

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4
BOGOTÁ 8,

Teléfono: (57-1) 347 3611
8650
4814
7743

Señora Directora
DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-006798-00008-0000

Fecha: 2010-11-02 17:29:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 20

Trámite : 011
Evento : 379
Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 06006798
Asunto : Solicitud de patente para LAWSONIA
INTRACELLULARIS DE ORIGEN EUROPEO Y VACUNAS,
AGENTES DE DIAGNOSTICO Y METODOS DE USO DE LOS
MISMOS
Solicitante : BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC
Fecha de solicitud: 25 de Enero de 2006.

1. Yo, Luz Clemencia de PAÉZ, mayor de edad, domiciliada en Bogotá, D.C., identificada con la Cédula de ciudadanía N° 35.456.344 de Usaquén, obrando como apoderada del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. 8185 notificado por fijación en lista del 25 de Junio de 2010. Mediante memorial radicado el 21 de septiembre de 2010 solicité un plazo de treinta (30) días para dar respuesta a este oficio.

2. Mediante el Oficio No. 8185 se puso en conocimiento del solicitante el informe del examen de fondo que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Atiendo a las observaciones de la siguiente manera:

3. De la solicitud de patente:

Su Despacho enuncia:

- "El capítulo reivindicatorio presenta una serie de expresiones y términos por los cuales se define de forma imprecisa la materia además de restar concisión al capítulo reivindicatorio, por ejemplo "cantidad farmacéuticamente eficaz", "material antigénico", "matar dichas bacterias cultivadas para preparar una vacuna que contiene Lawsonia intracellularis muerta", "aproximadamente" (reivindicación 13, 21, 24)".
- "Las reivindicaciones 1 y 2 enseñan una cepa clínica virulenta y avirulenta respectivamente, las cuales presentan todas las características de las cepas depositadas en la ATCC PTA- 4927 y PTA-4926".

CAVELIER

ABOGADOS

- "Este despacho considera que la materia descrita en dichas reivindicaciones no es una invención debido a que dichas cepas fueron aisladas de su entorno natural a partir de cerdos o de otros animales infectados y su atenuación es dado espontáneamente por las mismas bacterias gracias a pases continuos in Vitro, durante un cierto tiempo. Por esta razón, las características son presentadas por *Lawsonia intracellularis* aislado de la naturaleza, corresponderían a las encontradas en las cepas reivindicadas".
- "Las reivindicaciones 9 y 10 implican un método para estimular el sistema inmune en un animal, y de esta forma inmunizarlo. Dado que el método contempla el tratamiento animal, esta oficina es de la opinión que las reivindicaciones mencionadas se encuentran dentro de la excepción a la patentabilidad y no pueden ser consideradas patentables".

Con respecto a lo señalado por su Despacho, mi representada desea señalar lo siguiente:

Con el fin de atender las anteriores observaciones y de acuerdo al artículo 34 de la Decisión 486, se presenta un nuevo capítulo reivindicatorio como sustituto del anteriormente presentado. De tal manera que, las objeciones formuladas a este respecto quedan superadas respectivamente con las modificaciones realizadas de la siguiente manera:

- Se ha revisado la redacción del nuevo pliego reivindicatorio con el fin de hacer claridad sobre la materia que se solicita proteger y sobre el alcance de la misma, teniendo en cuenta las sugerencias del Señor Examinador.
- En particular, el pliego reivindicatorio se ha redactado nuevamente de tal forma que ahora se refiere a un método para elaborar una vacuna para inducir una respuesta inmune ante bacterias de *Lawsonia intracellularis* en un animal.
- Adicionalmente, se pone de presente que de acuerdo con las sugerencias del Señor Examinador, las reivindicaciones relacionadas con la cepa clínica virulenta de *Lawsonia intracellularis* no han sido incluidas en el nuevo pliego reivindicatorio.
- Asimismo, la expresión "aproximadamente" ha sido eliminada del nuevo pliego reivindicatorio, con el fin de definir inequívocamente los rangos de concentración de oxígeno.
- De igual manera, las expresiones "cantidad farmacéuticamente eficaz", "material antigénico", "matar dichas bacterias cultivadas para preparar una vacuna que contiene *Lawsonia intracellularis* muerta" han sido eliminadas del nuevo pliego

reivindicatorio, de acuerdo con las sugerencias del Señor Examinador.

- Finalmente, la materia de invención anteriormente revelada en las antiguas reivindicaciones 1, 2, 9, 10 y 28 no ha sido incluida en el nuevo pliego reivindicatorio.

Así entonces, con las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio, es claro que quedan subsanadas las objeciones que por claridad hizo su Despacho, ya que ahora dicho pliego se refiere a un método para elaborar una vacuna para inducir una respuesta inmune ante bacterias de *Lawsonia intracellularis* en un animal, el cual se encuentra definido de manera clara y completa por las etapas esenciales y se encuentra redactado en los términos sugeridos por su Despacho y de acuerdo con las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486.

Sin embargo, en el evento que el Despacho considere que una modificación adicional sea necesaria, respetuosamente le solicito hacer uso de la facultad que le otorga el artículo 45 (inciso 2) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina a efecto de requerir nuevamente de nuestra parte cualquier complementación o aclaración a este respecto, en cuyo caso agradeceríamos que se nos indicara el sentido en que se sugiere hacer dicha corrección.

Con respecto a la inclusión de los certificados de depósito del microorganismo *Lawsonia intracellularis* ATCC PTA-4927 y ATCC PTA-4926, presento junto con el presente memorial dichos certificados, cumpliendo así con el requisito de claridad de acuerdo con el artículo 28 de la Decisión 486.

