivo a gran escala" significa un nivel de cultivo de *L. intracellularis* mayor de aproximadamente 2,0 a 3,0 litros, e incluye la producción a una escala de 100 litros o más. "Cultivo" según se usa en este documento, significa el proceso de promover el crecimiento, la reproducción y/o la proliferación de *L. intracellularis*.

L. intracellularis puede ser cultivada mediante los métodos conocidos en la materia, preferiblemente según las patentes de Estados Unidos n^{os} 5.714.375 y 5.885.823. Por ejemplo, las células del cultivo pueden ser inoculadas en primer lugar con un inóculo que comprende bacterias de *L. intracellularis* de forma que las células se infecten con las bacterias. Pueden usarse numerosas líneas celulares en la práctica de la invención, incluyendo, pero no limitándose a, IEC-18 (ATCC 1589)—células epiteliales intestinales de rata, HEp-2 (ATCC 23)—células de carcinoma epidermoide humano, McCoys (ATCC 1696)—células del ratón (no especificadas), BGMK (Biowhittaker #71-176)—células de riñón de mono verde africano, y células epiteliales intestinales porcinas. Las células del cultivo preferibles son células HEp-2, McCoys o IEC-18.

Si se usan células de cultivo, antes de ser inoculadas, las células deben estar en forma de una monocapa. Para formar una monocapa, las células pueden sembrarse en matraces convencionales. Cada matraz se siembra generalmente con entre aproximadamente 1×10^5 células hasta aproximadamente 10×10^5 células por 25, 75, 150, 850 cm² de matraz o frasco rotatorio mezcladas con medio de crecimiento. El medio de crecimiento puede ser cualquier medio para el cultivo celular que incluya una fuente de nitrógeno, los factores de crecimiento necesario para las células del cultivo elegidas y una fuente de carbono, tal

como glucosa o lactosa. El medio preferible es DMEM reforzado con Ham F 12 con un 1-5% de suero bovino fetal, aunque puede usarse otro medio disponible comercialmente con buenos resultados.

- 5 El cultivo satisfactorio de *L. intracellularis* se mejora manteniendo las células del cultivo en un estado de constante crecimiento. Por lo tanto, la monocapa de células del cultivo debería de estar en aproximadamente el 20 por ciento hasta aproximadamente el 50 por ciento de confluencia en el momento de la inoculación. Preferiblemente, las células deberían estar en aproximadamente el 30 por ciento hasta aproximadamente en 40 por
- 10 ciento de confluencia en el momento de la inoculación, muy preferiblemente a aproximadamente el 30 por ciento de confluencia.

- Alternativamente, las células, antes de ser inoculadas, pueden hacerse crecer en suspensión, según se describe a continuación. Preferiblemente, las células se hacen crecer
- 15 en primer lugar hasta una confluencia del 100% en forma de una monocapa en un sistema de tipo adherente, por ejemplo, un sistema de frasco rotatorio, y después se transfieren a 3-3000 litros y se hacen crecer en suspensión. Alternativamente, las células pueden hacerse crecer en suspensión hasta la densidad celular deseada, por ejemplo, de 2×10^5 células/ml, dentro del depósito de 3-3000 litros (biorreactor, fermentador, matraz de agitación, etc.)
- 20 usando los parámetros adecuados para el crecimiento dentro de este sistema antes de la inoculación.

- El inóculo puede ser un cultivo puro de *L. intracellularis* obtenido a partir de cerdos o de otros animales infectados. Preferiblemente el inóculo puede ser un cultivo puro de *L.*
- 25 *intracellularis* obtenido del n° de acceso de la ATCC PTA-4927.

- El inóculo puede ser un homogeneizado intestinal preparado mediante el raspado de la mucosa del ileon de un cerdo o de otro animal infectado con PPE. Cuando se prepara un homogeneizado intestinal, las secciones del ileon elegidas para el cultivo deberían mostrar
- 30 lesiones graves con un engrosamiento macroscópico del intestino. Debido a la naturaleza frágil de las bacterias, las muestras deberían almacenarse preferiblemente a -70°C tan

rápido como sea posible tras la necropsia. Preferiblemente se añade un antibiótico al cual sea resistente *L. intracellularis* tal como vancomicina, anfotericina B o miembros del grupo de antibióticos aminoglucósidos, incluyendo gentamicina y neomicina, por nombrar algunos, al inóculo para eliminar las bacterias contaminantes a la vez que se permite el
5 crecimiento de *L. intracellularis*. Tanto si el inóculo es un cultivo puro como si es un homogeneizado intestinal, la inoculación de las células del cultivo puede realizarse mediante varias técnicas conocidas en la materia, dadas las enseñanzas de este documento.

Las bacterias y/o las células del cultivo inoculadas se incuban entonces con una
10 concentración reducida de O₂ disuelto. Con concentraciones de oxígeno disuelto mayores del 10% el crecimiento de *L. intracellularis* es inferior al óptimo, produciéndose finalmente el cese del crecimiento con unas concentraciones de oxígeno fuera de este intervalo. Preferiblemente, las bacterias y/o las células del cultivo inoculadas se incuban con una concentración de oxígeno disuelto en el intervalo de aproximadamente el 0% hasta
15 aproximadamente el 10%. Más preferiblemente, las bacterias y/o las células del cultivo se incuban con una concentración de oxígeno en el intervalo de aproximadamente el 0% hasta aproximadamente el 8%, siendo muy preferible una concentración de oxígeno de aproximadamente el 0% hasta aproximadamente el 3,0%.

20 La concentración apropiada de dióxido de carbono también es importante para un adecuado crecimiento de *L. intracellularis*. Con concentraciones de dióxido de carbono mayores del 0% y menores del 4%, se produce un crecimiento no óptimo, produciéndose finalmente el cese del crecimiento con unas concentraciones de dióxido de carbono fuera de este intervalo. Preferiblemente, la concentración de dióxido de carbono está en el
25 intervalo de desde aproximadamente el 6% hasta aproximadamente el 10%, siendo muy preferible una concentración de dióxido de carbono de aproximadamente el 8,8%.

Además, las células se incuban preferiblemente con una concentración de hidrógeno en el intervalo de desde aproximadamente el 4% hasta aproximadamente el 10%. Muy
30 preferiblemente, las células se incuban en aproximadamente el 0 hasta aproximadamente el 8,0% de O₂, aproximadamente el 8,8% de CO₂, y aproximadamente el 4% de H₂. El

nitrógeno se usa como "compensador" en la mezcla de gases, que contiene nitrógeno (96%) e hidrógeno (4%) o nitrógeno (80%), dióxido de carbono (10%) e hidrógeno (10%) para el crecimiento de este organismo. Las células se incuban preferiblemente con una concentración de nitrógeno en el intervalo de desde aproximadamente el 80% hasta el 5 96%. Por lo tanto, las células se incuban muy preferiblemente en aproximadamente el 0 hasta aproximadamente el 8,0% de O₂, aproximadamente el 8,8% de CO₂, aproximadamente el 4% de H₂ y aproximadamente el 96% de N₂.

Las células inoculadas pueden incubarse en un incubador gaseoso doble o en otras cámaras 10 de gas que contengan las concentraciones apropiadas de hidrógeno, oxígeno y dióxido de carbono y que permitan a las células estar suspendidas durante la incubación. La cámara debería comprender un medio para mantener las células inoculadas en suspensión, y un monitor de gases y una fuente de suministro para suministrar y mantener las concentraciones apropiadas de gases. La temperatura de incubación debería estar en el 15 intervalo de desde 30°C hasta aproximadamente 45°C y más preferiblemente está en el intervalo de desde aproximadamente 36°C hasta aproximadamente 38°C. Muy preferiblemente, la temperatura es de aproximadamente 37°C. El equipo necesario para el cultivo y la atenuación es fácilmente accesible para los expertos habituales en la materia, dadas las enseñanzas de este documento. Un ejemplo de un equipo adecuado para llevar a 20 cabo la presente invención es un incubador gaseoso doble, por ejemplo, el modelo 480 (Lab-Line, Melrose Park, IL) junto con matraces de agitación para mantener las células en suspensión. El equipo actualmente preferible comprende un fermentador, un biorreactor, una placa vibradora o un agitador rotatorio que contiene al menos aproximadamente 2 litros de medio y que es capaz de mantener las células del cultivo en suspensión mediante 25 el rociado de un gas a la concentración apropiada, u otros medios de agitación mecánica, y una monitorización continua de los niveles de O₂ disuelto en el medio. New Brunswick, Braun y otras compañías fabrican fermentadores y biorreactores adecuados para este propósito.

30 Manteniendo las células inoculadas en un estado de suspensión durante la incubación, se obtiene un crecimiento máximo de las células, y por tanto, de *L. intracellularis*,

aumentando la exposición de cada célula individual al medio de crecimiento y a la mezcla adecuada de hidrógeno, oxígeno y dióxido de carbono. Las células del cultivo pueden agitarse y mantenerse en suspensión mediante una variedad de métodos conocidos en la materia, incluyendo, por ejemplo, matraces del cultivo, frascos rotatorios, cultivos de membrana, BioBags, sistemas de biorreactor WAVE™, fermentadores y matraces de 5 agitación. Las células pueden mantenerse en suspensión durante la incubación incubando las células en un matraz de agitación dentro de un incubador gaseoso doble o un aparato similar. El término "matraz de agitación", según se usa en este documento, significa un matraz u otro recipiente que emplea una pala, una hélice u otro medio para agitar el cultivo 10 y mantener las células contenidas en el mismo en suspensión.

En una forma de realización preferible, las células inoculadas se incuban hasta que las células alcanzan la confluencia, y entonces las células se colocan en un matraz de agitación que contiene medio de crecimiento y se incuban en un incubador gaseoso doble mientras se 15 hace girar el matraz. Preferiblemente, las células inoculadas se raspan o se tripsinizan y se pasan al matraz de agitación. Esto puede conseguirse mediante una variedad de métodos conocidos en la materia, tal como usar un raspador celular para desprender las células. Una vez que las células han sido introducidas en el matraz de agitación, la pala del matraz de agitación se hace girar típicamente en el intervalo de desde aproximadamente 5 hasta 20 aproximadamente 500 rpm sobre una placa de agitación magnética con objeto de mantener las células infectadas en suspensión.

Una porción de la *L. intracellularis* cultivada se pasa entonces a un cultivo nuevo para aumentar la producción de las bacterias *L. intracellularis*. El término "pasar" o 25 variaciones del mismo en este documento significa el proceso de transferir una porción de la *L. intracellularis* cultivada a células de cultivo nuevo con objeto de infectar las células nuevas con la bacteria. El término "nuevas", según se usa en este documento, significa células que todavía no han sido infectadas por *L. intracellularis*. Preferiblemente dichas células tienen una media de no más de aproximadamente un día de edad.

El pase de *L. intracellularis* en cultivos en suspensión puede conseguirse retirando una porción del cultivo original y añadiéndola a un nuevo matraz que contiene células de cultivo nuevas. Si el cultivo original tiene un elevado número de bacterias/ml, por ejemplo, mayor de aproximadamente 10^4 bacterias/ml, es preferible añadir entre
5 aproximadamente el 1 y el 10% (volumen en volumen) de cultivo desde el matraz infectado a un nuevo matraz que contiene células nuevas. Esto se realiza preferiblemente cuando el 50-100% de las células están infectadas. Si hay menos del 50% de células infectadas, el pase se realiza preferiblemente dividiendo el cultivo en 1:2 en un nuevo matraz y completando el volumen añadiendo células de cultivo tisular y medio nuevos. En
10 cualquier caso, no son necesarias las etapas de lisis celular ni otras etapas, en contraste directo con el pase de cultivos en monocapa, como en la técnica anterior.

Después de un crecimiento suficiente de las células del cultivo y de la subsiguiente infección por *L. intracellularis*, según se determina mediante una tinción con anticuerpos
15 por fluorescencia indirecta (IFA), mediante la TCID₅₀ u otro método comparable, se recolecta después al menos una porción de las bacterias *L. intracellularis* cultivadas. La recolección se realiza típicamente a una infectividad celular de aproximadamente 60% o mayor; sin embargo, el experto en la materia sabe que la recolección podría realizarse a una infectividad celular de menos del 60%. La etapa de recolección puede realizarse
20 separando las bacterias de la suspensión mediante varias técnicas conocidas por los expertos habituales una materia, dadas las enseñanzas de este documento. Preferiblemente, las bacterias *L. intracellularis* se recolectan centrifugando el contenido de todos o de una porción de la suspensión para sedimentar las células del cultivo, resuspendiendo los sedimentos celulares resultantes y lisando las células infectadas. Típicamente, al menos
25 una porción del contenido se centrifuga a aproximadamente 3000 x g durante aproximadamente 20 minutos con objeto de sedimentar las células y las bacterias. Entonces el sedimento puede resuspenderse en, por ejemplo, una disolución de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) y hacerse pasar aproximadamente 20 veces a través de una aguja de calibre 25 con objeto de lisar las células. Si se desea una purificación adicional, las
30 muestras pueden centrifugarse a aproximadamente 145 x g durante aproximadamente cinco minutos para eliminar los núcleos y los desechos celulares. Entonces el sobrenadante

puede centrifugarse a aproximadamente 3000 x g durante aproximadamente veinte minutos, y el sedimento resultante resuspenderse en un diluyente apropiado, tal como SPG con suero bovino fetal (para preparar las bacterias recolectadas adecuadamente para su liofilización, congelación o para su uso como inoculante) o medio de crecimiento (para
5 preparar las bacterias recolectadas más adecuadamente para su pase a células nuevas).

Según se mencionó previamente, el crecimiento eficaz de *L. intracellularis* para su producción a gran escala se mejora manteniendo las células del tejido creciendo activamente. Con las monocapas, cuando los cultivos se hacen confluyentes, la tasa de
10 división celular disminuye considerablemente. Los intentos de hacer crecer *L. intracellularis* en cultivos tisulares monocapa han tenido un éxito limitado y el aumento de escala no ha sido posible. Sin embargo, el uso de cultivos en suspensión facilita enormemente el mantenimiento de las células en crecimiento activo y permite una expansión continua del cultivo y el aumento de escala. Usando un fermentador y entre
15 aproximadamente el 0 y el 3% de O₂ disuelto, según se explicó anteriormente, se permite el crecimiento de hasta y más de 10⁸ bacterias/ml.

Cuando se usan células IEC-18, es preferible añadir gelatina, agarosa, colágeno, acrilamida o perlas de sílice, tales como microvehículos porosos Cultisphere-G (HyClone
20 Laboratories, Logan Utah), junto con el medio de crecimiento. Sin embargo, las células HEp-2 y otras no requieren microvehículos según los métodos usados en este documento.

Con el propósito de mantenimiento del cultivo, en cultivos de HEp-2, se elimina preferiblemente del 25% al 50% del cultivo y se sustituye por medio nuevo en intervalos
25 semanales. Para los cultivos celulares con microvehículos o perlas, se elimina preferiblemente del 25% al 50% del cultivo y se sustituye por medio nuevo 1-2 veces por semana. Con el propósito de aumentar la escala, puede añadirse al cultivo del 25% al 50% de medio adicional, o de medio con microvehículos.

30 Dependiendo de la tasa a la que las células del cultivo se infectan, el pase de células nuevas se produce generalmente entre aproximadamente cada 2 hasta aproximadamente 7 días.

Suponiendo que las células del cultivo se infecten al menos al 70% cada 2 a 7 días, el pase se produce preferiblemente entre aproximadamente cada 5 a 7 días.

La presente invención también proporciona vacunas y métodos para producir vacunas
5 frente a la nueva cepa clínica de *L. intracellularis* de origen europeo. Preferiblemente, tras mantener las células infectadas en suspensión durante un tiempo prolongado (por ejemplo, 6-8 meses), al menos una porción de las bacterias *L. intracellularis* cultivadas se recolectan y se monitorizan para comprobar la potencial atenuación. Dicha monitorización se consigue preferiblemente mediante la exposición de animales hospedadores o de modelos
10 animales para seleccionar una cepa clínica atenuada. Dichas cepas clínicas atenuadas se usan en vacunas según los métodos enseñados en este documento.

La presente invención permite una rápida expansión del cultivo y un aumento en el rendimiento de 100-1000 veces, y reduce los costos para la producción de *L. intracellularis*
15 de origen europeo. Como resultado, el abundante suministro de bacterias *L. intracellularis* producido se atenúa fácilmente con el propósito de la producción de vacunas. El método de hacer crecer *L. intracellularis* en suspensión aumenta en gran medida la facilidad, la velocidad y el número de bacterias disponibles para este propósito. Cuántas más células y divisiones celulares se produzcan, mayor será el nivel de mutaciones que se produzca, que son ventajosas para el desarrollo de la vacuna. Por lo tanto, el crecimiento en suspensión
20 aumenta la expresión de importantes inmunógenos controlados por genes regulados ambientalmente, y sus productos de expresión.

Las cepas clínicas atenuadas resultantes pueden cultivarse en cultivos tisulares en
25 monocapas, pero preferiblemente se cultivan en cultivos en suspensión. Otros medios de atenuación pueden incluir la atenuación química mediante el uso de, por ejemplo, N-metilnitrosoguanidina y otros conocidos en la materia. Tanto mediante el pase múltiple como por medios químicos, se produce una *L. intracellularis* atenuada, y se selecciona para la preparación de vacunas. En una forma de realización preferible, la cepa clínica
30 atenuada resultante es el n° de acceso de la ATCC PTA-4926.

El antígeno de la vacuna puede recolectarse mediante centrifugación o microfiltración, según se describió anteriormente. Entonces el antígeno se estandariza a un nivel definido basado en la respuesta inmune óptima del animal hospedador, determinada mediante un ajuste de la dosis en las especies animales hospedadoras. Las bacterias pueden inactivarse mediante los métodos conocidos en la materia, por ejemplo, usando formalina al 0,3% u otros agentes inactivantes para preparar una vacuna muerta. Entonces se incorpora el antígeno en un coadyuvante adecuado, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, para incrementar la respuesta inmune. Entonces se usa el antígeno para vacunar al hospedador por vía intramuscular o mediante infección subcutánea, en el caso de cerdos de aproximadamente 3-4 semanas de edad, con una dosis de refuerzo si fuera necesario.

Preferiblemente, las bacterias se pasan sucesivamente para inducir y seleccionar un cultivo vivo avirulento atenuado. El cultivo se prueba en el animal hospedador para comprobar los signos de atenuación. El cultivo se recolecta según se describió anteriormente y se liofiliza. Los cerdos, por ejemplo, se vacunan por vía oral con de 1×10^4 a 1×10^6 bacterias. Aproximadamente veintiocho días después de la vacunación, los cerdos son inoculados por vía oral con aproximadamente 1×10^7 organismos de un cultivo virulento menos pasado (menos de 30 pases *in vitro* más allá de la cepa clínica original procedente del homogenizado intestinal) de *L. intracellularis*. Las necropsias de los animales infectados se realizan 21 días después de la exposición, y se observaron los intestinos delgados para evaluar las lesiones macroscópicas así como las lesiones microscópicas. También debería realizarse una PCR, una fluorescencia indirecta con anticuerpos (IFA) o una inmunohistoquímica (IHC). Aproximadamente el ochenta por ciento de los animales de control mostrarán lesiones macroscópicas o microscópicas y una prueba positiva de presencia de *L. intracellularis* en las células mucosas del intestino usando cualquiera de los métodos de prueba PCR, IFA o IHC. Los animales vacunados tendrán superficies mucosas normales, según se determina mediante observaciones histológicas, y serán negativos mediante una prueba de PCR entre 3 y 4 semanas tras la inoculación.

Generalmente, una cepa clínica atenuada inmunogénica de *L. intracellularis* se produce después de un cultivo continuó durante aproximadamente 150 días hasta aproximadamente

250 días, tiempo durante el cual el cultivo se pasa aproximadamente 50-100 veces. Sin embargo, el experto en la materia sabe que pueden producirse otros cultivos atenuados modificando estas cifras.

- 5 El producto de vacuna de la invención puede ser liofilizado. Tras la recolección, la cepa clínica puede concentrarse mediante varios métodos conocidos en la materia, y puede mezclarse con un estabilizante, por ejemplo, un estabilizante de gelatina de sacarosa. El producto de vacuna puede someterse entonces a una congelación y desecación (liofilización). Generalmente, la etapa de congelación comprende descender bruscamente
- 10 hasta aproximadamente $-45^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y mantener durante desde aproximadamente 150 minutos hasta aproximadamente 480 minutos. La etapa de secado puede comprender etapas primarias y secundarias de secado. Por ejemplo, la etapa primaria de secado puede comprender: (a) descender bruscamente hasta entre aproximadamente -30°C y aproximadamente -5°C y mantener durante entre aproximadamente 120 minutos hasta
- 15 aproximadamente 1000 minutos y, opcionalmente (b) descender bruscamente hasta entre aproximadamente -5°C y aproximadamente 5°C y mantener durante entre aproximadamente 150 minutos hasta aproximadamente 2000 minutos. La etapa secundaria comprende generalmente descender bruscamente hasta aproximadamente $27^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ y mantener durante entre aproximadamente 330 minutos hasta aproximadamente 1120
- 20 minutos. El experto en la materia sabe que estos intervalos pueden ajustarse dependiendo de las condiciones, por ejemplo, del volumen de partida.

- Entonces se prepara una vacuna que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de *L. intracellularis* atenuada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una forma de
- 25 realización preferible, una vacuna comprende el n° de acceso de la ATCC PTA-4926 en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El inmunógeno y el vehículo combinados pueden estar en una disolución acuosa, en emulsión o en suspensión. Una cantidad inmunológicamente eficaz es determinable mediante los medios conocidos en la materia sin una experimentación ilícita, dadas las enseñanzas contenidas en este documento. En
- 30 general, la cantidad de inmunógeno estará entre 5 y 5000 microgramos, y entre una TCID_{50}

de $10^{2.0}$ y $10^{9.0}$, preferiblemente entre una $TCID_{50}$ de $10^{3.0}$ y $10^{6.0}$, más preferiblemente entre una $TCID_{50}$ de $10^{4.0}$ y $10^{5.0}$, cuando se usan bacterias purificadas.

La presente invención también engloba vacunas de combinación que comprenden la cepa
5 clínica atenuada de *L. intracellularis* denominada con el n° de acceso de la ATCC PTA-4926 y material antigénico procedente de al menos otro patógeno, incluyendo, pero no limitándose a: especies del género *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*), especies del género *Erysipelothrix* (por ejemplo, *Erysipelothrix rhusiopathiae*), especies del género *Haemophilus* (por ejemplo, *Haemophilus parasuis*),
10 especies del género *Mycoplasma* (por ejemplo, *Mycoplasma hyopneumonia*), especies del género *Leptospira*, especies del género *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*), especies del género *Streptococcus* (por ejemplo, *Streptococcus suis*), especies del género *Brachyspira* (por ejemplo, *Brachyspira hyodysenteriae*), especies del género *Bordetella* (por ejemplo, *Bordetella bronchiseptica*), especies del género
15 *Pasteurella* (por ejemplo, *Pasteurella multocida*), circovirus (por ejemplo, circovirus porcino de tipo 2), virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS), virus de la gripe porcina (SIV), coronavirus (por ejemplo, virus transmisible de gastroenteritis (TGE), coronavirus respiratorio porcino), parvovirus o *Escherichia coli*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20

En una forma de realización, la vacuna de combinación comprende la cepa clínica atenuada de *L. intracellularis* denominada con el n° de acceso de la ATCC PTA-4926 y material antigénico de *Salmonella choleraesuis*, de especies del género *Erysipelothrix*, de especies del género *Clostridium*, de especies del género *Brachyspira*, del virus transmisible
25 de gastroenteritis (TGE), y de *Escherichia coli*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El material antigénico de las especies del género *Clostridium* puede incluir, pero no se limita a, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*. El material antigénico de las especies del género *Erysipelothrix* puede incluir, pero no se limita a, *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

30

En otra forma de realización, la vacuna de combinación comprende la cepa clínica atenuada de *L. intracellularis* denominada con el nº de acceso de la ATCC PTA-4926 y material antigénico de *Salmonella choleraesuis* y de especies del género *Erysipelothrix*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, la vacuna de combinación comprende la cepa clínica atenuada de *L. intracellularis* denominada con el nº de acceso de la ATCC PTA-4926 y material antigénico de *Salmonella choleraesuis* y de *Erysipelothrix rhusiopathiae*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra forma de realización, la vacuna de combinación comprende la cepa clínica atenuada de *L. intracellularis* denominada con el nº de acceso de la ATCC PTA-4926 y material antigénico procedente de al menos otro patógeno, incluyendo, pero no limitándose a: especies del género *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium tetani*), virus de la gripe equina (EIV) (por ejemplo, EIV-1, EIV-2), virus del herpes equino (EHV) (por ejemplo, EHV-1, EHV-2, EHV-3, EHV-4, EHV-5, EHV-6, EHV-7,), alfavirus (por ejemplo, virus de la encefalitis oriental, virus de la encefalitis occidental, virus de la encefalitis de Venezuela), o virus del Nilo occidental; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las vacunas según la invención se administran generalmente a animales susceptibles, preferiblemente cerdos, en una o más dosis. La vacuna viva o muerta puede administrarse 1 ó 2 veces en intervalos de 2 semanas. Para las vacunas vivas atenuadas es preferible una dosis. Las vías de administración preferibles de las cepas clínicas vivas atenuadas son intramuscular, oral o intranasal, pero las vías de inyección intramuscular y subcutánea son muy preferibles para la vacuna muerta.

El diagnóstico eficaz de la PPE también se ha visto obstaculizado por el tiempo requerido para cultivar la bacteria causal. Como resultado de la presente invención, ahora es posible el desarrollo de herramientas diagnósticas que promuevan unos ensayos rápidos y precisos para comprobar la presencia de *L. intracellularis* en muestras biológicas tomadas de cerdos y otros animales susceptibles a la PPE.

Las bacterias *L. intracellularis* de origen europeo de la actual invención, o los componentes derivados de dichas bacterias, pueden usarse como antígeno en un ELISA u otro inmunoensayo, tal como una prueba de anticuerpos inmunofluorescentes ("IFA"), para detectar anticuerpos contra *L. intracellularis* en el suero y en otros fluidos corporales de animales sospechosos de estar infectados con la bacteria. El inmunoensayo actualmente preferible es una IFA, según se describe en el ejemplo a continuación. Alternativamente, las bacterias de la actual invención pueden usarse en un ensayo de inmunotransferencia Western.

10 El protocolo preferible de ELISA según la invención es como sigue:

1. Añadir 0,1 ml/pocillo de antígeno diluido en tampón de cobertura. Incubar durante 18 horas a 4°C.
2. Lavar 3 veces con PBS.
3. Añadir 0,25 ml de tampón de bloqueo a cada pocillo de la placa. Incubar de 1 a 2 horas a 37°C.
4. Lavar 3 veces con tampón de lavado.
5. Diluir el suero en tampón de bloqueo y añadir 0,1 ml al primero de los pocillos de la placa. Realizar diluciones sucesivas 1:2 por toda la placa. Incubar durante 1 hora a 37.
6. Lavar de 3 a 5 veces con tampón de lavado.
7. Diluir el conjugado en tampón de bloqueo y añadir 0,1 ml a los pocillos de la placa, e incubar durante 1 hora a 37°C.
8. Lavar de 3 a 5 veces con tampón de lavado.
9. Añadir sustrato.
10. Medir la absorbancia de la luz con un espectrofotómetro.
11. Los pocillos a los que no se ha añadido antígeno se usan como blancos.
12. Además deberían usarse controles positivos y negativos de suero porcino en cada prueba.

30 El protocolo preferible de inmunotransferencia Western es como sigue:

1. Analizar el antígeno en SDS-PAGE al 12% y transferirlo a una membrana de nitrocelulosa.
 2. Colocar la membrana en tampón de bloqueo durante 2 horas.
 3. Eliminar el tampón de bloqueo y aclarar con PBS durante 1 minuto.
 - 5 4. Diluir el suero en tampón de bloqueo y añadirlo a la membrana. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
 5. Lavar 3 veces con tampón de lavado (5 minutos para cada lavado).
 6. Diluir el conjugado en tampón de bloqueo y añadirlo a la membrana. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
 - 10 7. Lavar 3 veces con tampón de lavado.
 8. Añadir sustrato durante 10 minutos o hasta que aparezca una banda intensa.
 9. Aclarar con PBS.
 10. Secar al aire y almacenar en la oscuridad.
- 15 Las bacterias *L. intracellularis* de origen europeo de la actual invención, o los componentes derivados de dichas bacterias, también pueden usarse para preparar antisuero o anticuerpos para uso diagnóstico, profiláctico o terapéutico. Las bacterias *L. intracellularis* de origen europeo de la actual invención, o los componentes derivados de dichas bacterias, pueden administrarse a un animal no humano en una cantidad eficaz para
- 20 desencadenar una respuesta inmune, y el antisuero o el plasma que contienen los anticuerpos contra las bacterias *L. intracellularis*, o los componentes derivados de dichas bacterias, pueden recogerse según los métodos conocidos en la materia y descritos en este documento.
- 25 La presente invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que se proporcionan únicamente con un propósito ilustrativo y no deben ser interpretados como limitantes. De hecho, otras variantes de la invención serán fácilmente apreciables por el experto habitual en la materia.
- 30 Todas las publicaciones y patentes mencionadas en este documento se incorporan como referencia en su totalidad.

EJEMPLO 1**PRODUCCIÓN DE UNA VACUNA DE *L. INTRACELLULARIS***

5

Aislamiento y atenuación de *L. intracellularis* de intestinos de cerdos europeos con Enteropatía Proliferativa Porcina (PPE):

La cepa clínica virulenta de *L. intracellularis* DK 15540 (DK 15540, DK-15540 y 15540
10 se usan de forma intercambiable en este documento) fue aislada por la University of Minnesota a partir de un homogeneizado ileal de un cerdo danés infectado con enteropatía hemorrágica porcina aguda. Esta cepa clínica se ha depositado bajo el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 el 9 de enero de 2003 y se le asignó el número de acceso
15 PTA-4927. El proceso de aislamiento incluyó el raspado de la mucosa del ileon, una homogeneización, una tripsinización durante 30 minutos, y el pase a través de una trituradora de tejidos. El homogeneizado ileal se pasó entonces a través de una serie de filtros consistentes en 5,0, 1,0 y 0,65 μm . El homogeneizado se diluyó en tampón de sacarosa fosfato glutamato con suero bovino fetal al 10% (FBS). Se realizaron alícuotas (6
20 x 1 ml) del homogeneizado y se almacenaron a menos de -70°C . El homogeneizado se usó como inóculo para infectar matraces en T de 75 cm^2 de células McCoy. Los cultivos se monitorizaron diariamente para controlar la infección de las células McCoy raspando las monocapas de células McCoy, lisando las células mediante un tratamiento con cloruro potásico y colocando el sedimento de células concentradas en portaobjetos para
25 microscopio teñidos mediante IFA, usando anticuerpos monoclonales específicos para *L. intracellularis*. Después de once pases en cultivos celulares dependientes de anclaje, el inóculo del pase once se transfirió a un matraz de agitación de 250 ml que contenía células McCoy y se hizo crecer en suspensión hasta su recolección. La cepa clínica danesa de *L. intracellularis* (nº de acceso de la ATCC PTA-4927) se atenuó mediante el pase continuo
30 *in vitro* en células McCoy durante 80 semanas, y se comprobó su identidad mediante anticuerpos monoclonales. La cepa clínica atenuada se denominó B3903 (B3903, B 3903 y B-3903 se usan de forma intercambiable en este documento). La cepa clínica B3903 se

depositó bajo el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, el 9 de enero de 2003 y se le asignó el número de acceso de la ATCC PTA-4926.