4. Nivel inventivo.

Su Despacho concluye que el nivel inventivo de la presente solicitud de patente se ve afectado por el documento US 5.885.823 (D1). Su Despacho enuncia:

- "La única diferencia con D1 es que esta solicitud que era proporcionar compuestos inmunológicos de *Lawsonia intracellularis* se había resuelto previamente mediante el mismo tipo de componentes activos ya conocidos. Por esta razón se considera que las sustituciones de aislamientos de las cepas formuladas en D1, tales como los reivindicados, son evidentes para una persona medianamente versada en la materia.

Con respecto a lo señalado por su Despacho mi representada desea señalar lo siguiente:

"Artículo 18.- Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica"

Ahora bien, el Manual para el Examen de Solicitudes de Patentes de invención en las Oficinas de Propiedad Industrial de los Países de la Comunidad Andina con respecto a la evaluación del nivel inventivo indica: "La pregunta a contestar es si teniendo en cuenta el estado de la técnica en su conjunto existe alguna indicación que lleve a la persona versada en la materia a modificar o adaptar el estado de la técnica más cercano para resolver el problema técnico, de tal forma que llegue a un resultado que estuviera incluido en el tenor de la(s) reivindicación(es)". (Negrita fuera del texto).

La obligatoriedad de este Manual no reside en su fuerza normativa intrínseca sino en que el mismo es mencionado por el Tribunal de Justicia del Acuerdo de Cartagena en reiterada jurisprudencia cuando interpreta estas normas de la Decisión 486 y por ende, cuando establece cómo debe adelantarse el estudio de nivel inventivo de una invención.

Por lo tanto, teniendo en cuenta el carácter vinculante que tienen las interpretaciones prejudiciales del Tribunal para el Consejo de Estado y el hecho de que éste último revisa la legalidad de las decisiones adoptadas por su Despacho, consideramos que dicho Manual si resulta relevante para el estudio del nivel inventivo de la presente invención.

Así entonces, es posible concluir que para ser pertinentes en la evaluación de nivel inventivo de la presente invención, los documentos citados deberían revelar sugerencias y enseñanzas claras para el técnico en la materia que lo lleven a obtenerla. Para este fin el Señor Examinador debe examinar si, de conformidad con dichos documentos (el estado de la técnica más próximo), una persona versada en la materia habría o no propuesto las características técnicas que distinguen la invención reivindicada y que permiten alcanzar los resultados obtenidos por dicha invención.

Para los anteriores efectos, el Examinador al realizar el examen de nivel inventivo debe verificar las enseñanzas del arte previo sin adoptar la posición de un inventor que se preguntaría cómo solucionar el problema técnico en cuestión. Lo anterior, por cuanto si se adopta la posición del inventor y se tiene conocimiento tanto del arte previo como de la forma como efectivamente se solucionó el problema técnico, la invención en todos los casos le resultará obvia y evidente.

De conformidad con lo anterior, se expone a continuación el por qué la presente invención posee nivel inventivo frente al documento D1. Veamos:

Con las modificaciones realizadas al nuevo pliego reivindicatorio se debe tener por superada la objeción formulada a este respecto, por las siguientes razones:

La presente solicitud de patente se refiere a la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con el n° PTA-4927 y a la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con

CAVELIER

ABOGADOS

el n° PTA-4926 de origen Europeo, las cuales se diferencian claramente de las cepa revelada en D1 toda vez que la cepa ATCC PTA-55672 allí revelada es de origen Americano. En particular, en el ejemplo 1 de D1 se menciona el origen de todas las muestras a partir de las cuales se aísla la cepa de *Lawsonia intracellularis*: la muestra N24912 se obtuvo de un rebaño de una granja en Iowa, la muestra N72994 de una segunda camada de un año y medio en Minnesota, la muestra N101494 de un cerdo de 12 semanas de edad en Indiana. Asimismo, en el ejemplo 2 se describe el uso de las muestras intestinales del ejemplo 1 para hacer crecer la *Lawsonia intracellularis* en cultivos de suspensión. De modo que todas las cepas reveladas en D1 son de origen Americano.

A este respecto, se aclara a su Despacho que las cepas de *Lawsonia intracellularis* se diferencian de las cepas de origen Americano en las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) contra agentes antimicrobianos. Para sustentar lo anterior, se presenta anexo al presente memorial el documento "In vitro antimicrobial activity against 19 North American and European *Lawsonia intracellularis* isolates" (Wattanaphansak et al. Vet Microbiol. 2009 134(3-4):305-10) en el cual se divulga que a partir de los estudios realizados se observó que las cepas de origen Americano presentaban mayores MIC intracelulares y extracelulares que las cepas Europeas (Ver página 309, columna 1).

De otro lado, se pone de presente que D1 revela una vacuna, llamada Isi-1, la cual comprende una cepa de *Lawsonia intracellularis* ATCC con número de acceso 55783. Sin embargo, a diferencia de las vacunas acá reivindicadas, la vacuna descrita en D1 causa la evacuación de heces en el día 14 después de la vacunación en células de cultivo.

Ahora bien, D1 no enseña ni sugiere que al emplear cepas de origen Europeo se obtendrían vacunas que no causarían la evacuación de heces en el día 14. Asimismo, toda vez que D1 no muestra datos experimentales de vacunas empleando cepas de origen Europeo, una persona versada en la materia no se vería motivada a emplear específicamente cepas de *Lawsonia intracellularis* de origen Europeo con el fin de obtener una reducción en la virulencia y una mayor respuesta inmune.