5 Cultivos:

Identificación

Se usaron los requerimientos de crecimiento característicos, las reacciones de PCR y las reacciones con anticuerpos monoclonales para identificar los materiales de las Siembras Maestras y de Trabajo de *L. intracellularis*.

Pureza

La pureza de la Siembra Maestra y de la Siembra de Trabajo de *L. intracellularis* se determinó examinando los cultivos mediante tinciones con anticuerpos monoclonales, pruebas convencionales de agentes extraños para bacterias y virus y mediante pruebas de esterilidad de micoplasma.

Virulencia

Las Siembras Maestras de *L. intracellularis* no eran virulentas, según se demostró por la ausencia de la capacidad de la Siembra Maestra y del inóculo del retropase de producir los signos clínicos y las lesiones macroscópicas que se observan en cerdos susceptibles tras la exposición a *L. intracellularis* virulenta, según se ilustra adicionalmente en el Ejemplo 2, a continuación.

25 Intervalo de subcultivos

El material final recolectado de la producción de *L. intracellularis* no superó los once pases a partir de la Siembra Maestra.

Composición del medio

30 Se hicieron crecer Reservas Maestras de Células McCoy europeas (MCS) y se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con Ham F12 reforzado (DMEM/F12) y un 1-

10% (v/v) de suero bovino neonatal (NBS) o de suero bovino fetal (FBS) (medio de crecimiento y mantenimiento celular).

Las Siembras Maestras y de Trabajo se almacenaron en DMEM/F12 con un 1-10% (v/v) de NBS o de FBS y un 5-15% (v/v) de glicerol (medio de almacenamiento de las siembras maestras y de trabajo).

El producto final recolectado se almacenó en estabilizante de gelatina de sacarosa (SGS) (medio de almacenamiento del producto final).

10

Propagación

Los cultivos de las Siembras Maestras y de Trabajo de *L. intracellularis* se propagaron en MCS McCoy europeas usando medio de crecimiento y de mantenimiento celular según se describió anteriormente, y se almacenaron a menos de o a aproximadamente -35°C.

15

Origen de los tejidos

Las siembras de *L. intracellularis* y los organismos de producción se hicieron crecer en Reservas Maestras de Células McCoy (n° de acceso de la ATCC CRL 1696, número de lote F-10422). La reserva de mastocitos se identificó como 3894MMCSS en el pase X. La reserva maestra de células se pasó seis veces adicionales y se identificó como MCS McCoy europeas X+0. El pase de McCoy MCS X+0 europeas se almacenó a -70°C ± 5°C o más frío. La producción de la vacuna se realizó en subcultivos de la línea celular MCS McCoy europea a través del pase 40°.

25

Recipientes de cultivo

Las McCoy MCS europeas se propagaron en matraces de cultivo tisular con un área superficial de 25-150 cm², en cubas de células Costar, en frascos rotatorios con entre 850 cm² y 2, 2250 cm², en matraces de agitación de hasta 40 l de capacidad, y en biorreactores con desde 3 l hasta 500 l de capacidad.

30

Los cultivos sembrados de *L. intracellularis* se hicieron crecer en matraces de agitación de 250-40.000 ml, en frascos rotatorios de 850 cm² a 2.250 cm², en matraces de cultivo tisular con un área superficial de 25-150 cm² o en biorreactores con desde 3 l hasta 500 l de capacidad.

5

Los cultivos de producción de *L. intracellularis* se hicieron crecer en matraces de agitación de 6 l hasta 40 l o en biorreactores con desde 3 l hasta 500 l de capacidad.

Métodos para preparar suspensiones para la siembra o la inoculación

10 Cultivos de siembra

Se descongelaron Siembras Maestras o expandidas de Trabajo congeladas o frescas de *L. intracellularis* a temperatura ambiente (25°C ± 3°C) o a 37°C ± 2°C. Los biorreactores, los matraces de agitación o los frascos previamente sembrados con células McCoy a una densidad celular de 50.000 a 500.000 células/ml se infectaron con *L. intracellularis* a una
15 concentración del 1 al 10% (v/v) o una MOI de 0,08 a 1,0. El cultivo infectado se incubó con una concentración de oxígeno reducida cubriéndolo con una mezcla de gases formada por un 86% de N₂, un 4% de H₂ y un 10% de CO₂. El cultivo se incubó durante entre 3 y 10 días a 37°C ± 2°C, a un pH de 6,7 a 7,3, y con agitación continua (de 10 a 100 rpm) para mantener una mezcla adecuada para que las células permanezcan en suspensión.

20

Cultivos de producción

Se descongelaron Siembras Maestras o expandidas de Trabajo congeladas o frescas de *L. intracellularis* a temperatura ambiente (25°C ± 3°C) o a 37°C ± 2°C. Los biorreactores o los matraces de agitación de 3 l a 500 l de capacidad) previamente sembrados (de 0 a 7
25 días) con células McCoy a una densidad celular de 50.000 a 500.000 células/ml se infectaron con *L. intracellularis* a una concentración del 1 al 10% (v/v) o una MOI de 0,08 a 1,0. El cultivo infectado se incubó con una concentración de oxígeno reducida cubriéndolo o rociándolo con una mezcla de gases formada por un 96% de N₂, un 4% de H₂. El cultivo se incubó durante entre 3 y 8 días a 37°C ± 2°C, a un pH de 6,7 a 7,3, y con
30 agitación continua (de 10 a 100 rpm) para mantener una mezcla adecuada para que las células permanezcan en suspensión.

Técnicas de inoculación de los cultivos de siembra y de producción

Cultivos de siembra

- Se inocula hasta el 10% (v/v) de Siembra Maestra o de Trabajo (MOI = de 0,08 a 1,0) en
 5 biorreactores, matraces de agitación o frascos sembrados con células McCoy de 0-7 días en medio de crecimiento.

Cultivos de producción

- Se inoculó hasta el 10% (v/v) de la Siembra de Producción (MOI = de 0,08 a 1,0) en un
 10 volumen apropiado del medio de crecimiento sembrado con células McCoy de 0 a 7 días con la densidad de células McCoy apropiada en depósitos de 3 l a 500 l de capacidad.

Incubación de los microorganismos

- Los cultivos se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante entre 3 y 10 días en una atmósfera de
 15 oxígeno reducida con agitación para mantener la suspensión. Puede añadirse medio y/o células McCoy adicionales para continuar el proceso de crecimiento.

Los cultivos se observaron macroscópicamente durante el periodo de incubación para
 buscar pruebas de un crecimiento anormal o signos de contaminación.

20

Recolección:

Manipulación y preparación de los cultivos

- Los cultivos se examinaron buscando signos de un crecimiento bacteriano adecuado
 25 mediante una tinción con anticuerpos por fluorescencia indirecta (IFA). Los cultivos que estaban preparados para ser recolectados ejemplificaron del 60 al 100% de infectividad celular. El porcentaje de infectividad se determinó mediante la observación de al menos tres campos, conteniendo cada campo suficientes células McCoy para completar al menos el 80% del área. Para que se considere como infectada, aproximadamente el 50% de la
 30 célula está llena de bacterias.

La potencia del cultivo recolectado se comprueba mediante valoración de la muestra en células McCoy que están fijadas y teñidas usando anticuerpos monoclonales específicos (anticuerpo monoclonal anti-*L. intracellularis* VPM 53 Lote 31599 o equivalente; conjugado de IgG anti-ratón-fluoresceína (FITC) (ICN nº 55499) después de 6 días de incubación a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Los cultivos se examinaron visualmente para comprobar cualquier signo obvio de contaminación. La recolección se produjo entre los 3 y los 10 días tras la inoculación.

10 Técnicas y especificaciones de recolección

Las células y los contenidos fluidos del biorreactor, de los matraces de agitación y del frasco del cultivo de producción se recolectaron parcial o completamente en un depósito colector estéril. Cada biorreactor, matraz de agitación y frasco del cultivo de producción se recolectó individualmente, o se agrupó el contenido de varios depósitos con la adición de SGS y se almacenaron a entre 1°C y 7°C o más frío. Se tomaron muestras del cultivo de producción recolectados para comprobar la potencia mediante la TCID_{50} y su identificación mediante una tinción IFA.

Los cultivos de producción mostraron una TCID_{50} de al menos 4,9/ml mediante una tinción IFA y no presentaban ninguna prueba de contaminación tras su observación microscópica.

Preparación del producto de vacuna:

Métodos de concentración

El producto de vacuna puede concentrarse mediante varios métodos, por ejemplo, permitiendo sedimentar el cultivo con la subsiguiente decantación del sobrenadante, mediante filtración de membrana ($0,22\ \mu\text{m}$ o menor), perfusión o mediante centrifugación.

Estabilizante de gelatina de sacarosa (SGS)

Se prepara una disolución de gelatina hidrolizada mezclando la gelatina con agua desionizada o agua para inyección a aproximadamente el 25% del volumen final total del tamaño del lote de SGS e hidrolizando en un autoclave durante 120 minutos a 121°C.

- 5
- La disolución de gelatina hidrolizada (40,0 g/l) se mezcló entonces con agua desionizada o agua para inyección a aproximadamente el 75% del volumen final total del tamaño del lote de SGS. Se añadieron hidróxido potásico (AR) (0,548 g/l), ácido L-glutámico (1,440 g/l), fosfato dipotásico (AR) (2,508 g/l), dihidrogenofosfato potásico (AR) (1,030 g/l), y sacarosa (AR) (150,00 g/l) y la disolución se mezcló exhaustivamente. Entonces se ajustó
- 10
- el pH del estabilizante a entre 6,8 y 7,0 con disoluciones de ácido clorhídrico o de hidróxido sódico. Se añadió agua desionizada o agua para inyección hasta el 100% del volumen final deseado del SGS. El estabilizante completo se mezcló exhaustivamente, y toda la disolución se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de 0,1 micrómetros.
- 15
- En la Tabla 1 se muestra un ejemplo de Montaje de Unidades para Hacer una Serie:

Tabla 1

<i>L. intracellularis</i>	200.000-300.000 ml
Estabilizante de gelatina de sacarosa (SGS)	100.000 ml (25% v/v)
DMEM/F12 (puede añadirse para estandarizar el producto)	0-150.000 ml
VOLUMEN TOTAL	400.000 ml

El volumen de una serie media era de entre 50 l y 500 l.

20

Liofilización

El producto de vacuna se liofilizó según el procedimiento esquematizado en la Tabla 2 para un ciclo de 10 dosis (6,0 ml de llenado) o en la Tabla 3 para un ciclo de 50/100 dosis (10,0 ml de llenado).

25

Tabla 2

ETAPAS	°C	Tasa (minutos)	Mantener (minutos)	Presión (mT)
PRE-REFRIGERACIÓN *	5°	Na	Na	Atm
CONGELACIÓN	-47° ± 3°	Tan rápido como sea posible	150	Atm
1° SECADO, 1°	-15° ± 2°	120	120	100-150
1° SECADO, 2°	0° ± 2°	120	180	100-150
2° SECADO, 1°	32° ± 2°	240	180	60-80
2° SECADO, 2°	26° ± 2°	240	Tan rápido como sea posible	60-80

Tiempo Total: 1352 minutos (22,5 horas)

* Los estantes están pre-refrigerados a 5° ± 2°C durante la carga del liofilizante.

5 Tabla 3

ETAPAS	°C	Tasa (minutos)	Mantener (minutos)	Presión (mT)
PRE-REFRIGERACIÓN *	5°	N/A	N/A	Atm
CONGELACIÓN	-48° ± 3°	60	90	Atm
1° SECADO	-15° ± 2°	60	1500	100-150
2° SECADO	26° ± 2°	60	600	60-80

Tiempo Total: 2370 minutos (39,5 horas)

* Los estantes están pre-refrigerados a 5° ± 2°C durante la carga del liofilizante.

EJEMPLO 2**SEGURIDAD DE LA VACUNA DE *L. INTRACELLULARIS*****Propósito:**

- 5 Los objetivos de este estudio fueron dobles. El primer objetivo de este estudio era observar y comparar la incidencia de la enfermedad causada por tres cepas clínicas diferentes de bajo pase (dos de origen estadounidense y una de origen europeo) de *L. intracellularis* en cerdos a las 6 ½ semanas de edad. El segundo objetivo era observar la seguridad de dos cepas clínicas de alto pase (ambas de origen europeo) de *L.*
- 10 *intracellularis* en cerdos a las 6 ½ semanas de edad.

Materiales y métodos:**Sustancias de prueba**

1. Cepa clínica estadounidense de bajo pase N343 de *L. intracellularis*
- 15 2. Cepa clínica estadounidense de bajo pase N101494 de *L. intracellularis*.
3. Cepa clínica europea de bajo pase DK 15540 p20 de *L. intracellularis*
4. Cepa clínica europea de alto pase DK 15540 p60 de *L. intracellularis*
5. Cepa clínica europea de alto pase DK 15540 p80 (denominación de la Siembra Maestra B3903) de *L. intracellularis*

20 Formulación de las sustancias de prueba

- Las cepas clínicas de bajo pase se hicieron crecer de forma continua durante 10-20 semanas tras su aislamiento en una suspensión de células McCoy. Las cepas clínicas de alto pase se hicieron crecer de forma continua durante 60-80 semanas tras su aislamiento en una suspensión de células McCoy. Todos los cultivos se recolectaron mediante
- 25 centrifugación a 10.000 RPM durante 15 minutos. Los sedimentos del cultivo celular McCoy que contenían la Lawsonia se resuspendieron en una disolución de Sacarosa-Fosfato-Glutamina (SPG) con un 10% de FBS.

Almacenamiento de las sustancias de prueba

- 30 Los cultivos recolectados se almacenaron a -70°C hasta el día de la exposición. Los cultivos de exposición de la misma cepa clínica pero de diferentes fechas de recolección se

descongelaron y se combinaron en frascos de plástico de vacunas, se etiquetaron y se almacenaron a 4°C o en hielo hasta el momento de la exposición.

Ensayo de las sustancias de prueba

Se realizó una TCID₅₀ en todas las cepas clínicas expuestas agrupadas en el momento de la exposición (día 0). Los títulos medios (n=3) (TCID₅₀/ml) fueron como sigue en la Tabla 4:

Tabla 4

Sustancia de prueba	Título medio (TCID ₅₀ /ml)
<i>L. intracellularis</i> N343	6,4
<i>L. intracellularis</i> N101494	6,1
<i>L. intracellularis</i> DK 15540 p20	6,2
<i>L. intracellularis</i> DK 15540 p60	6,87
<i>L. intracellularis</i> DK 15540 p80	7,4

Diseño del estudio

- El estudio consistió en cinco grupos experimentales y un grupo de control. En el día 0 del estudio, el Grupo 1 (10 cerdos, 6 ½ semanas de edad) recibió una dosis intragástrica (IG) de 10 ml o equivalente de la cepa clínica estadounidense de bajo pase N343 de *L. intracellularis*. El grupo 2 (10 cerdos, 6 ½ semanas de edad) recibió una dosis IG de 10 ml o equivalente de la cepa clínica estadounidense de bajo pase N101494 de *L. intracellularis*. El grupo 3 (10 cerdos, 6 ½ semanas de edad) recibió una dosis IG de 10 ml o equivalente de la cepa clínica europea de bajo pase DK15540 p20 de *L. intracellularis*. El grupo 4 (10 cerdos, 6 ½ semanas de edad) recibió una dosis IG de 10 ml o equivalente de la cepa clínica europea de alto pase DK15540 60 semanas de *L. intracellularis*. El grupo 5 (20 cerdos, 6 semanas de edad) recibió una dosis de 10 ml o equivalente de la cepa clínica europea de alto pase DK 15540 p80 de *L. intracellularis*. El grupo 6 (10 cerdos, 6 ½ semanas de edad) denominado "Controles Estrictos" no recibió tratamiento.

Se realizaron observaciones diarias de la salud desde el inicio del estudio hasta el día de la exposición de los animales de prueba apropiados. La salud clínica (comportamiento, apetito, estado corporal, capa pilosa y consistencia de las deposiciones se puntuaron

diariamente en una escala de 1 a 4 desde el día de la exposición (día 0) hasta la finalización del estudio (día 21). Las ganancias de peso medias diarias (ADWG) se calcularon desde el día de la exposición (día 0) hasta la finalización del estudio (día 21). Se evaluó la presencia en heces de *L. intracellularis* en los días 0, 7, 14 y 21. El único animal que murió (del Grupo 1) a lo largo del estudio se examinó para comprobar las lesiones macroscópicas y microscópicas. Se determinó que la muerte era debida a lesiones asociadas con la PPE confirmadas mediante histología y un análisis por PCR; el animal no se reemplazó. El análisis cualitativo del contenido de *Lawsonia* en heces se evaluó mediante PCR junto con una evaluación histológica de *L. intracellularis* en el ileon y el colon. Se recogió suero en los días 0, 7, 14 y 21 del estudio.

Resultados:
Resumen de los resultados del estudio

Tabla 5

Grupo	Tratamiento	Nº de cerdos	Título (TCID ₅₀ /ml)	Serología	Presencia en heces	PCR	FA	Histología	Lesiones macroscópicas	ADWG	Puntuaciones clínicas
1	N343	9	7,4	19%	11%	0%	11%	44%	1	0,61	5,23
2	N101494	10	7,1	10%	10%	10%	30%	30%	1,2	0,8	5,15
3	DK15540p20	10	7,2	18%	13%	30%	10%	20%	1,2	0,86	5,01
4	DK15540p60	10	7,87	5%	0%	0%	0%	10%	1	0,9	5
5	DK15540p80	20	8,4	0%	0%	0%	0%	0%	1	1,05	5
6	Controles estrictos	10	0	0%	0%	0%	0%	0%	1,05	0,91	5

Observaciones generales

Se realizaron observaciones diarias de la salud hasta la exposición. Se evaluó el estado clínico de los animales diariamente tras la exposición durante la duración del estudio. Las observaciones incluyeron: comportamiento, apetito, estado corporal, capa pilosa y consistencia de las deposiciones. El estado clínico de estos animales se evaluó en base a un sistema de puntuación numérico, que refleja la gravedad de la enfermedad. Las

puntuaciones variaban desde 1 hasta 4 para cada parámetro. Se dio una puntuación de 1 a un animal con un aspecto normal y saludable, una puntuación de 3 a un animal que mostraba signos clínicos graves y una puntuación de 4 a un animal que había fallecido. La puntuación diaria media de los controles estrictos, DK15540 p60 y DK15540 p80 era de 5,0. Las puntuaciones diarias medias del material de bajo pase fueron N343 (5,23), N101494 (5,15) y DK15540 p20 (5,01). El análisis estadístico de estos resultados no indicó diferencias entre los grupos de tratamiento y de control usando la prueba de la suma por rangos de Kruskal-Wallis.

10 Ganancias de peso medias diarias (ADWG)

Las ganancias de peso medias diarias se calcularon a partir del momento de la exposición (día 0) hasta la finalización del estudio (día 21). La ganancia de peso media por día del grupo de control estricto fue de 0,408 kg. La ganancia de peso media de los grupos de tratamiento de bajo pase fue de sólo 0,272 (N343), 0,363 (N101494) y 0,39 (DK15540 p20) kg/día. Los grupos de tratamiento de alto pase revelaron la misma ganancia de peso por día, o aumentada, en comparación con el grupo de control estricto que no fue expuesto, con 0,408 kg/día (DK15540 p60) y 0,476 kg/día (DK15540 p80) respectivamente. La diferencia media en las ganancias de peso medias diarias fue significativamente menor en el grupo de tratamiento N343 en comparación con los grupos de tratamiento de alto pase (DK15540 p60 y p80) y los grupos de control estricto en el día 21 del estudio. (Prueba de la χ^2 de Pearson $p < 0,05$).

Seroconversión

Se midió la seroconversión tras la exposición a Lawsonia en cerdos comprobando la presencia de anticuerpos anti-Lawsonia usando un ensayo IFAT. En el día 0, sólo en el grupo de tratamiento N343 se observó una seroconversión detectable en 2/10 cerdos. En el día 7 se observó en 2/9 cerdos (N343) y en 1/10 cerdos (DK15540 p20) un IFA positivo para los anticuerpos de Lawsonia. En el día 14, 2/9 cerdos eran positivos en el IFA en el grupo de tratamiento N343, 1/10 en DK15540 p20 y p60 respectivamente. El día 21 reveló 1/10 cerdos (N343), 4/10 cerdos (N101494) y 6/10 cerdos (DK15540 p20) que eran positivos en el IFA, mientras que los grupos de tratamiento de alto pase (DK15540 p60 y

p80) no mostraban una seroconversión detectable. La seroconversión tras la exposición a *Lawsonia* aumentó en los grupos de tratamiento que recibían *L. intracellularis* de bajo pase tanto de las cepas clínicas estadounidenses como europeas en el día 21 del estudio.

5 Presencia en heces

Las pruebas de PCR en las heces demostraron la presencia de *L. intracellularis* comenzando el día 14, en el que 4/ 9 en el N343, 4/10 en el N101494 y 5/10 en el DK15540 p20 de animales de bajo pase dieron positivo. Tanto los grupos de tratamiento de alto pase como de control estricto eran negativos en la PCR el día 14. En el día 21, el grupo de tratamiento DK15540 p20 tuvo 1 animal positivo en la PCR, mientras que el resto de los grupos de tratamiento de control dieron negativo en la PCR. No se observó ninguna prueba de la presencia en los grupos de cepas clínicas de alto pase (DK15540 p60 y p80) usando una PCR a lo largo del estudio. Los animales positivos en la PCR, que indicaba una presencia activa de *Lawsonia* en sus heces, eran más significativos en los grupos de cepas clínicas de bajo pase (N343, N101494 y DK15540 p20) en el día 14 del estudio que los grupos de cepas clínicas de alto pase los controles estrictos (Prueba de la χ^2 de Pearson $p<0,05$).

PCR en el día 21: ileon y colon

La prueba de PCR de los raspados de mucosa del ileon y el colon se realizó tras la necropsia (día 21). Las muestras que fueron positivas en la PCR para la colonización por *L. intracellularis* eran (2/10 colon) en los grupos de cepas clínicas de bajo pase N101494 y (2/10 ileon y 4/10 colon) en DK 15540 p20. Todos los demás grupos de tratamiento y de control fueron negativos en la PCR de los tejidos el día 21 del estudio. Los resultados indicaron que el ileon y el colon de los cerdos de DK15540 p20 estaban significativamente más colonizados por *L. intracellularis* en comparación con todos los grupos de tratamiento de control (* Prueba de la χ^2 de Pearson $p<0,05$).

Histología

Se recogieron secciones del ileon terminal y del colon en la necropsia (día 21) y se colocaron en formalina tamponada para su análisis histológico. Se observó la presencia de

bacterias intracelulares y una hiperplasia de las criptas en los tejidos teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) y reactivos de plata de Warthin-Starry de 4/9 cerdos (N343), 3/10 cerdos (N101494), 2/10 cerdos (DK15540 p60) y 1/20 cerdos (DK15540 p80). El desarrollo de lesiones fue confirmado mediante una tinción con anticuerpos fluorescentes usando anticuerpos monoclonales contra *Lawsonia intracellularis* en 1/9 cerdos (N343), 3/10 cerdos (N101494) y 1/10 cerdos (DK15540 p60). La FA no detectó lesiones causadas por *Lawsonia* en el colon de ninguno de los grupos de tratamiento ni de control. Los resultados de la FA indicaron el desarrollo de una lesión significativa en el íleon de cerdos del grupo de tratamiento N101494 en comparación con todos los grupos de tratamiento y de control. La tinción H&E / plata mostró el desarrollo de una lesión significativa asociada a la PPE en el grupo de tratamiento N343 en comparación con todos los grupos de tratamiento y de control. (Prueba de la χ^2 de Pearson $p < 0,05$).

15 Puntuaciones macroscópicas

Se puntuaron el íleon y el colon en el momento de la necropsia (día 21) para evaluar las lesiones asociadas con la PPE. A los tejidos se les dio una puntuación de 1 para un aspecto normal (sin desarrollo de lesiones), una puntuación de 2 para las lesiones que mostraban un engrosamiento leve, de 3 para un engrosamiento moderado y una puntuación de 4 para un engrosamiento grave. Los controles estrictos tenían una puntuación clínica media de 1,05, N343 (1,0), N101494 (1,2), DK15540 p20 (1,2) y DK15540 p60 y p80 (1,0). La puntuación de las lesiones macroscópicas medias no indicó una diferencia estadística entre los grupos de control y de tratamiento usando la prueba del análisis de la variancia para comparaciones múltiples.

25

Conclusiones:

Basándonos en los datos recogidos, este estudio demuestra que los cerdos expuestos a una dosis de pase baja de N343, N101494 y DK15540 con una $TCID_{50}$ mayor de 1×10^7 bacterias/dosis aumenta la incidencia de la PPE en estos animales. Las cepas clínicas de alto pase (DK15540 p60 y p80) dadas a los cerdos de la misma edad con una $TCID_{50}$ mayor de 1×10^7 demostraron ser seguras y mostraron una reducción de la colonización y

30

del desarrollo de lesiones asociadas con la PPE. Esta conclusión se basó en la PCR de la mucosa del ileon, la histopatología y las tinciones FA de las secciones tisulares.

Se hizo evidente una reducción de la presencia de *L. intracellularis* en las heces
5 determinada mediante PCR en las cepas clínicas de alto pase en comparación con las cepas
clínicas de bajo pase. Las ganancias de peso medias diarias calculadas para todos los
grupos de tratamiento de control apoyan esta conclusión, mostrando una ganancia de peso
diaria uniforme positiva en los grupos que recibieron la cepas clínicas de alto pase y en los
10 controles estrictos en comparación con los grupos que recibieron cepas clínicas de bajo
pase, especialmente los animales del grupo de tratamiento N343. Esta observación indica
una reducción en las ganancias de peso en los animales que recibieron material de bajo
pase, que apoya un rendimiento de crecimiento adecuado y similar de los animales que
recibieron material de alto pase con los animales que no recibieron ningún material de
exposición. En comparación con los controles estrictos, las cepas clínicas de alto pase no
15 mostraron un impacto negativo en la ganancia de peso ni en la salud global basándonos en
las puntuaciones clínicas.

EJEMPLO 3

20 EFICACIA Y TÍTULO PROTECTOR MÍNIMO

Propósito:

Los objetivos de este estudio eran determinar el título protector mínimo de una vacuna que
comprende la cepa clínica B3903 (liofilizada) (DK 15540, pase 80) ("vacuna B3903
25 (lío filizada)" y "vacuna B3903" se usan de forma intercambiable en este documento)
administrada mediante enjuagues orales a cerdos de 3 semanas de edad y para demostrar su
eficacia frente a una exposición virulenta de un cultivo puro heterólogo de bajo pase de *L.*
intracellularis, el agente causal de la Enteropatía Proliferativa Porcina (PPE) en cerdos.

30 Materiales y métodos

Sustancia de prueba: cultivo vivo atenuado de *L. intracellularis*, cepa clínica B3903

Formulación de la vacuna de B3903 (lío­filizada)

Las cepas clínicas DK 15540 se hicieron crecer de forma continua durante 80 semanas tras su aislamiento en una suspensión de células McCoy. Todos los cultivos se recolectaron mediante centrifugación a 10.000 RPM durante 15 minutos. Los sedimentos del cultivo de células McCoy que contenían la *Lawsonia* se resuspendieron en una disolución de Sacarosa-Fosfato-Glutamina (SPG) con un 10% de FBS. La desecación se realizó según se describe en el Ejemplo 1, anteriormente. El producto liofilizado es reconstituido en agua, c.s.p. 2,0 ml, para inyección.

Almacenamiento de la vacuna de B3903 (lío­filizada)

La vacuna se almacenó a 2°C-8°C hasta que estuviera lista para su uso. Después de la resuspensión, la vacuna se almacenó en hielo hasta su administración.

Dosis de la vacuna de B3903 (lío­filizada)

1. Dosis alta (grupo de tratamiento 1): 1 x 2 ml (6,0 logs/dosis) mediante un enjuague oral directo en el día 0 del estudio.
2. Dosis media (grupo de tratamiento 2): 1 x 2 ml (4,9 logs/ dosis) mediante un enjuague oral directo en el día 0 del estudio.
3. Dosis baja (grupo de tratamiento 3): 1 x 2 ml (3,8 logs/ dosis) mediante un enjuague oral directo en el día 0 del estudio.

Sustancia de prueba: placebo

Se administró un placebo consistente en células del cultivo tisular McCoy no infectadas suspendidas en medio de crecimiento DMEM/F12 reforzado con NBS al 5% a los grupos de tratamiento 4 (control de exposición) y 5 (control negativo) en el día 0 del estudio. Esta sustancia se administró a los lechones del grupo de tratamiento 4 mediante un enjuague oral directo, y se administraron 1 x 2 ml de placebo por animal de prueba.

Sustancia de prueba: exposición virulenta de *L. intracellularis* N101494

Se obtuvo *L. intracellularis* N101494 del intestino de un cerdo de 12 semanas de edad de una granja de Indiana (patente de Estados Unidos 5.714.375).

Formulación de la exposición virulenta de *L. intracellularis* N101494

- 5 El material de exposición de *L. intracellularis* se hizo crecer de forma continua en una suspensión de células McCoy no más de 30 pases tras el aislamiento inicial a partir del tejido intestinal infectado. Los cultivos activos (2 x 3 l) identificados como SF 1422 y SF 1423 , además de (1 l) SF 1421, se hicieron crecer en una suspensión de células McCoy durante 7 días hasta una infección de las células McCoy del 15-30%. El día de la
- 10 exposición (día 21), los cultivos activos se recolectaron mediante centrifugación a 10.000 RPM durante 15 minutos, y los sedimentos celulares se resuspendieron en 350 ml de volumen total con estabilizante SPG. El cultivo activo recolectado se agrupó con 300 ml de reservas de exposición N101494 concentradas de 10X a 20X congeladas de bajo pase a varios pases (pase 24 a 27 tras el aislamiento).