Así entonces, teniendo en cuenta que el documento D1 no anticipa emplear cepas de *Lawsonia intracellularis* de origen Europeo en vacunas en lugar de cepas de origen Americano para inducir una respuesta inmune ante bacterias de *Lawsonia intracellularis* en un animal y/o las mejoras obtenidas con dicha modificación, es claro que a partir de dicho documento no era posible para un técnico medio obtener de manera obvia y/o evidente la materia de invención revelada en la presente solicitud. Lo anterior si se tiene en cuenta que para el estudio de nivel inventivo el Examinador no puede adoptar la posición de un inventor y que además no puede partir de la solución dada sino simplemente de lo que expresamente revelen el o los documentos más cercanos del estado del arte, que en el presente caso es D1.

De otro lado, con respecto a la afirmación del Señor Examinador que las cepas de *Lawsonia intracellularis* se aíslan fácilmente, deseamos

CAVELIER

ABOGADOS

poner de presente que no compartimos la opinión del Señor Examinador por cuanto el cultivo de las mismas es bastante difícil. De hecho, se deben cultivar enterocitos para soportar el crecimiento y por tanto, pocas cepas han sido aisladas in vitro (Ver página 305, columna 2 del documento Wattanaphansak).

5. Así entonces, puesto que con los argumentos presentados a favor de la patentabilidad de la presente solicitud de patente se han atendido a cabalidad las objeciones realizadas por su Despacho en su Examen de fondo, respetuosamente solicito que el Despacho tenga por cumplidos tales requisitos y proceda con la concesión de la patente.

6. Anexos.

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 21 reivindicaciones.
- Formulario de modificaciones.
- Recibo por concepto de 11 reivindicaciones adicionales a la décima reivindicación.
- Documento: "In vitro antimicrobial activity against 19 North American and European Lawsonia intracellularis isolates". Wattanaphansak et al. Vet Microbiol. 2009 134(3-4):305-10.
- Certificado de depósito del microorganismo Lawsonia intracellularis ATCC PTA-4927 y ATCC PTA-4926.

Señora Directora,

LUZ CLEMENCIA DE PAÉZ

C.C. N° 35.456.344

T.P.A. No. 23.555

COLO-15149-841-001-9

MGM\MGM\ID-181433\WPC15149

No. M-2010-181433\MGM



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1

SOLICITUD DE:



Corrección de Error Material



Modificación a una solicitud

2

SOLICITANTE

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
Estados Unidos de América

Teléfono: 546 09 70 **Fax:** 249 40 70
E-mail: clientes@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

3

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 35.456.344 T. P. 23.555

4

Número de expediente: 06.006.798

5

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 21 reivindicaciones con el fin de superar las objeciones hechas por Su Despacho a la presente solicitud de patente y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.

6

Comprobante de pago No. 10-89,853 **Fecha:** 25 de octubre de 2010

Comprobante de pago No. 10-89,958 **Fecha:** 25 de octubre de 2010

Comprobante de pago No. 10-89,977 **Fecha:** 25 de octubre de 2010

Anexos

7

☐

Comprobante de pago de la tasa por \$114.000, por concepto de modificaciones.

☒

Comprobante de pago por 11 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$286.000.

☐

Poderes, si fuere el caso

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

8

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

FIRMA: *Luz Clemencia de Páez*

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P.A. 23.555

MGM

REIVINDICACIONES.

1. 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 la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con el n° PTA-4927 o la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con el n° PTA-4926 o cualquier otra cepa aislada de *Lawsonia intracellularis* de origen Europeo que no cause la evacuación de heces en el día 14 después de la vacunación en células de cultivo que están en suspensión con una concentración de oxígeno entre 0 a 10 por ciento para cultivar dichas bacterias; y (b) mezclar dichas bacterias cultivadas con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es seleccionado del grupo que consiste de estabilizadores y diluentes.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es agua.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cepa *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con el n° PTA-4926 o cualquier otra cepa aislada de *Lawsonia intracellularis* de origen Europeo que no causa la evacuación de heces en el día 14 después de la vacunación es incubada en el paso (a).
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde los 10^3 TCID₅₀ a 10^6 TCID₅₀ de la cepa *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con el n° PTA-4926 o cualquier otra cepa aislada de *Lawsonia intracellularis* de origen Europeo que no causa la evacuación de heces en el día 14 después de la vacunación, es mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde adicionalmente al menos un antígeno seleccionado de los siguientes patógenos: *Salmonella* spp, *Erysipelothrix* spp, *Haemophilus* spp, *Mycoplasma* spp, *Leptospira* spp, *Clostridium* spp, *Streptococcus* spp, *Brachyspira* spp, circovirus, síndrome Reproductivo y Respiratorio del porcino (PRRS), virus de swine influenza es mezclado con el vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde adicionalmente al menos un antígeno seleccionado de los siguientes patógenos: *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix* spp, virus transmisible de gastro-enteritis (TGE), *Escherichia coli*, *Clostridium* spp y *Brachyspira* spp, es mezclado con el vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde adicionalmente al menos un antígeno seleccionado de los siguientes patógenos: *Salmonella choleraesuis* y *Erysipelothrix* spp es mezclado con el vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde adicionalmente al menos un antígeno seleccionado de los siguientes patógenos: *Clostridium* spp, virus de influenza equina (EIV), virus de herpes equino (EHV), alfavirus, virus de West Nile, es mezclado con el vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Un método para cultivar *Lawsonia intracellularis* que comprende:
 - (a) infectar células cultivadas con un inóculo que comprende la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con el n° PTA-4927,
 - (b) incubar dichas células infectadas con una concentración de oxígeno entre 0 a 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*.
11. El método según la reivindicación 10 en el que la concentración de oxígeno está en el intervalo de 0 por ciento hasta el 8 por ciento.
 12. El método según la reivindicación 11 en el que la concentración de oxígeno está en el intervalo entre 0 por ciento hasta 3 por ciento.
 13. El método según la reivindicación 10 en el que dicha incubación se produce con una concentración de dióxido de carbono en el intervalo de 6 por ciento hasta 10 por ciento.
 14. El método según la reivindicación 10 en el que dichas células cultivadas se eligen del grupo formado por: células HEp-2, McCoy e IEC-18.
 15. El método según la reivindicación 14 en el que dichas células IEC-18 se cultivan en microvehículos.
 16. El método según la reivindicación 10 en el que las células infectadas se incuban según la etapa (c) durante un periodo de 2 hasta 10 días.
 17. El método según la reivindicación 10 que comprende además una etapa (d) de liofilización de dicha bacteria.
 18. El método según la reivindicación 17 en el que dicha liofilización comprende una etapa primaria de secado a una temperatura entre -30°C hasta -5°C durante 120 a 1000 minutos y una etapa secundaria de secado a una temperatura de 27 +/- 5°C durante 330 a 1120 minutos.
 19. Una cepa clínica atenuada liofilizada producida mediante el método según la reivindicación 17.
 20. Un método para el diagnóstico de la enteropatía proliferativa porcina que comprende realizar un ensayo para detectar anticuerpos contra *Lawsonia intracellularis* en una muestra animal no humana de un sujeto que comprende:
 - (a) poner en contacto una muestra del sujeto con la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con el n° PTA-4927 o la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con el n° PTA-4926 o cualquier otra cepa aislada de *Lawsonia intracellularis* de origen Europeo que no cause la evacuación de heces en el día 14 después de la vacunación en células de cultivo para formar un complejo antígeno-anticuerpo; y
 - (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.
 21. El método según la reivindicación 20 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.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic



In vitro antimicrobial activity against 10 North American and European *Lawsonia intracellularis* isolates

Suphot Wattanaphansak^a, Randall S. Singer^{a,b}, Connie J. Gebhart^{a,*}

^a Department of Veterinary and Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, 205 Veterinary Science Building, 1971 Commonwealth Ave, St. Paul, MN 55108, United States

^b Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 June 2008

Received in revised form 7 August 2008

Accepted 14 August 2008

Keywords:

Proliferative enteropathy

Lawsonia intracellularis

MIC

Antimicrobial activity

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the *in vitro* minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobials against 10 isolates of *Lawsonia intracellularis*, the etiological agent of proliferative enteropathy (PE). Antimicrobials tested included carbadox, chlortetracycline, lincomycin, tiamulin, tylosin and valnemulin. The MIC of each antimicrobial against *L. intracellularis* was determined using a tissue culture system and was identified as the lowest concentration that inhibited 99% of *L. intracellularis* growth, as compared to the antimicrobial-free control. Each antimicrobial concentration was evaluated for both intracellular and extracellular activity against *L. intracellularis*, an obligately intracellular bacterium. When tested for intracellular activity, carbadox, tiamulin, and valnemulin were the most active antimicrobials with MICs of ≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Tylosin (MICs ranging from 0.25 to 32 $\mu\text{g/ml}$) and chlortetracycline (MICs ranging from 0.125 to 64 $\mu\text{g/ml}$) showed intermediate activities and lincomycin (MICs ranging from 8 to >128 $\mu\text{g/ml}$) showed the least activity. When tested for extracellular activity, valnemulin (MICs ranging from 0.125 to 4 $\mu\text{g/ml}$) was the most active against most *L. intracellularis* isolates. Chlortetracycline (MICs ranging from 16 to 64 $\mu\text{g/ml}$), tylosin (MICs ranging from 1 to >128 $\mu\text{g/ml}$), and tiamulin (MICs ranging from 1 to 32 $\mu\text{g/ml}$) showed intermediate activities. Uncomycin (MICs ranging from 32 to >128 $\mu\text{g/ml}$) showed the least activity. Our *in vitro* results showed that each *L. intracellularis* isolate had a different antimicrobial sensitivity pattern and these data can be utilized as an *in vitro* guideline for the further antimicrobial evaluation of field *L. intracellularis* isolates.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Proliferative enteropathy (PE) is one of the most prevalent enteric bacterial diseases in grower and finisher pigs. The etiological agent of this disease is an obligate intracellular, Gram-negative bacterium named *Lawsonia intracellularis*. The treatment of a PE outbreak on a pig farm often involves antimicrobial therapy. However, since little information is available on *in vitro* antimicrobial sensitiv-

ities against *L. intracellularis* infection, the selection of an appropriate antimicrobial is difficult. The paucity of information is due to the fact that standard antimicrobial assays are not applicable to evaluate the antimicrobial activities of most intracellular organisms since these bacteria only propagate themselves inside the host cell. Therefore, most *in vitro* studies of antimicrobial activities against obligate intracellular bacteria are undertaken through a complicated cell culture system (McOrist et al., 1995b; Gnarp et al., 1996; Ives et al., 2000; Horowitz et al., 2001). Furthermore, few strains of *L. intracellularis* have been successfully isolated and maintained *in vitro*. Of these, only three European isolates have been tested in

* Corresponding author. Tel.: +1 612 624 3444; fax: +1 612 625 5203.
E-mail address: gebha001@umn.edu (C.J. Gebhart).

vitro for antimicrobial susceptibilities using a tissue culture system (McOrist and Gebhart, 1995; McOrist et al., 1995b).