15

Almacenamiento de la exposición virulenta de *L. intracellularis* N101494

Las formulaciones finales preparadas para la exposición se almacenaron a entre 2°C y 8°C o en hielo hasta la inoculación.

20 Títulos pre/post- vacunación y exposición

Los resultados del ensayo de la TCID₅₀ verificaron la cantidad de *L. intracellularis* viva administrada a cada animal de prueba por dosis durante la vacunación y la exposición. Los títulos medios (n=5) de las pre y post titulaciones para la vacuna B3903 y el material de exposición (*L. intracellularis* N101494) eran como sigue en la Tabla 6:

Tabla 6

Grupo	Tratamiento (logs/dosis)	logs/dosis medios (2 ml) pre-vacunación (TCID ₅₀ /ml)	logs/dosis medios (2 ml) post-vacunación (TCID ₅₀ /ml)	logs/dosis medios totales
1	Vacuna B3903 dosis alta	6,07	5,89	6,0
2	Vacuna B3903 dosis media	4,94	4,84	4,9
3	Vacuna B3903 dosis baja	3,9	3,5	3,8
4	Controles expuestos	7,85	7,57	7,71

Diseño del estudio

5 Sesenta y cinco lechones destetados sanos negativos para *L. intracellularis* de 3 semanas de edad se dividieron aleatoriamente en 5 grupos de tratamiento y se alojaron por separado a lo largo de todo el estudio. En el día 0, el grupo de tratamiento 1 (15 cerdos) recibió una dosis de 2 ml (6,0 logs/dosis) de vacuna de B3903 mediante un enjuague oral directo. El grupo de tratamiento 2 (15 cerdos) recibió una dosis de 1 x 2 ml de vacuna de B3903 con un título de 4,9 logs/dosis mediante un enjuague oral directo. El grupo de tratamiento 3
10 (15 cerdos) recibió una dosis de 1 x 2 ml de vacuna de B3903 con un título de 3,8 logs/dosis mediante un enjuague oral directo.

Los grupos de tratamiento 4 y 5 (10 cerdos/grupo) recibieron una dosis de 1 x 2 ml de placebo mediante un enjuague oral directo.
15

En el día 21 del estudio (3 semanas después de la vacunación), los cerdos de prueba de los grupos de tratamiento 1 - 4 recibieron una dosis de 1 x 10 ml de un cultivo puro virulento de bajo pase de la cepa clínica heteróloga N101494 de *L. intracellularis* mediante cebado gástrico.
20

En el día 42 del estudio (3 semanas después de la exposición), todos los grupos de tratamiento (1 - 5) fueron sacrificados, y se les realizó una necropsia para un análisis macroscópico y microscópico de las lesiones de la PPE.

- 5 Se realizaron observaciones diarias de la salud desde el día del inicio del estudio hasta el día de la exposición de cada animal de prueba. Se puntuó la salud clínica (diarrea, comportamiento y estado corporal) diariamente desde el día de la exposición (día 21) hasta la finalización del estudio (día 42). Los pesos se tomaron el día de la vacunación (día 0), el día de la exposición (día 21) y el día de finalización del estudio (día 42) para calcular las ganancias de peso medias diarias de cada grupo de tratamiento. La presencia en heces de *L. intracellularis* se evaluó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) comprobando los exudados fecales (f-PCR) en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 del estudio. Todos los animales sacrificados al finalizar el estudio (día 42) fueron examinados para comprobar las lesiones macroscópicas y microscópicas. El análisis cualitativo del contenido bacteriano en los tejidos se evaluó mediante PCR (t-PCR) junto con una evaluación histológica de *L. intracellularis* en el ileon, el colon, la amígdala y el nódulo linfático mesentérico el día 42 del estudio. El suero se recogió los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 del estudio. El suero se probó usando la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT) para detectar anticuerpos anti-Lawsonia en los animales de prueba. Las comparaciones en el grupo de tratamiento se realizaron mediante el análisis de los datos de las ganancias de peso medias diarias tras la vacunación y tras la exposición, las puntuaciones clínicas, las tasas de seroconversión (IFAT), la colonización (t-PCR), la presencia en heces (f-PCR), y el desarrollo de lesiones macroscópicas y microscópicas mediante inmunohistoquímica (IHC).

Resultados:
Resumen de los resultados primarios

Tabla 7

Grupo de tratamiento	Cerdos por grupo	ID del grupo de tratamiento (loga/dosis)	Puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas (ileon)	Puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas (colon)	Puntuaciones medias de las lesiones microscópicas (ileon)	Puntuaciones medias de las lesiones microscópicas (colon)
1	15	vacuna B3903 dosis alta (6,0)	1,5 ab	1,2 a	0,2 ab	0,1 a
2	15	vacuna B3903 dosis media (4,9)	1,2 ab	1,0 a	0,4 ab	0,0 a
3	15	vacuna B3903 dosis baja (3,8)	2,5 b	1,5 b	1,0 b	0,3 a
4	10	Controles expuestos	3,6 c	2,2 b	2,4 c	1,5 b
5	10	Controles estrictos	1,0 a	1,0 a	0,0 a	0,0 a

5 * Las mismas letras indican una diferencia no significativa (p<0,05)

Los resultados finales de las pruebas para cada grupo de tratamiento revelaron el desarrollo de lesiones macroscópicas y microscópicas significativas en el ileon y el colon en cerdos de control expuestos no vacunados (grupo 4) en comparación con los cerdos vacunados independientemente de la dosis (alta, media y baja) en los grupos 1, 2 y 3 (p<0,05). Las puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas del colon con una dosis baja de vacuna no eran significativamente diferentes a los controles expuestos. El grupo con una dosis baja de vacuna (grupo 3) es el único grupo de tratamiento que recibió vacuna y tuvo un desarrollo de lesiones significativo (macroscópicas y microscópicas) en comparación con el grupo de control estricto que no recibió una vacunación, placebo ni exposición a lo largo del estudio.

10

15

Puntuaciones clínicas

Se registraron diariamente las puntuaciones clínicas de cada animal desde el día de la exposición (día 21) hasta la necropsia (día 42). Las puntuaciones clínicas se calcularon para obtener una puntuación clínica diaria media que reflejara la gravedad y la duración de la afección entre los grupos de tratamiento debido a la recepción de una exposición virulenta a *L. intracellularis*. Las puntuaciones clínicas medias de cada grupo de tratamiento se resumen en la Tabla 8.

10 **Tabla 8**

Grupo de tratamiento	Identificación del grupo	Puntuación clínica media
1	vacuna B3903–dosis alta	3,1 a
2	vacuna B3903–dosis media	3,0 a
3	vacuna B3903–dosis baja	3,0 a
4	Control expuesto	3,0 a
5	Control estricto	3,0 a

* Las mismas letras denotan unas diferencias no significativas entre las puntuaciones clínicas medias desde el día de la exposición hasta la necropsia ($p<0,05$).

El análisis estadístico de las puntuaciones clínicas se consiguió revisando los datos relacionados con los grupos de tratamiento que recibieron las puntuaciones clínicas medias usando un análisis de la variancia unifactorial. No hubo pruebas de diferencias significativas entre los grupos de control expuestos no vacunados y los controles estrictos en comparación con los grupos vacunados con dosis altas, medias o bajas.

20 **Ganancias de peso medias diarias**

Las ganancias de peso medias diarias (ADWG) se calcularon desde el momento de la administración de la vacuna (día 0), hasta la administración de la exposición (día 21), hasta la finalización del estudio (día 42). El análisis estadístico de las diferencias en la ganancia de peso entre los grupos de tratamiento de control expuestos vacunados con dosis altas y no vacunados reveló pruebas de una diferencia significativa desde el momento de la

administración de la exposición hasta la necropsia ($p<0,05$). Los datos del peso se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9

Grupo de tratamiento	Identificación del grupo	Peso inicial medio (kg)	ADWG (día 0 - 21) (kg)	ADWG (día 21 - 42) (kg)	ADWG Total (kg) (Vacunación hasta Necropsia)
1	vacuna B3903 dosis alta	8,074 a	0,426 a	0,739 a	0,585 a
2	vacuna B3903 dosis media	8,029 a	0,454 a	0,726 ab	0,590 a
3	vacuna B3903 dosis baja	8,165 a	0,426 a	0,671 ab	0,549 a
4	Control expuesto	8,029 a	0,435 a	0,658 b	0,549 a
5	Control estricto	8,029 a	0,426 a	0,739 ab	0,581 a

- 5 * Las mismas letras denotan unas diferencias no significativas entre las ADWG de los grupos de tratamiento desde el día de la vacunación hasta la exposición y desde el día de la exposición hasta la necropsia ($p<0,05$).

Seroconversión (IFAT)

- 10 Se recogieron semanalmente muestras de suero de todos los animales de prueba en cada grupo de tratamiento y se comprobó la presencia de anticuerpos IgG anti-Lawsonia en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 del estudio. Las muestras de control IFAT positivas y negativas fueron 100% precisas en todos los ensayos realizados en este estudio. En los días 0 hasta 21 (3 semanas después de la vacunación), todos los animales de prueba de
- 15 cada grupo de tratamiento dieron negativo en el IFA. En el día 28 (1 semana después de la exposición) del estudio, 1/15 (6,7%) de los animales de prueba del grupo de tratamiento con una dosis alta de vacuna dieron positivo en el IFA mientras que todos los demás dieron negativo en el IFA. En el día 35 (2 semanas después de la exposición) del estudio, 4/15 (26,7%) de los cerdos de los grupos de tratamiento con dosis altas y dosis medias de
- 20 vacuna y 1/10 (10%) de los cerdos del grupo de tratamiento de control expuestos no vacunados dieron positivo en el IFA para los anticuerpos de Lawsonia. Ambos grupos de

tratamiento con una dosis baja de vacuna y de control estricto dieron negativo en el IFA en el día 35. En el día 42 (3 semanas después de la exposición) del estudio, 8/10 (80%) de los cerdos del grupo de control expuesto, 6/15 (40%) de los cerdos del grupo con una dosis media de vacuna, 5/15 (33,3%) de los cerdos del grupo con una dosis baja de vacuna y 3/15 (20%) de los cerdos del grupo con una dosis alta de vacuna dieron positivo en el IFA. El grupo de tratamiento de control estricto dio negativo en el IFA al finalizar el estudio (día 42).

Los datos de seroconversión se analizaron usando la estadística de χ^2 . Para los resultados obtenidos en el grupo de tratamiento de control estricto no se tuvo en cuenta una estadística de χ^2 debido al 100% de respuestas negativas encontradas para cada animal de prueba a lo largo del estudio. En los grupos de tratamiento que recibieron una vacuna o placebo, los resultados del IFAT se compararon usando una estadística de χ^2 con una estimación del valor exacto de p (Monte-Carlo). Los resultados positivos del IFAT obtenidos de los grupos expuestos que recibieron una exposición a un cultivo puro virulento eran significativamente mayores que los que recibieron una dosis alta de vacuna y una dosis baja de vacuna ($p < 0,05$) en el día 42 (3 semanas después de la exposición) del estudio.

20 Presencia en heces de *L. intracellularis* (PCR)

Se recogieron semanalmente los exudados fecales de todos los animales de prueba de cada grupo de tratamiento y se comprobó la presencia de *L. intracellularis* mediante PCR en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 del estudio. La extracción positiva y negativa de ADN y los controles de la reacción de PCR fueron 100% precisos para cada ensayo realizado en este estudio. Todos los animales de prueba de cada grupo de tratamiento dieron negativo en heces mediante PCR para *L. intracellularis* desde el día 0 (vacunación) hasta el día 21 (exposición). Los cerdos del grupo de control estricto permanecieron negativos en heces mediante PCR para *L. intracellularis* en sus heces a lo largo del estudio. La presencia en heces de *L. intracellularis* (PCR fecal positiva) fue evidente en varios grupos de tratamiento cada semana tras la inoculación de la exposición. Estos resultados se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10

Grupo de tratamiento	Identificación del grupo	Día 28 (1 semana después de la exposición)	Día 35 (2 semanas después de la exposición)	Día 42 (3 semanas después de la exposición)
1	vacuna B3903 dosis alta	0/15 (0%) a	2/15 (13,3%) a	0/15 (0%) a
2	vacuna B3903 dosis media	6/15 (40%) ab	5/15 (33,3%) a	0/15 (0%) a
3	vacuna B3903 dosis baja	4/15 (26,7%) ab	8/15 (53,3%) ab	2/15 (13,3%) ab
4	Control expuesto	4/10 (40%) b	7/10 (70%) b	4/10 (40%) b
5	Control estricto	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)

* Las mismas letras denotan una diferencia no significativa entre los grupos de tratamiento que recibieron una exposición (p<0,05).

5

El análisis estadístico usando una estadística de χ^2 con una estimación del valor exacto de p (Monte Carlo) comparó las respuestas positivas de cada grupo de tratamiento vacunado sólo con el grupo de control expuesto no vacunado. Los resultados del grupo de control estricto se retiraron de las comparaciones de grupo porque cada cerdo era 100% negativo en heces mediante PCR para *L. intracellularis* a lo largo del estudio. En el día 28 (1 semanas después de la exposición), los cerdos que recibieron una dosis alta de vacuna tuvieron una presencia en heces de *L. intracellularis* significativamente menor que los cerdos expuestos no vacunados (p = 0,017). En el día 35 (2 semanas después de la exposición), los cerdos que recibieron una dosis alta (p = 0,0024) y una dosis media (p = 0,041) de vacuna tenían una presencia en heces de *L. intracellularis* significativamente menor que los cerdos expuestos no vacunados. En el día 42 (finalización del estudio), de nuevo, los cerdos que recibieron una dosis alta y media de vacuna (p = 0,017) tuvieron una presencia en heces de *L. intracellularis* significativamente menor en comparación con los cerdos expuestos no vacunados. Los cerdos del grupo con una dosis baja no eran significativamente menos positivos en la PCR que los controles expuestos en cualquier día después de la exposición.

20

Colonización tisular por *L. intracellularis* (PCR)

Las pruebas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa de las secciones tisulares el ileon terminal, el colon, la amígdala y el nódulo linfático mesentérico se realizaron después de la necropsia (día 42 del estudio). En el grupo con una dosis alta de vacuna, 1/15 (6,7%) de los cerdos dieron positivo en la PCR para la colonización por *L. intracellularis* en la amígdala, mientras que todos los demás grupos de tratamiento dieron negativo en la PCR. La prueba de ileítis mediante PCR del tejido linfático mesentérico reveló que 3/10 (30%) de los cerdos de los controles expuestos no vacunados dieron positivo para la colonización por *L. intracellularis*, mientras que todos los demás grupos de tratamiento dieron negativo en la PCR. La prueba de ileítis mediante PCR de los raspados de la mucosa del ileon terminal revelaron que 4/10 (40%) de los cerdos de los controles expuestos, 4/15 (26,7%) de los cerdos del grupo con una dosis baja de vacuna, 2/15 (13,3%) de los cerdos del grupo con una dosis media de vacuna y 1/15 (6,7%) de los cerdos con una dosis alta de vacuna dieron positivo en la PCR para la colonización por *L. intracellularis*. La prueba de ileítis mediante PCR del colon reveló que 3/10 (30%) de los cerdos de los controles expuestos, 5/15 (33,3%) de los cerdos del grupo con una dosis baja de vacuna, 1/15 (6,7%) de los cerdos del grupo con una dosis media de vacuna y 2/15 (13,3%) de los cerdos con una dosis alta de vacuna eran positivos mediante PCR para la colonización por *L. intracellularis*. No se observaron pruebas de colonización por *L. intracellularis* en los tejidos del grupo de control estricto.