It has been a decade since these antimicrobial activity studies of *L. intracellularis* have been reported, and no further *in vitro* studies have been published to update or expand upon the limited data existing for the antibiotic sensitivity of *L. intracellularis*. Therefore, the objective of this study was to determine the *in vitro* antimicrobial sensitivities of 10 isolates of *L. intracellularis* obtained from both North America and Europe against six antimicrobial compounds that have been used for the treatment and control of PE in pigs.

2. Materials and methods

2.1. Source and preparation of antimicrobials

The following antimicrobial agents were purchased as pure chemicals: carbadox, chlortetracycline hydrochloride, lincomycin hydrochloride and tylosin tartrate (Sigma–Aldrich, Missouri, United States). Tiamulin hydrogen fumarate and valnemulin hydrochloride were supplied as pure chemicals from Novartis Animal Health (Basel, Switzerland). The stock solutions of all antimicrobial compounds were prepared to a final concentration of 2560 µg/ml. Each antimicrobial solution was sterilized by filtration using 0.2 µm-pore size filters. The stock solution of carbadox was first dissolved with 0.1N NaOH and then was diluted in sterile distilled de-ionized water. The stock solutions of the other compounds were dissolved directly in sterile distilled de-ionized water and all were kept at –20 °C until use. Once the antimicrobials were thawed, they were used and kept refrigerated for up to 3 days. A series of two-fold dilutions were made from the stock solutions, and these were then diluted 1:10 with culture medium to resultant final concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, and 128 µg/ml. Each concentration of antimicrobial was tested in triplicate.

2.2. Bacterial strains and preparation

A total of 10 *L. intracellularis* field strains collected between 1983 and 2006 from infected pigs from North America and Europe were tested. Six *L. intracellularis* strains used were from North America: PHE/MN1-00, VPB4, KKumn04, NWumn05, DBumn06 and 47216-06. Three *L. intracellularis* strains used were from the United Kingdom: LR189/5/83, 963/93 and 916/91; and one *L. intracellularis* strain used was from Denmark: D15540. All strains were stored at –72 °C until use.

All strains of *L. intracellularis* were grown in murine fibroblast-like McCoy cells (CRL 1696, American Type Culture Collection, Virginia, United States) and were maintained in a cell culture system as described previously (Guedes and Gebhart, 2003; Wattanaphansak et al., 2005).

2.3. Antimicrobial sensitivity testing

A tissue culture system was modified from a previous study (McOrist et al., 1995b) to determine the minimum

inhibitory concentration (MIC) of each antimicrobial against *L. intracellularis*. Briefly, the frozen bacteria were thawed and grown in cell culture for at least 3 continuous passages to achieve 100% infection of the McCoy cell monolayer. All *L. intracellularis* isolates were tested twice and each replicate was prepared independently. Each strain of *L. intracellularis* was harvested from the monolayer as described earlier (Guedes and Gebhart, 2003; Wattanaphansak et al., 2005), diluted with 100 ml culture medium, and 100 µl of this bacterial suspension was inoculated onto one-day-old McCoy cells in 96-well tissue culture plates (Nalge Nunc International, New York, United States).

In this study, the MICs were expressed for both intracellular and extracellular activities. Intracellular MIC testing was conducted in order to measure the effect of antimicrobials on *L. intracellularis* after the bacteria had infected the enterocytes. For intracellular testing, a previously published assay (McOrist et al., 1995b) was used with minor changes to the cell line and the bacterial concentration. Briefly, 100 µl of bacterial suspension containing approximately 10^6 – 10^7 *L. intracellularis* organisms/ml, a quantification method described by Guedes and Gebhart (2003), was inoculated onto one-day-old McCoy cells 24 h before exposure to the antimicrobials. This permitted sufficient time for *L. intracellularis* to penetrate the host cells prior to antimicrobial treatment. After incubation, the bacterial suspension was removed and replaced with 100 µl of fresh culture medium containing various concentrations of antimicrobials at 1, 2, and 3 days post inoculation, followed by fresh culture media on day 4 with no antimicrobial as previously described (McOrist et al., 1995b).

The extracellular MIC testing was designed to mimic the effect of antimicrobial on *L. intracellularis* when the bacterium is free in the gut lumen before infecting the intestinal cells. For extracellular testing, we followed a previously described approach (McOrist et al., 1995b) with minor changes. Briefly, a series of two-fold dilutions of stock antimicrobials were added to culture medium containing *L. intracellularis*. The suspension was incubated at 37 °C in 8.0% oxygen, 8.8% carbon dioxide, and 83.2% nitrogen atmosphere for 2 h without mixing, allowing direct exposure of the bacteria to the antimicrobials. After incubation, 100 µl of the bacterial suspension was transferred to infect one-day-old McCoy cells. The medium was removed after 24 h incubation and replaced with 100 µl of new culture medium without any antimicrobials for 3 consecutive days. Following the media removal each day, the infected plates were exposed to hydrogen gas and the plates were then kept at 37 °C for 5 days in an incubator with 8.0% oxygen, 8.8% carbon dioxide and 83.2% nitrogen as the atmosphere.

After 5 days incubation, supernatant from the infected plates was removed and the cell culture monolayer was fixed with 100 µl of cold 50% acetone and 50% methanol for 1 min. To assess the inhibitory effect of each antimicrobial on *L. intracellularis* proliferation, the infected plates were stained using a modified immunoperoxidase monolayer assay staining method (Guedes et al., 2002) with primary antibody from a rabbit hyperimmunized

cellular MIC endpoints for six antimicrobial agents against 10 *L. intracellularis* isolates, six obtained from North America and four from Europe, measured by using tissue culture

No. of passage	Antimicrobial agents (µg/ml)											
	Carbamazepine		Chlortetracycline		Tylosin		Gentamicin		Trimethoprim		Valnemulin	
	Intra MIC	Extra MIC	Intra MIC	Extra MIC	Intra MIC	Extra MIC	Intra MIC	Extra MIC	Intra MIC	Extra MIC	Intra MIC	Extra MIC
169	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
170	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
185	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
186	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
17	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
18	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
21	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
22	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
8	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
9	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
7	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
18	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
19	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
20	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
14	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
18	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
15	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
16	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
19	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
17	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125

rested twice and the bacteria were prepared independently for each replicate. USA: the United States of America; Den: Denmark; UK: United Kingdom.

as the lowest antimicrobial concentration that inhibited 99% of *L. intracellularis* proliferation, compared to antimicrobial-free control.

S. Weikumpransak et al. / Veterinary Microbiology 134 (2009) 305–310

with *L. intracellularis* antigen. The *L. intracellularis* proliferation was evaluated by counting the number of heavily infected cells (HIC) (McOrist et al., 1995b) in each well using an inverted microscope (Olympus, Tokyo, Japan) with a 20× objective lens. Cells were considered to be HIC if the number of intracellular *L. intracellularis* had proliferated to greater than 30 bacteria per cell. The number of HICs in each well was then expressed as a percentage compared to the average HIC of the control wells. The intracellular and extracellular MIC endpoints for each antimicrobial in this study were defined as the lowest antimicrobial concentration that inhibited 99% of *L. intracellularis* proliferation in the McCoy cells after 5 days of incubation (McOrist et al., 1995b). These inhibitions were indicated by the percentage of HIC of each antimicrobial concentration as compared to the antimicrobial-free control.

2.4. Data analysis

The MIC endpoints of each antimicrobial were determined using the median value from a set of triplicate wells. MIC assays were performed in duplicate from independent bacterial preparations, and the duplicate MIC endpoints were expressed for each antimicrobial for each isolate. When the percentage of HIC of *L. intracellularis* in the antimicrobial-free control was less than 50%, the MIC tests for that *L. intracellularis* strain were repeated.

3. Results

The intracellular and extracellular MIC values for antimicrobials used against the 10 *L. intracellularis* isolates in the present study are shown in Table 1. The concentrations of *L. intracellularis* inocula were between 1.2×10^6 and 3.4×10^7 *L. intracellularis* organisms/ml, and each isolate had a range of less than one log between the two replicates. For *L. intracellularis* isolates from North America ($n = 6$), the intracellular activity results showed that carbadox, tiamulin, and valnemulin displayed the highest activity with MICs from ≤ 0.5 µg/ml. Chlortetracycline and tylosin showed moderate activity against *L. intracellularis* with MIC ranges from 0.125 to 64 µg/ml and 0.25 to 32 µg/ml, respectively. Lincomycin showed the lowest activity against most *L. intracellularis* isolates with an MIC range from 16 to >128 µg/ml. The extracellular activity results showed that only valnemulin had high activity against *L. intracellularis* with MICs ranging from 0.125 to 4 µg/ml. Antibiotics with moderate activities against *L. intracellularis* included carbadox with an MIC range from 4 to 32 µg/ml, chlortetracycline with an MIC range from 32 to 64 µg/ml, tiamulin with an MIC range from 1 to 32 µg/ml, and tylosin with an MIC range from 1 to >128 µg/ml. All *L. intracellularis* isolates from North America had the lowest extracellular activity to lincomycin with MICs from >128 µg/ml.

MIC results for the European isolates ($n = 4$) were similar to the North American isolates in that, for the intracellular MICs, carbadox, tiamulin, and valnemulin had the highest activity against *L. intracellularis* with MICs of 0.125 µg/ml. Antimicrobials with moderate activities

included chlortetracycline with an MIC range of 0.25–16 µg/ml, lincomycin with an MIC range of 8–64 µg/ml, and tylosin with an MIC range of 0.5–2 µg/ml. The extracellular activity results showed that valnemulin had the highest activity against *L. intracellularis*; all isolates had MICs of ≤ 0.25 µg/ml. The antimicrobials that had moderate activity were carbadox with an MIC range of 1–4 µg/ml, chlortetracycline with an MIC range of 16–64 µg/ml, tiamulin with an MIC range of 1–4 µg/ml, and tylosin with an MIC range of 2–16 µg/ml. The antimicrobial that showed the least activity against *L. intracellularis* was lincomycin with MICs of 32– >128 µg/ml.

4. Discussion

Although methodologies for determining antimicrobial sensitivity of intracellular organisms have been developed, the methods and interpretations of their results have not been standardized or uniformly accepted. In this study, the practicality of assessing the *in vitro* antimicrobial activity against *L. intracellularis* was demonstrated using a tissue culture system, which was modified from a previous study (McOrist et al., 1995b).