El análisis estadístico de los resultados positivos de la ileítis mediante PCR se comparó con los grupos de tratamiento usando la estadística de χ^2 con una aproximación de Monte Carlo del valor exacto de p. Los resultados mediante PCR del nódulo linfático mesentérico indicaron pruebas de una diferencia significativa entre los controles expuestos no vacunados y todos los grupos de tratamiento que recibieron un tratamiento con vacuna ($p = 0,054$). No hubo ninguna significación estadística evidente entre los grupos de tratamiento en la colonización por *L. intracellularis* del ileon, el colon o la amígdala en el día 42 del estudio.

Histología (IHC / H&E)

En la necropsia (día 42) se recogieron secciones de 2 a 4 cm de longitud de la amígdala, el nódulo linfático mesentérico, el íleon terminal y el colon, y se colocaron en formalina tamponada al 10% para su análisis histológico. *Lawsonia intracellularis* no se detectó mediante una tinción por IHC de las secciones de la amígdala en todos los grupos de tratamiento en la necropsia. El grupo de control estricto dio negativo para *L. intracellularis* mediante IHC en todas las muestras de tejido tomadas en la necropsia. Se encontró la presencia de *L. intracellularis* y de lesiones microscópicas asociadas con la PPE en el íleon de 9/10 (90%) de los cerdos de los controles expuestos no vacunados, en 6/15 (40%) de los cerdos del grupo con una dosis baja de vacuna, en 3/15 (20%) de los cerdos del grupo con una dosis media de vacuna y en 1/15 (6,7%) de los cerdos del grupo con una dosis alta de vacuna, respectivamente. Las lesiones microscópicas eran evidentes en el colon de 8/10 (80%) de los cerdos del grupo de control expuesto, en 3/15 (20%) de los cerdos del grupo con una dosis baja de vacuna y en 1/15 (6,7%) de los cerdos del grupo con una dosis alta de vacuna. El grupo vacunado que recibió una dosis media dio negativo mediante IHC para *L. intracellularis* en el colon. Las secciones teñidas del nódulo linfático mesentérico sólo se produjeron en 1/10 (10%) de los cerdos del grupo de control expuesto que tenían *L. intracellularis*. Los resultados positivos mediante IHC en las secciones del íleon y del colon entre los grupos de tratamiento se correlacionaban bien con la presencia de una acusada hiperplasia de las criptas demostrada mediante una metodología de H&E.

El análisis estadístico de los datos cuantitativos de IHC se consiguió usando las pruebas de análisis de la variancia unifactorial y de la suma por rangos de Kruskal-Wallis, seguidas de contrastes específicos de los valores de p entre el grupo expuesto y los grupos de control estricto con cada grupo de dosis de vacuna. El análisis estadístico reveló pruebas del desarrollo de una lesión significativa debida a *L. intracellularis* en el íleon y el colon del grupo de control expuesto en comparación con los cerdos vacunados independientemente de la dosis en el día 42 del estudio ($p < 0,001$). No hubo una significación estadística evidente en las puntuaciones medias de las lesiones mediante IHC del íleon y del colon en animales vacunados que recibieron una dosis alta o media de la vacuna en comparación

con el grupo de tratamiento de control estricto ($p > 0,05$). Los cerdos que recibieron una dosis baja de vacuna tuvieron unas puntuaciones medias de las lesiones microscópicas debidas a *L. intracellularis* significativamente mayores en el ileon en comparación con el grupo de control estricto ($p < 0,05$).

5

Puntuaciones macroscópicas

El ileon y el colon de cada animal de prueba se puntuaron en el momento de la necropsia (día 42) para las lesiones macroscópicas asociadas con la PPE. Los tejidos de los cerdos de prueba del control estricto eran normales, no contenían lesiones, y recibieron unas puntuaciones medias de las lesiones de 1,1 (ileon) y 1,0 (colon). Los tejidos de los animales de prueba del grupo de control expuesto no vacunados recibieron la puntuación media de las lesiones macroscópicas más alta para el ileon (3,6) y el colon (2,0) de entre los grupos de tratamiento. Los cerdos de prueba del grupo con una dosis baja de vacuna recibieron unas puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas de 2,5 (ileon) y 1,5 (colon). Los cerdos de prueba con una dosis media de vacuna recibieron unas puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas de 1,5 (ileon) y 1,0 (colon). Los tejidos del grupo con una dosis alta de vacuna recibieron unas puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas de 1,5 (ileon) y 1,2 (colon).

El análisis estadístico de las puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas entre los grupos de tratamiento se consiguió usando un análisis de la variancia unifactorial. Las puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas indicaron pruebas de una diferencia significativa entre el ileon del grupo de control expuesto no vacunado y los grupos con una dosis media y alta de vacuna, respectivamente ($p < 0,001$). Se observaron pruebas de una diferencia significativa entre las puntuaciones medias del ileon macroscópico del control expuesto en comparación con el grupo con una dosis baja de vacuna ($p < 0,01$). Las puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas del colon fueron significativamente mayores en el grupo de control expuesto en comparación con los grupos con una dosis media y alta de vacuna, respectivamente ($p < 0,05$). Además, se observó el desarrollo de una significativa lesión macroscópica en el ileon del grupo vacunado con una dosis baja en comparación con el grupo de control estricto ($p < 0,001$). No hubo pruebas de una

significación estadística en las puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas (íleon y colon) evidentes en los grupos con una dosis media y alta de vacuna en comparación con el grupo de tratamiento de control estricto.

5

Conclusiones

Este estudio demostró que la protección en cerdos de 3 semanas de edad frente a la PPE se consiguió cuando se administraba una dosis por vía oral de 2 ml de una vacuna de B3903 (lío­filizada) que contiene un mínimo de 4,9 logs de *L. intracellularis* vivas por dosis. Una
10 protección similar, e incluso ligeramente mejor, fue evidente en el grupo de tratamiento con una dosis alta de vacuna que recibió 6,0 logs/dosis 3 semanas antes de la exposición. El grupo con una dosis baja de vacuna (3,8 logs/dosis) no mostró una protección adecuada frente a una exposición heteróloga de cultivo puro virulento en comparación con los animales de prueba que recibieron una dosis alta o media de la vacuna experimental. Las
15 diferencias estadísticas fueron evidentes entre el grupo con una dosis baja de vacuna y los controles expuestos no vacunados con respecto a la gravedad de las lesiones microscópicas en el íleon y el colon ($p < 0,001$) y las puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas del íleon ($p < 0,01$). Sin embargo, se observaron unas lesiones de PPE significativas en el íleon (lesiones microscópicas) y el colon (lesiones macroscópicas) en este grupo en
20 comparación con el grupo de control estricto que no recibió vacuna ni exposición.

En resumen, los datos de este estudio demuestran que: (1) el título protector mínimo de una administración oral única de una vacuna de B3903 (lío­filizada) a cerdos de 3 semanas de edad es de 4,9 logs/dosis; (2) la vacuna B3903 (lío­filizada) es eficaz frente a un cultivo
25 puro virulento de bajo pase de *L. intracellularis*, cepa clínica heteróloga N101494; y (3) la vacuna B3903 (lío­filizada) contribuye a la reducción de las lesiones macroscópicas y microscópicas, de la colonización tisular y de la presencia en heces de *L. intracellularis* en cerdos vacunados en comparación con cerdos no vacunados.

Lo que se reivindica es:

1. Una cepa clínica virulenta de *Lawsonia intracellularis*, en la que dicha cepa clínica virulenta es la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con el n° PTA-4927 o una cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* con todas las características que identifican a la cepa clínica depositada en la ATCC con el n° PTA-4927.
2. Una cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis*, en la que dicha cepa clínica avirulenta es la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con el n° PTA-4926 o una cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* con todas las características que identifican a la cepa clínica depositada en la ATCC con el n° PTA-4926.
3. Una vacuna para la inmunización de un animal, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una cepa clínica virulenta muerta de *Lawsonia intracellularis*, en la que dicha cepa clínica virulenta es la cepa clínica virulenta según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. La vacuna según la reivindicación 3 en la que la cantidad farmacéuticamente eficaz de la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* es de aproximadamente una TCID₅₀ de 10³ hasta aproximadamente una TCID₅₀ de 10⁶ por dosis.
5. Una vacuna para la inmunización de un animal, que comprende la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 2 y material antigénico procedente de al menos uno de los siguientes patógenos: especies del género *Salmonella*, especies del género *Erysipelothrix*, especies del género *Haemophilus*, especies del género *Mycoplasma*, especies del género *Leptospira*, especies del género *Clostridium*, especies del género *Streptococcus*, especies del género *Brachyspira*, circovirus, virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS), virus de la

gripe porcina (SIV), virus transmisible de gastroenteritis (TGE), parvovirus y *Escherichia coli*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 6. Una vacuna para la inmunización de un animal, que comprende la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 2 y material antigénico procedente de *Salmonella choleraesuis*, especies del género *Erysipelothrix*, virus transmisible de gastroenteritis (TGE), *Escherichia coli*, especies del género *Clostridium* y especies del género *Brachyspira*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10
- 15 7. Una vacuna para la inmunización de un animal, que comprende la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 2 y material antigénico procedente de *Salmonella choleraesuis* y especies del género *Erysipelothrix*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 8. Una vacuna para la inmunización de un animal, que comprende la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 2 y material antigénico procedente de al menos uno de los siguientes patógenos: especies del género *Clostridium*, virus de la gripe equina (EIV), virus del herpes equino (EHV), alfavirus y virus del Nilo occidental; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. Un método para estimular el sistema inmune de un animal para que responda ante un antígeno inmunogénico de *Lawsonia intracellularis* patógena, que comprende la administración ha dicho animal de una composición inmunogénica que contiene la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 2.
- 30 10. Un método para inmunizar un animal frente a la enteropatía proliferativa porcina que comprende la administración de una cantidad farmacéuticamente aceptable de la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* de la reivindicación 2, en el que la cantidad farmacéuticamente eficaz de la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia*

intracellularis es de aproximadamente una TCID₅₀ de 10³ hasta aproximadamente una TCID₅₀ de 10⁶ por dosis.

11. Un método para elaborar una vacuna para inducir una respuesta inmune ante bacterias de *Lawsonia intracellularis* en un animal, que comprende las etapas de: (a) incubar una cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en células de cultivo que están en suspensión con una concentración de oxígeno de menos de aproximadamente el 10 por ciento para cultivar dichas bacterias; y (b) mezclar dichas bacterias cultivadas con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. El método según la reivindicación 11 que comprende además la etapa de matar dichas bacterias cultivadas para preparar una vacuna que contiene *Lawsonia intracellularis* muerta.
13. El método según la reivindicación 11 que comprende además la etapa de cultivar dichas bacterias durante un tiempo suficiente para producir una cepa clínica atenuada.
14. Un método para cultivar *Lawsonia intracellularis* que comprende:
 - (a) infectar células cultivadas con un inóculo que comprende la cepa clínica virulenta de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 1,
 - (b) incubar dichas células infectadas con una concentración de oxígeno de menos de aproximadamente el 10 por ciento mientras se mantienen dichas células infectadas en suspensión mediante la agitación de dichas células durante un período de tiempo suficiente para aumentar la producción de dicha *Lawsonia intracellularis*, y
 - (c) recolectar al menos una porción de dicha *Lawsonia intracellularis*.
15. El método según la reivindicación 14 en el que la concentración de oxígeno está en el intervalo de aproximadamente el 0 por ciento hasta aproximadamente el 8 por ciento.

16. El método según la reivindicación 15 en el que la concentración de oxígeno está en el intervalo de aproximadamente el 0 por ciento hasta aproximadamente 3 por ciento.
17. El método según la reivindicación 14 en el que dicha incubación se produce con una
5 concentración de dióxido de carbono en el intervalo de aproximadamente 6 por ciento hasta aproximadamente el 10 por ciento.
18. El método según la reivindicación 14 en el que dichas células cultivadas se eligen del grupo formado por: células HEp-2, McCoy e IEC-18.
10
19. El método según la reivindicación 18 en el que dichas células IEC-18 se cultivan en microvehículos.
20. El método según la reivindicación 14 en el que las células infectadas se incuban según
15 la etapa (c) durante un periodo de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10 días.
21. El método según la reivindicación 14 que comprende además una etapa (d) de cultivo de dichas bacterias durante un tiempo suficiente para producir una cepa clínica atenuada.
20
22. El método según la reivindicación 21 en el que las bacterias se cultivan según la etapa (d) durante un periodo de aproximadamente 150 días hasta aproximadamente 250 días.
- 25 23. El método según la reivindicación 22 que comprende además una etapa (e) de liofilización de dicha cepa clínica atenuada.
24. El método según la reivindicación 23 en el que dicha liofilización comprende una etapa primaria de secado y una etapa secundaria de secado.
30

25. Una cepa clínica atenuada liofilizada producida mediante el método según la reivindicación 23.
26. Un método para el diagnóstico de la enteropatía proliferativa porcina que comprende
5 realizar un ensayo para detectar anticuerpos contra *Lawsonia intracelluris* en un sujeto animal no humano que comprende:
- (a) poner en contacto una muestra del sujeto con la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para formar un complejo antígeno-anticuerpo; y
 - 10 (b) detectar la formación de dicho complejo,
en el que la presencia de dicho complejo se correlaciona positivamente con un diagnóstico de la enteropatía proliferativa porcina.
- 15 27. El método según la reivindicación 26 en el que el ensayo comprende un ensayo elegido del grupo formado por: radioinmunoensayo, ensayo de inmunosorción enzimática (ELISA), inmunoensayo de fluorescencia y ensayo de inmunoelectroforesis.
28. Un método para producir antisueros contra *Lawsonia intracelluris* en un animal no
20 humano que comprende:
- (a) administrar la cepa clínica de *Lawsonia intracelluris* de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 a un animal no humano en una cantidad eficaz para desencadenar una respuesta inmune; y
 - (b) recoger el suero o el plasma que contiene los anticuerpos contra dicha
25 *Lawsonia intracelluris*.

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

102

Applicant's or agent's file reference 10-052a PCT	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA/18	
International application No PCT/US2004/022704	International filing date (day/month/year) 15.07.2004	Priority date (day/month/year) 25.07.2003
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/02, C12N1/20		
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC. et al.		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 9 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.15 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 03.02.2005	Date of completion of this report 19.09.2005	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5816 Patenlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tlx: 31 851 apo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Authorized Officer Noë, V Telephone No +31 70 340- 	

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2004/022704

Box No. I Basis of the report

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

Description, Pages

1-41 as originally filed

Claims, Numbers

1-28 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify)*:
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:
 4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
 - ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing *(specify)*:
 - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

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

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2004/022704

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

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

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 1-28 (partially), 9,10

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 9,10 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

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

☒ the claims, or said claims Nos. 1-28 (partially) are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

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

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

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

☐ See separate sheet for further details

105

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2004/022704

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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-28
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-28
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-8,11-28
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

III. Non-establishment of opinion (Continuation)

1. Claims 9 and 10 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv)PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

2. Present claims 1 and 2 and claims 3-28 (referring to claims 1 and 2) relate to *Lawsonia intracellularis* isolates defined by reference to a desirable characteristic or property, namely isolates having the characteristics of deposit isolate ATCC No. PTA-4927 or PTA-4926. The claims cover all isolates having these characteristic, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only isolates with deposit isolate ATCC No. PTA-4927 or PTA-4926. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search and examination over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the *Lawsonia intracellularis* isolates by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search and examination over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search and examination have been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to *Lawsonia intracellularis* deposit isolate ATCC No. PTA-4927 and PTA-4926.