The MIC results in the earlier studies testing various antimicrobials against *L. intracellularis* strains used only three strains from the United Kingdom. This was due to the limited number of strains available and the difficulty of the laboratory techniques for maintaining and culturing *L. intracellularis* (McOrist and Gebhart, 1995; McOrist et al., 1995b). One European isolate (916/91 or NCTC 12657) that was tested in the previous study (McOrist et al., 1995b) was also retested for antimicrobial activity in this study. Unfortunately, individual MIC endpoints were not shown for individual isolates in the previous study. Therefore, a direct comparison of the MIC endpoints of the current study to the earlier study is difficult to perform. With the exception of tylosin and tiamulin (intracellular MIC), the MIC results of the tested antimicrobials from the earlier study (McOrist et al., 1995b) were always within the range of a two-fold dilution compared to our results. In those studies and this current study, the extracellular and intracellular MICs for *L. intracellularis* were determined in an effort to mimic *L. intracellularis* infections in which the bacteria would be exposed to antimicrobials before and after invasion into intestinal cells. The results of the intracellular and extracellular MICs obtained from two different batches of each *L. intracellularis* strain demonstrated that the assay was reproducible. The median MIC from the two replicates was always within a two-fold dilution, determined by assessing whether any duplicate was more than a two-fold dilution away from the log 2 mean MIC (Table 1).

Currently there are no antimicrobial MIC breakpoints for intracellular organisms using a tissue culture system; therefore, interpretations of the sensitivity data are complicated. For various reasons, these data should only be used as a guide to determine which antimicrobials could be effective in treating *L. intracellularis* infections *in vivo*. First, it is unknown how the *in vitro* assay compares to *in vivo* *L. intracellularis* infections. Second, it is unknown what concentration of each antimicrobial can be attained

at the site of *L. intracellularis* infection. This concentration is critical in determining whether a specific isolate is susceptible or resistant. Finally, it is unknown whether the antimicrobial would have the greatest effect on *L. intracellularis* while the bacteria are extracellular or intracellular. The data can be used, however, to predict the utility of the antibiotic. If there is no diversity in activity levels and yet the MIC is very low, such as the observed variation in carbadox intracellular MIC values, then this antibiotic might function very well. If there is a large range of MICs, such as was observed with chlortetracycline intracellular MIC levels, then some *L. intracellularis* isolates may have less sensitivity to that antibiotic.

According to our results, extracellular MICs were higher than the intracellular MICs for all antimicrobials, while the previous report showed that both of them were similar (McOrist et al., 1995b). One explanation for this difference may be the effect of contact time with the antimicrobials. The extracellular activity assay was designed to have less contact time than the intracellular activity assay (i.e., one day compared to three consecutive days). These differing contact times were performed due to the fact that *L. intracellularis* can penetrate the cells within 24 h (Lawson et al., 1993; McOrist et al., 1995a). By definition, an extracellular MIC is the effect of the antimicrobial on *L. intracellularis* before the bacteria enter the cells and, therefore, only one day of exposure to the antimicrobial can be used to determine the extracellular MIC. A fraction of the *L. intracellularis* could have survived the single extracellular treatment and subsequently returned to active phase upon the disappearance of the antimicrobials. This could suggest that a single-dose antimicrobial treatment is insufficient to inhibit the growth of *L. intracellularis*. A potential explanation for the lower intracellular MIC is the accumulation of antimicrobial inside the cells, making the intracellular concentration much higher than the extracellular concentration. The increased intracellular concentrations could enhance the chemotherapeutic activity of antimicrobials against intracellular bacteria. In contrast to the macrolides, β -lactams, aminoglycosides and lincomycin are poorly accumulated intracellularly (Carrin et al., 2002, 2003). Although this study did not determine the antimicrobial concentration inside the cells, the intracellular MIC results seemed to show that most of the antimicrobials tested can penetrate and bind to internalized *L. intracellularis* to exert their chemotherapeutic action.

Interestingly, one observation from this study was that the North American *L. intracellularis* isolates tended to have higher intracellular and extracellular MICs than the European *L. intracellularis* isolates. Additional *L. intracellularis* isolates from North America and Europe will need to be tested before drawing any conclusions about geographic differences and antimicrobial sensitivities changing over time. This study evaluated most of the *L. intracellularis* isolates currently available globally and obtained from 2 different continents, including new clinical (low passage) and well-established (high passage) *L. intracellularis* isolates. This was important because

intracellular bacteria maintained under a tissue culture system for an extended period of time have the potential to develop genomic mutations that could impact their antimicrobial sensitivities (Drancourt and Raoult, 1993). Therefore, these results represent the most comprehensive *L. intracellularis* MIC study to date. Further *in vivo* studies should be conducted to confirm the antimicrobial efficacies.

5. Conclusion

Our *in vitro* data greatly expand the antimicrobial MIC information available for *L. intracellularis*. Based on our *in vitro* results, it is clear that *L. intracellularis* isolates have a diversity of antimicrobial sensitivity patterns. Because it is unlikely that *L. intracellularis* will be isolated and tested during a PE outbreak, our data can serve as an *in vitro* guideline for the range of antimicrobial responses of *L. intracellularis*. Based on this guideline, we predict carbadox, tiamulin and valnemulin to be the most active antimicrobials, chlortetracycline and tylosin to be intermediate active, and lincomycin to be the least active antimicrobial against *L. intracellularis*.

Acknowledgements

This study was supported in part by a grant from Novartis Animal Health Inc. The authors would like to thank Dr. Dean Dau for critical reading and comments on the manuscript, Dana Beckler and Keith Kinsley for providing two *L. intracellularis* isolates and Benjawan Wijarn, Molly Freese, and Beth Thompson for excellent technical assistance.

References

- Carya, S., Bambeke, F.V., Mingeot-Leclercq, M.P., Tulkens, P.M., 2002. Comparative intracellular (THP-1 Macrophage) and extracellular activities of β -lactams, azithromycin, gentamicin, and fluoroquinolones against *Listeria monocytogenes* at clinically relevant concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2095–2103.
- Carrin, S., Chanteux, H., Serai, C., Mingeot-Leclercq, M.P., Bambeke, F.V., Tulkens, P.M., 2003. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 17, 615–634.
- Drancourt, M., Raoult, D., 1993. Methodology of antibiotics testing for intracellular pathogens. In: Raoult, D. (Ed.), *Antimicrobial Agents and Intracellular Pathogens*. CRC Press, Boca Raton, pp. 71–85.
- Gnarpe, J., Eriksson, K., Gnarpe, H., 1996. *In vitro* activities of azithromycin and doxycycline against 15 isolates of *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1843–1845.
- Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., Deen, J., Winkelman, N.L., 2002. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 528–530.
- Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., 2003. Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Vet. Microbiol.* 91, 135–145.
- Horowitz, H.W., Hsieh, Y.C., Aguero-rosenfeld, M.E., Kalantarpour, P., Chowdhury, I., Wommser, G.P., Wu, J.M., 2001. Antimicrobial susceptibility of *Ehrlichia phagocytophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 786–788.
- Ives, T.J., Marston, E.L., Regnery, R.L., Butts, J.D., Majerus, T.C., 2000. *In vitro* susceptibilities of *Rickettsia* and *Bartonella* spp. to 14-hydroxy-clarithromycin as determined by immunofluorescent antibody analysis of infected Vero cell monolayers. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 305–310.
- Lawson, G.H.K., McOrist, S., Jasni, S., Mackie, R.A., 1993. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance *in vitro*. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1136–1142.

McOrist, S., Gebhart, C.J., 1995. In vitro testing of antimicrobial agents for proliferative enteropathy (ileitis). Swine Health Prod. 3, 146–148.

McOrist, S., Jøns, S., Mackie, R.A., Berschneider, H.M., Rowland, A.L., Lawson, G.H.K., 1995a. Entry of the bacterium *Ileal symbiont* intracellularly into cultured enterocytes and its subsequent release. Res. Vet. Sci. 59, 255–260.

McOrist, S., Mackie, R.A., Lawson, G.H.K., 1995b. Antimicrobial susceptibility of *Ileal symbiont* intracellulars isolated from pigs with porcine proliferative enteropathy. J. Clin. Microbiol. 33, 1314–1317.

Watranaphansak, S., Gebhart, C.J., Olin, M., Deen, J., 2005. Measurement of the viability of *Lawsonia intracellularis*. Can. J. Vet. Res. 69, 265–271.

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-3745

The American Type Culture Collection (ATCC) has received your deposit of a culture in connection with the filing of an application for patent. The following information is provided to fulfill requirements.

Name and Address of Depositor:

Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.
Attn: Michael Roof
2501 N. Loop Drive
Suite 1000
Ames, IA 50010

Deposited on Behalf of:

Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.

Date of Receipt of Culture by the ATCC:

January 9, 2003

Scientific Description

Lawsonia intracellularis
Lawsonia intracellularis

Depositor's Reference

B-3093
15540

Patent Deposit Designation

PTA-4926
PTA-4927

The ATCC understands that:

1. The deposit of this culture does not grant ATCC a license, either express or implied, to infringe the patent, and our release of this deposit to others does not grant them a license, either express or implied, to infringe the patent.
2. If this deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term (30 years or 5 years following the most recent request for the deposit).

Prior to the issuance of a U.S. Patent, the ATCC agrees in consideration for a one-time service charge, not to distribute the culture or any information relating thereto or to its deposit except as instructed by the depositor or relevant patent office. After a relevant patent issues, and we are instructed to release the culture, the deposit will be made available for distribution to the public without any restrictions. The ATCC agrees to maintain the deposit for a period of thirty (30) years from deposit date, or at least five (5) years after the most recent request for a sample, whichever is longer.

We will inform you of requests for the culture.

The deposit was tested on April 21, 2004 and found to be viable.

American Type Culture Collection

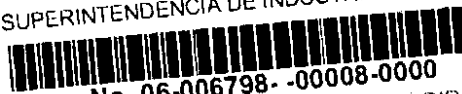
By Maria Harris
Marie Harris
ATCC Patent Depository

Date: May 4, 2004

cc: Mary-Ellen Devlin

Ref: Docket or Case No.: 10/052 PV and 10/053 PV

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-006798-00008-0000

Fecha: 2010-11-02 17:29:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 20

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 89,853
FECHA : OCTUBRE 25 DE 2010

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	146320683	25/10/2010	58,271,000.00

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

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	*** S.DISTINTIVO INSCRIPCION AFECTACI	280,000.00
	TOTAL :	\$ 280,000.00

SON: DOSCIENTOS OCHENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

00015149-241-001-9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-006798- -00008-0000

Fecha: 2010-11-02 17:29:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 20

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 89,958
FECHA : OCTUBRE 25 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	146320683	25/10/2010	58,271,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1,000.00
		TOTAL :	\$ 1,000.00

SON: MIL PESOS

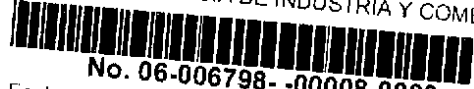
RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO 15149 - 841 - 001 - 9

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-006798- -00008-0000

Fecha: 2010-11-02 17:29:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 20

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 89,977
FECHA : OCTUBRE 25 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	146320683	25/10/2010	58,271,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 5,000.00

SON: CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

6060 15149-841-001-9

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.