V. Reasoned statement (Continuation)

3. CITATIONS

Reference is made to the following documents:

D1: US-A-5 885 823 (KNITTEL JEFFREY P ET AL) 23 March 1999 (1999-03-23)

4. NOVELTY (Art. 33(2) PCT)

1. None of the prior art documents discloses the specific *Lawsonia intracellularis* isolates having deposit ATCC No. PTA-4927 or PTA-4926. Therefore, claims 1 and 2 and claims 3-28 all referring to these specific *Lawsonia intracellularis* isolates are considered to be novel.
2. The present application satisfies the criterion set forth in Article 33(2) PCT because the subject-matter of claims 1-28 is new in respect of prior art as defined in the regulations (Rule 64(1)-(3) PCT).

5. INVENTIVE STEP (Art. 33(3) PCT)

1. For inventive step analysis of claims 1 and 2, relating to a virulent *Lawsonia intracellularis* isolate having deposit ATCC No. PTA-4927 and a avirulent *Lawsonia intracellularis* isolate having deposit ATCC No. PTA-4926, D1 is considered to represent the most relevant state of the art and discloses a virulent and also an avirulent *Lawsonia intracellularis* isolate having deposit ATCC No. 55672 and 55783, derived from the intestines of American pigs with porcine proliferative enteropathy using the same method as in the present application (see example 1). The subject-matter of claim 1 and 2 differ in that a virulent and also an avirulent *Lawsonia intracellularis* isolate are claimed that are, derived from the intestines of a European pig with porcine proliferative enteropathy (see page 16, line 20-21 of the present application).
2. The problem to be solved by the subject matter of claim 1 and 2 may therefore be regarded as the provision of a pig with porcine proliferative enteropathy having an alternative origin. The solution would be the provision of a European pig with porcine proliferative enteropathy.
3. This solution cannot however be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT), since it would be obvious for the person skilled in the art to use a pig with porcine proliferative enteropathy of European origin to isolate *Lawsonia intracellularis* causing porcine proliferative enteropathy in European animals and use this bacteria for the production of a vaccine for a

better protection of European animals against porcine proliferative enteropathy.

4. Therefore, the subject-matter of claims 1 and 2 is not considered to be inventive.
5. The vaccine compositions of claims 3-8 are not considered to be inventive because D1 discloses also vaccine compositions comprising a killed virulent *Lawsonia intracellularis* isolated derived from an American pig with porcine proliferative enteropathy, which can be used in combination with other vaccines (see column 2, line 34-41; column 3, line 24-50). For the same reasons indicated above the use of an isolate from a European pig with porcine proliferative enteropathy is not considered to be inventive. It would also be obvious for the skilled person to combine this vaccine with antigenic material of other pathogens.
6. D1 discloses a method for making a vaccine, a method for cultivating *Lawsonia intracellularis*, a method for diagnosis of porcine proliferative enteropathy corresponding with the methods of claims 11-24, 26-27 of the present application (see D1, column 2, line 18-58; column 3, line 44-58; column 4, line 2-10, 57-67; column 5, line 1-8; column 6, line 62 - column 7, line 6; column 7, line 20-33; columns 8, line 29-35; column 8, line 57 - column 9, line 1, column 30-44). The difference of D1 with the present application is that in these methods a *Lawsonia intracellularis* isolate derived from the intestines of American pigs with porcine proliferative enteropathy is used. The subject-matter of claims 11-24, 26-27 differ in that *Lawsonia intracellularis* isolates derived from the intestines of a European pig with porcine proliferative enteropathy are used. For reasons already explained above, claims 11-24, 26-27 are not considered to be inventive.
7. Claim 25 for products defined in terms of a process of manufacture are admissible only if the products as such fulfill the requirements of patentability, i.e. inter alia that they are novel and inventive. In view of D1, the lyophilized attenuated isolate of claim 25 is not considered to be inventive since D1 states that vaccines comprising *Lawsonia intracellularis* can be lyophilized (see column 3, line 44-50).

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

International application No.

PCT/US2004/022704

8. Claim 28 is not considered to be inventive since this method for producing antisera against a bacteria is generally known by the person skilled in the art.
9. The present application does therefore not satisfy the criterion set forth in Article 33(3) PCT and the subject-matter of claims 1-28 does not involve an inventive step (Rule 65(1)(2) PCT).

6. INDUSTRIAL APPLICABILITY (Art. 33(4) PCT)

1. For the assessment of the present claims 9 and 10 on the question whether it is industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

VIII. Certain Observations (Continuation)

- 7.1 The application does not meet the requirements of Article 6 PCT because claims are not clear for the following reasons:
- 7.2 The expression "having all of the identifying characteristics of" used in claims 1 and 2 is not clear and for this reason claims 1 and 2 lack clarity (Art. 6 PCT).
- 7.3 Claim 3 is not clear since it relates to a vaccine comprising a killed virulent isolate of *Lawsonia intracellularis* and also wrongly refers to the avirulent isolate of claim 2.
- 7.4 Claim 4 lacks clarity since it refers to the vaccine composition of claim 3 comprising a killed virulent isolate. Claim 4 further specifies that this vaccine composition comprises a specific amount of avirulent isolate.
- 7.5 The term "about" used in claims 4,10,11,15-17,20 is vague and indefinite and as

such renders the scope of the claims unclear; accordingly, the claims require amendment to remove this defect (Art. 6 PCT).

- 7.6 The expression "for a time sufficient to produce an attenuated isolate" used in claims 13 and 21 is not clear since it defines the subject-matter of the claims in terms of a result to be achieved and lacks essential technical features.

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(Artículo 36 y Regla 70 del PCT)

Referencia del expediente del agente o solicitante 10-052 A PCT	PARA ACTUACIONES ADICIONALES	Ver notificación de Transmisión del Reporte de Examen Preliminar (Formato PCT/IPEA418)
Solicitud Internacional No. PCT/US2004/22704	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 15.07.2004	Fecha de prioridad (día/mes/año) 25.07.2003
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC A61K 39/02, C12N 1/20		
Solicitante BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC et al.		

1. Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Administración encargada del Examen Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y se envía al solicitante en concordancia con el artículo 36. 2. Este INFORME consta de una total de <u>6</u> hojas, incluyendo la portada 3. Este Informe también contiene ANEXOS que comprenden: a. ☐ (enviados al solicitante y a la Oficina Internacional) en total ____ hojas; las cuales se relacionan con ☐ Hojas con la descripción, reivindicaciones y/o dibujos, que han sido modificados y que son la base de este informe, y/o hojas que contienen rectificaciones aceptadas por la Administración (Ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas) ☐ Hojas que reemplazan hojas anteriores, las cuales contienen sin embargo modificaciones de acuerdo con las razones del campo No. 1, punto 4 y campo adicional según la interpretación de la administración, que se salen del contenido de divulgación de la solicitud internacional en la versión originalmente presentada. b. ☐ (enviados a la Oficina Internacional únicamente) un total de (indique el tipo y número de medio(s) de registro electrónico(s)) _____, que contienen un listado y/o tablas de secuencia relativos al mismo, únicamente en formato legible por computador, según se indica en la Casilla Complementaria relativa a Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas).																									
4. Este Informe contiene indicaciones relativas a los siguientes aspectos: <table><tr><td>I</td><td>☒</td><td>Fundamentos del Informe</td></tr><tr><td>II</td><td>☐</td><td>Prioridad</td></tr><tr><td>III</td><td>☒</td><td>No se establece concepto relativo a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial</td></tr><tr><td>IV</td><td>☐</td><td>Carencia de unidad de la invención</td></tr><tr><td>V</td><td>☒</td><td>Declaración razonada según el artículo 35(2), en relación con la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración</td></tr><tr><td>VI</td><td>☐</td><td>Ciertos documentos citados</td></tr><tr><td>VII</td><td>☐</td><td>Ciertos defectos de la solicitud internacional</td></tr><tr><td>VIII</td><td>☐</td><td>Ciertas observaciones respecto a la solicitud internacional</td></tr></table>		I	☒	Fundamentos del Informe	II	☐	Prioridad	III	☒	No se establece concepto relativo a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial	IV	☐	Carencia de unidad de la invención	V	☒	Declaración razonada según el artículo 35(2), en relación con la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración	VI	☐	Ciertos documentos citados	VII	☐	Ciertos defectos de la solicitud internacional	VIII	☐	Ciertas observaciones respecto a la solicitud internacional
I	☒	Fundamentos del Informe																							
II	☐	Prioridad																							
III	☒	No se establece concepto relativo a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial																							
IV	☐	Carencia de unidad de la invención																							
V	☒	Declaración razonada según el artículo 35(2), en relación con la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración																							
VI	☐	Ciertos documentos citados																							
VII	☐	Ciertos defectos de la solicitud internacional																							
VIII	☐	Ciertas observaciones respecto a la solicitud internacional																							
Fecha de presentación de la demanda 03.02.2005	Fecha de terminación de este reporte 19.09.2005																								
Nombre y dirección de correo de la IPEA OFICINA EUROPEA DE PATENTES	Funcionario Autorizado Nºe, V Teléfono No. +3170 340																								

Campo No. I Base del informe

1. Respecto al idioma el informe se basa en la solicitud internacional en el idioma, en el que fue presentado, a menos que se indique otra cosa en este punto.

☐ El informe se basa en una traducción del idioma original al siguiente idioma, en donde se trata del idioma de traducción, que fue presentada para el siguiente propósito:

- ☐ búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3 y 23.1b)).
☐ publicación de la solicitud internacional (bajo Regla 12.4)
☐ examen preliminar internacional (bajo Regla 55.2 y/o 55.3).

2. Respecto a los elementos * de la solicitud internacional (*Las hojas de reemplazo que han sido entregadas a la Oficina receptora en respuesta a la invitación bajo el Artículo 14 se refieren en este informe como "originalmente presentadas" y no se anexan a este informe ya que ellas no contienen modificaciones (Regla 70.16 y 70.17):*

☒ La descripción:
páginas 1-41, en la versión originalmente presentada.

☒ Las reivindicaciones:
números 1 - 28, en la versión originalmente presentada.

☐ Un protocolo de secuencia y/o tablas correspondientes adicionales – ver campo adicional con relación al protocolo de secuencia.

3. ☐ Con base en las modificaciones se suprimieron los siguientes documentos:

- ☐ Descripción: Página
☐ Reivindicaciones, no.
☐ Dibujos; Hoja/aparte
☐ Listado de Secuencia (Datos específicos):
☐ Tablas correspondientes al listado de secuencias adicionales (Datos específicos):

4. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (parte de) las modificaciones no se hubieran realizado, ya que éstas han sido consideradas como una ampliación de lo inicialmente divulgado como se indica en el Campo Suplementario (Regla 70.2(c)).

- ☐ Descripción: Página
☐ Reivindicaciones, no.
☐ Dibujos; Hoja/aparte
☐ Listado de Secuencia (Datos específicos):
☐ Tablas correspondientes al listado de secuencias adicionales (Datos específicos):

* Cualquier hoja de reemplazo que contenga dichas modificaciones deberá ser referida con la indicación "Reemplazo".

Recuadro III No establecimiento de opinión en cuanto a novedad, nivel inventivo y aplicación industrial.

Los comentarios respecto de si la presente invención es nueva, o tiene nivel inventivo (o no son obvias) y aplicación industrial no se han llevado a cabo respecto a las reivindicaciones:

- ☐ La solicitud internacional completa
- ☒ Reivindicaciones No. 1-28 (parcialmente), 9, 10

Porque

☒ Dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones No 16 se relacionan con el siguiente contenido o materia el cual no requiere examen preliminar internacional (especificar):

Ver hoja anexa

- ☐ La descripción, reivindicaciones o dibujos (Indicar elementos particulares debajo) o dichas reivindicaciones No. _ no son claras y por lo tanto no se puede llevar a cabo una opinión.
- ☒ Las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones No 1-28 (parcialmente) no están adecuadamente sustentadas en la descripción, por lo que no se puede llevar a cabo una opinión.
- ☒ No se ha establecido el reporte de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones No. 16.
- ☐ La secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos no cumple con el estándar provisto en el anexo C de las instrucciones administrativas en:

La forma escrita ☐ No ha sido presentada
☐ No cumple con el estándar

La forma electrónica ☐ No ha sido presentada
☐ No cumple con el estándar

- ☐ Las tablas relacionadas con la secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos, si en la forma electrónica no cumple con los requerimientos técnicos provistos para el anexo C-bis de las instrucciones administrativas.
- ☐ Ver recuadro suplementario para mayores detalles.

1. Declaración

Novedad (N)	Reivindicaciones	1-28	SI
	Reivindicaciones		NO
Nivel inventivo (NI)	Reivindicaciones		SI
	Reivindicaciones	1-28	NO
Aplicación Industrial (AI)	Reivindicaciones	1-8, 11-28	SI
	Reivindicaciones		NO

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7)

Ver hoja anexa

III. No establecimiento de opinión (CONTINUACIÓN)

1. Las reivindicaciones 9 y 10 se relacionan con un objeto considerado por esta autoridad estar cubierto por los provisos de la regla 67.1 (iv) PCT. En consecuencia, no se formulara opinión con respecto a la aplicación industrial del objeto de dichas reivindicaciones (artículo 34 (4) (a) (i) del PCT).

2. Las reivindicaciones 1 y 2 y 3-28 (relacionadas con reivindicaciones 1 y 2) se relacionan a aislados de *Lawsonia intracellularis* definidos por referencia a propiedades o características deseables a saber, aislados que tienen características del depósito ATCC No. PTA-4927 o PTA-4926. las reivindicaciones cubren todos los aislados que tienen esas características, mientras que la solicitud provee sustento dentro del significado del artículo 6 del PCT y/o revelación dentro del significado del artículo 5 del PCT para aislados con depósito ATCC No. PTA-4927 o PTA-4926. en el presente caso, las reivindicaciones al carecer de soporte al igual que la solicitud carece de revelación, es imposible llevar a cabo una búsqueda significativa sobre el total de las reivindicaciones. Además de lo anterior, la solicitud no es clara (artículo 6, PCT). se hace un intento por definir los aislados de *Lawsonia intracellularis* por el resultado a conseguir. De nuevo, esta falta de claridad, hace imposible realizar una búsqueda significativa sobre el total de la materia reivindicada. En consecuencia, la búsqueda y el examen se han llevado a cabo para aquellas partes de las reivindicaciones que parecen ser claras, sustentadas y reveladas, a saber aquellas partes relacionadas con el aislado de *Lawsonia intracellularis* ATCC No. PTA-4927 y PTA-4926.

V. Afirmación argumentada (continuación)

3. CITACIONES

Se hace referencia a las siguientes documentos:

D1: US-a-5 885 823 (KNITTEL JEFFREY P ET AL) 23 Marzo 1999 (1999-03-23)

4. Novedad

1. Ninguno de los documentos citados revela específicamente aislados de *Lawsonia intracellularis* con depósito ATCC No. PTA-4927 o PTA-4926. Por lo tanto, las reivindicaciones 1 y 2 y 3-28 todas relacionadas con aislados de *Lawsonia intracellularis* se consideran nuevos.

2. La presente solicitud satisface el criterio del artículo 33 (2) PCT porque el contenido de las reivindicaciones 1-28 es nuevo con respecto al arte previo como se define en las regulaciones (regla 64) (1)-(3) del PCT).

5. Nivel Inventivo

1. Para el análisis de nivel inventivo de las reivindicaciones 1 y 2, relacionadas con un aislado virulento de *Lawsonia intracellularis* con depósito ATCC No. PTA-4927 y aislado de *Lawsonia intracellularis* con depósito ATCC No. PTA-4926, D1 se considera que representa el estado del arte más cercano y revela un aislado virulento y no virulento de *Lawsonia intracellularis* con depósito ATCC No. 55872 y 55783, derivados de del Intestino de cerdos Americanos con enteropatía porcina proliferativa usando el mismo método como en la presente solicitud (ver ejemplo 1). El contenido de las reivindicaciones 1 y 2 se diferencian en

que un aislado de *Lawsonia intracellularis* virulento y no virulento son reivindicados, derivados de los intestinos de un cerdo de tipo Europeo con enteropatía porcina proliferativa (ver página 16, línea 20-21 de la presente solicitud).

2. El problema a resolver por el contenido de las reivindicaciones 1 y 2 puede ser considerado como la provisión de un cerdo con enteropatía porcina proliferativa con origen alternativo. La solución sería la provisión de un cerdo de tipo Europeo con enteropatía porcina proliferativa.

3. Esta solución no puede considerarse que represente nivel inventivo (artículo 33 (3) del PCT). Ya que sería obvio para una persona versada en la materia usar un cerdo con enteropatía porcina proliferativa de origen Europeo para aislar *Lawsonia intracellularis* causando enteropatía porcina proliferativa porcina en animales Europeos y usar esta bacteria para la producción de una vacuna para una mejor protección de animales Europeos en contra de enteropatía porcina proliferativa.

4. Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1 y 2 no se consideran inventivas.

5. Las composiciones para vacuna de las reivindicaciones 3-8 no son inventivas porque D1 revela también composiciones que comprenden un aislado de *Lawsonia intracellularis* virulento suprimido derivados de un cerdo tipo Americano con enteropatía porcina proliferativa, el cual se puede usar en combinación con otras vacunas. (Ver columna 2, línea 34-41; columna 3, línea 24-50). Para las mismas razones indicadas arriba, el uso de un aislado de de cerdo de tipo Europeo con enteropatía porcina proliferativa no se considera inventivo. Sería también obvio para una persona versada en la materia combinar esta vacuna con material antigénico de otros patógenos.

6. D1 revela un método para producir una vacuna, un método para cultivar *Lawsonia intracellularis*, un método para diagnóstico de enteropatía porcina proliferativa correspondiente con los métodos de las reivindicaciones 11-24, 26-27 de la presente solicitud (ver D1, columna 2, línea 18-58; columna 3, línea 44-58; columna 4, línea 2-10, 57-67; columna 5, línea 1-8; columna 6, línea 62-columna 7, línea 6; columna 7, línea 20-33, columnas 8, línea 29-35, columna 8 línea 57, columna 9, línea 1, columna 30-44). La diferencia de D1 con la presente solicitud es que en esos métodos se usa un aislado de *lawsonia intracellularis* derivado de los intestinos de cerdos tipo Americano con enteropatía porcina proliferativa. El objeto de las reivindicaciones 11-24, 26-27 difiere en que se usan los aislados de *Lawsonia intracellularis* derivados de los intestinos de un cerdo tipo Europeo con enteropatía porcina proliferativa. Por las razones ya expuestas, las reivindicaciones 11-24, 26-27 no se consideran inventivas.

7. La reivindicación 25 para productos definidos en términos de un proceso de manufactura son admisibles siempre y cuando los productos como tales cumplan con los requisitos de patentabilidad, i.e. entre otros que sean novedosos e inventivos. En vista de D1, el aislado liofilizado y atenuado de la reivindicación 25 no se considera inventivo ya que D1 afirma que las vacunas que comprenden *Lawsonia intracellularis* se pueden liofilizar (ver columna 3, línea 44-50).

8. La reivindicación 28 no se considera inventiva ya que este método para producir antisuero contra una bacteria es conocido por una persona versada en la materia.

9. La presente solicitud por lo tanto, no cumple el criterio de nivel inventivo para las reivindicaciones 1-28.

8. **Aplicación Industrial**

Para la evaluación de las reivindicaciones 9 y 10 acerca de si tiene aplicación Industrial, no existe criterio unificado en los estados contratantes del PCT. La patentabilidad puede ser también dependiente tras la formulación de las reivindicaciones. La EPO por ejemplo, no reconoce objeto de aplicación Industrial las reivindicaciones de uso de un compuesto en tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, reivindicaciones de un compuesto conocido para primer uso en el tratamiento médico y el uso de tal compuesto para la manufactura de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

VIII. **Ciertas observaciones**

7.1 La solicitud no cumple con los requisitos del artículo 6 del PCT porque las reivindicaciones no son claras por las siguientes razones:

7.2 La expresión "que tiene todas las características que identifican" usado en las reivindicaciones 1 y 2 no es claro y por esta razón las reivindicaciones 1 y 2 no son claras.

7.3 La reivindicación 3 no es clara ya que se relaciona con una vacuna que comprende un aislado virulento de *Lawsonia Intracellularis* y también se refiere erróneamente a aislados no virulentos de la reivindicación 2.

7.4 La reivindicación 4 no es clara ya que se refiere a una composición de vacuna de la reivindicación 3 que comprende un aislado virulento suprimido. La reivindicación 4 además específica que esta composición comprende una cantidad específica de un aislado no virulento.

7.5 El término "aproximadamente" usado en las reivindicaciones 4, 10, 11, 15-17, 20 es indefinido y por lo tanto hace que el alcance de las reivindicaciones no sea claro; por lo tanto se requiere una modificación de las reivindicaciones.

7.6 La expresión "por un tiempo suficiente para producir un aislado atenuado" usado en las reivindicaciones 13 y 21 no es claro ya que define el objeto de las reivindicaciones en términos de un resultado a conseguir y no presenta características técnicas esenciales.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/02 C12N1/20

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

B. FIELDS SEARCHEDMinimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K C12N G01N

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

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

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 885 823 A (KNITTEL JEFFREY P ET AL) 23 March 1999 (1999-03-23) cited in the application abstract column 2, lines 18-58 column 3, lines 44-58 column 4, lines 2-10 column 4, lines 57-67 column 5, lines 1-8 column 6, line 62 - column 7, line 6 column 7, lines 20-33 column 8, line 29 - line 35 column 8, line 57 - column 9, line 1 column 17, lines 30-44 claims 1-17 -/-	1-28



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 2004

Date of mailing of the international search report

03/11/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5518 Patenplein 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-6540, Tx. 31 851 apo nl,
Fax: (+31-70) 340-8318

Authorized officer

Noë, V

From PCT/IB/210 (continuation of second of two) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.
PCT/US2004/022704

120

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 9,10 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5885823	A	23-03-1999	US 5714375 A	03-02-1998
			AU 717045 B2	16-03-2000
			AU 6262796 A	24-12-1996
			BG 64292 B1	31-08-2004
			BG 102130 A	30-09-1998
			BR 9608338 A	05-01-1999
			CA 2222643 A1	12-12-1996
			CN 1167146 A	10-12-1997
			CZ 9703899 A3	15-07-1998
			DE 843818 T1	28-11-2002
			EP 1403643 A1	31-03-2004
			EP 0843818 A1	27-05-1998
			ES 2173055 T1	16-10-2002
			HU 9900884 A2	28-07-1999
			ID 17131 A	04-12-1997
			JP 11507225 T	29-06-1999
			NZ 319994 A	28-01-2000
			PL 325872 A1	17-08-1998
			RO 118885 B1	30-12-2003
			WO 9639629 A1	12-12-1996
US 5714375	A	03-02-1998	AU 717045 B2	16-03-2000
			AU 6262796 A	24-12-1996
			BG 64292 B1	31-08-2004
			BG 102130 A	30-09-1998
			BR 9608338 A	05-01-1999
			CA 2222643 A1	12-12-1996
			CZ 9703899 A3	15-07-1998
			DE 843818 T1	28-11-2002
			EP 1403643 A1	31-03-2004
			EP 0843818 A1	27-05-1998
			ES 2173055 T1	16-10-2002
			HU 9900884 A2	28-07-1999
			JP 11507225 T	29-06-1999
			NZ 319994 A	28-01-2000
			PL 325872 A1	17-08-1998
			RO 118885 B1	30-12-2003
			WO 9639629 A1	12-12-1996
			US 5885823 A	23-03-1999

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/02 C12N1/20

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C12N G01N

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

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

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 885 823 A (KNITTEL JEFFREY P ET AL) 23 March 1999 (1999-03-23) cited in the application abstract column 2, lines 18-58 column 3, lines 44-58 column 4, lines 2-10 column 4, lines 57-67 column 5, lines 1-8 column 6, line 62 - column 7, line 6 column 7, lines 20-33 column 8, line 29 - line 35 column 8, line 57 - column 9, line 1 column 17, lines 30-44 claims 1-17 -/-	1-28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubt on priority claims or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 2004

Date of mailing of the international search report

03/11/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 2016 Patentstrasse 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 691 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Noë, V

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 714 375 A (KNITTEL JEFFREY P ET AL) 3 February 1998 (1998-02-03) cited in the application column 1, line 60 - column 2, line 51 column 3, lines 13-23 column 3, line 66 - column 4, line 17 column 6, lines 4-8 column 6, lines 26-34 column 7, line 38 - line 42 column 8, lines 1-17 example 5	1,2,9, 11, 13-15, 17-22, 26,27
A	KROLL J J ET AL: "Efficacy of an avirulent Lawsonia intracellularis vaccine in swine" ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 101, 2001, page 747, XP008006344 & 101ST GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY; ORLANDO, FL, USA; MAY 20-24, 2001 ISSN: 1060-2011 abstract	

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 9,10 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Patent document filed in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5885823	A	23-03-1999	US 5714375 A	03-02-1998
			AU 717045 B2	16-03-2000
			AU 6262796 A	24-12-1996
			BG 64292 B1	31-08-2004
			BG 102130 A	30-09-1998
			BR 9608338 A	05-01-1999
			CA 2222643 A1	12-12-1996
			CN 1167146 A	10-12-1997
			CZ 9703899 A3	15-07-1998
			DE 843818 T1	28-11-2002
			EP 1403643 A1	31-03-2004
			EP 0843818 A1	27-05-1998
			ES 2173055 T1	16-10-2002
			HU 9900884 A2	28-07-1999
			ID 17131 A	04-12-1997
			JP 11507225 T	29-06-1999
			NZ 319994 A	28-01-2000
			PL 325872 A1	17-08-1998
			RO 118885 B1	30-12-2003
			WO 9639629 A1	12-12-1996
US 5714375	A	03-02-1998	AU 717045 B2	16-03-2000
			AU 6262796 A	24-12-1996
			BG 64292 B1	31-08-2004
			BG 102130 A	30-09-1998
			BR 9608338 A	05-01-1999
			CA 2222643 A1	12-12-1996
			CZ 9703899 A3	15-07-1998
			DE 843818 T1	28-11-2002
			EP 1403643 A1	31-03-2004
			EP 0843818 A1	27-05-1998
			ES 2173055 T1	16-10-2002
			HU 9900884 A2	28-07-1999
			JP 11507225 T	29-06-1999
			NZ 319994 A	28-01-2000
			PL 325872 A1	17-08-1998
			RO 118885 B1	30-12-2003
			WO 9639629 A1	12-12-1996
			US 5885823 A	23-03-1999

127
126

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 4,667
FECHA : ENERO 23 DE 2006

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación : 06006790 00000000 Folios: 127
Fecha (PAB): 2006-01-25 16:42:42
Trámite : 011 PCI-PATENT 379 FASE NUL3 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE MARCAS Y DISEÑOS

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	36494409	23/01/2006	36,366,160.00

***** CONCEPTO *****

INT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Qdo 15149-841-001-9



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

128
127
SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 8986-738 00000000
Fecha (PM): 2006-01-25 16:42:52
Trámite: 411 PCI-PATENT 3/3 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: Esta DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ()	MODELO DE UTILIDAD ()	USUARIO ()	RADICADOR ()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()	()
-Descripción de la invención.	()	()	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:

Fecha:



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radiación: 05005796 00000000 Folios 127
Fecha (MM): 2006-01-25 16:42:52
Trámite: 011 PET-PRIEN 379 FASE NUL1 ALL PREBENC
Dependencia: 2009 DIVISION DE MARCAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL** 2006-02-25 ✓**SOLICITUD DE:****1**☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.**2****SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **BOEHRINGER INGELHEIM
VETMEDICA, INC**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes del estado de Missouri, Estados
Unidos de América.

Dirección: 2621 North Belt Highway
St Joseph
Missouri 64506-2002
Estados Unidos de América.

Domicilio: St. Joseph
Missouri 64506-2002
Estados Unidos de América.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ☐
Número

3**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual ☐
Número **438.019** T.P **31.929**

4**INVENTOR (ES)
(72)**

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

3. **Jeffrey P KNITELL**
4400 Philodendrom Court
Melbourne
Florida 32934
Estados Unidos de América

2. **Jeremy J KROLL**
14217 Maple Drive
Urbandale
Iowa 50323
Estados Unidos de América.

5**PCT (86)**Solicitud Internacional No. **PCT/US2004/022704** ✓Fecha: **15 de julio de 2004** ✓Publicación Internacional No. **WO 2005/011731 A1**Fecha: **10 de febrero de 2005****6****Título (54)**

**LAWSONIA INTRACELLULARIS DE ORIGEN EUROPEO Y VACUNAS, AGENTES
DE DIAGNOSTICO Y MET D S DE USO DE LOS MISMOS**

7**Clasificación Internacional (51)** **A61K 39/02, C12N 1/20, A61K 39/116, 39/295** ✓

Lo que se reivindica es:

1. Una cepa clínica virulenta de *Lawsonia intracellularis*, en la que dicha cepa clínica virulenta es la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con el n° PTA-4927, o una cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* con todas las características que identifican a la cepa clínica depositada en la ATCC con el n° PTA-4927.
2. Una cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis*, en la que dicha cepa clínica avirulenta es la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con el n° PTA-4926 o una cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* con todas las características que identifican a la cepa clínica depositada en la ATCC con el n° PTA-4926.
3. Una vacuna para la inmunización de un animal, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una cepa clínica virulenta muerta de *Lawsonia intracellularis*, en la que dicha cepa clínica virulenta es la cepa clínica virulenta según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. La vacuna según la reivindicación 3 en la que la cantidad farmacéuticamente eficaz de la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* es de aproximadamente una TCID₅₀ de 10³ hasta aproximadamente una TCID₅₀ de 10⁶ por dosis.
5. Una vacuna para la inmunización de un animal, que comprende la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 2 y material antigénico procedente de al menos uno de los siguientes patógenos: especies del género *Salmonella*, especies del género *Erysipelothrix*, especies del género *Haemophilus*, especies del género *Mycoplasma*, especies del género *Leptospira*, especies del género *Clostridium*, especies del género *Streptococcus*, especies del género *Brachyspira*, circovirus, virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS), virus de la

129 131
130

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	6 6798
	Solicitud internacional	US2004/022704
	Fecha inicio fase nacional	25/02/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	2661

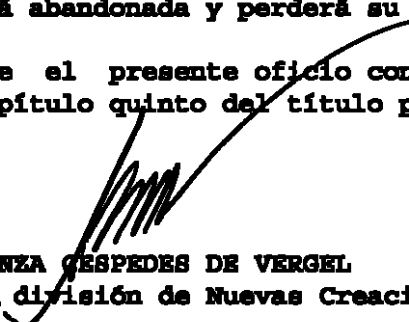
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMONA CESPÉDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 03 MAR. 2006
jramos

000000