

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 556**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2009** **E 09800038 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015** **EP 2318041**

54 Título: **Bacteria Lawsonia intracellularis de un nuevo serotipo, vacuna basada en esa bacteria, anticuerpos adecuados para diagnosticar el nuevo serotipo de Lawsonia intracellularis e hibridomas para producir dichos anticuerpos**

30 Prioridad:

22.07.2008 US 82552 P
13.08.2008 EP 08162299

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2015

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL BV (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

MORSEY, MOHAMAD;
JACOBS, ANTONIUS ARNOLDUS CHRISTIAAN y
SCHRIER, CARLA CHRISTINA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 534 556 T3

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

DESCRIPCIÓN

Bacteria *Lawsonia intracellularis* de un nuevo serotipo, vacuna basada en esa bacteria, anticuerpos adecuados para diagnosticar el nuevo serotipo de *Lawsonia intracellularis* e híbridomas para producir dichos anticuerpos

La presente invención está relacionada con bacterias *Lawsonia intracellularis* de un nuevo serotipo, con vacunas para la protección contra una infección por *Lawsonia intracellularis* basadas en esas nuevas bacterias, con anticuerpos adecuados para diagnosticar el nuevo serotipo de *Lawsonia intracellularis* y con híbridomas para producir dichos anticuerpos.

La enteropatía proliferativa (EP, también denominada enteritis o ileítis) en prácticamente todos los animales (seres humanos, conejos, caballos, perros, zorros, avestruces, hurones, cobayas, etc.), en particular en cerdos, presenta un signo clínico y síndrome patológico con hiperplasia mucosa de las células epiteliales inmaduras de las criptas, principalmente en el íleon terminal. Otros sitios del intestino que pueden estar afectados incluyen el yeyuno, el ciego y el colon. Los cerdos destetados y adultos jóvenes están principalmente afectados con una manifestación clínica típica de pérdida de peso rápida y deshidratación. La enfermedad clínica natural en cerdos se produce en todo el mundo. La enfermedad se asocia consecuentemente con la presencia de bacterias intracelulares curvas, que actualmente se conocen como *Lawsonia intracellularis*. Estas bacterias se identificaron en 1993 como un nuevo género y especie taxonómica, originalmente mencionada como simbionte ileal *intracelular* (International Journal of Systemic Bacteriology, Volumen 43, Nº 3, 533-538, 1993; Gebhart *et al.*). Es una bacteria intracelular obligada, curva, gram-negativa, como describe Gebhart en la referencia anteriormente identificada y McOrist en la misma Publicación, Volumen 45, Nº 4, 820-825, 1995). Desde 1995, las bacterias reciben el nombre general de *Lawsonia intracellularis*.

En general, la vacunación contra *Lawsonia intracellularis* ha mostrado ser una medida rentable para controlar la ileítis y para permitir un buen aprovechamiento del potencial de crecimiento genético del cerdo (Porcine Proliferative Enteropathy Technical manual 3.0, julio de 2006; disponible de Boehringer Ingelheim).

Recientemente, se descubrió que un antígeno dominante es un hidrato de carbono de las células de *Lawsonia intracellularis*, cuyo hidrato de carbono está asociado con la membrana celular externa de estas células (véanse las solicitudes de patente EP 08154764.8 y US 61/046,161 presentadas el 18 de abril de 2008 y cedidas a Intervet International B.V., usadas como solicitudes de prioridad para la solicitud internacional WO2009/144088). Al parecer, una vacuna que está basada en una composición que contiene el hidrato de carbono aislado es capaz de proporcionar una protección adecuada contra una infección por *Lawsonia intracellularis* cuando se compara con las vacunas existentes. De hecho, los anticuerpos monoclonales derivados contra los determinantes antigénicos de este hidrato de carbono son reactivos con todas las cepas públicamente disponibles, tales como las cepas que se usan en las vacunas vivas comercialmente disponibles Enterisol® Ileítis en Europa y en los EE.UU. (cuyas cepas reciben el nombre de BI; UE y BI; EE.UU. respectivamente en el resto de este documento).

El documento WO2005/011731 desvela cepas de *Lawsonia intracellularis* ATCC PTA-4927, también conocidas como "DK 15540" o "BI 15540" o "15540", y ATCC PTA-4926. La bacteria '4927 es la bacteria de tipo silvestre que se usa para obtener la forma '4926 atenuada correspondiente.

El documento WO2005/070958 desvela un aislado de *Lawsonia intracellularis*, capaz de producir proteínas particulares. El documento WO97/20050 describe el aislamiento y uso de bacterias *Lawsonia intracellularis*. El documento WO2006/012949 describe el aislamiento y uso de bacterias *Lawsonia intracellularis*. Boesen *et al.* en Veterinary Microbiology, Volumen 105, Nº 3-4, 25 de febrero de 2005, páginas 199-206 mencionan la cepa BI 15540 de *Lawsonia intracellularis*, también mencionada en el documento WO2005/011731 (anteriormente citado), como ATCC PTA-4927.

El documento WO2007/011993 se refiere a las cepas ATCC PTA-4926 y ATCC 55783 de *Lawsonia intracellularis*.

Ahora se ha descubierto sorprendentemente que existen bacterias *Lawsonia intracellularis* de un nuevo serotipo, cuyas bacterias, en particular con respecto al antígeno de hidrato de carbono dominante, difieren sustancialmente de las bacterias de un serotipo conocido. Se ha mostrado que este nuevo serotipo está presente en cerdos procedentes de los EE.UU. y en cerdos y caballos procedentes de Holanda. Una bacteria del nuevo serotipo se caracteriza por que es reactiva con un anticuerpo monoclonal INT-LIC-02-02 tal como se produce mediante el híbridoma INT-LIC-02-02 depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París, Francia, con el nº **CNCM I-4049**, pero no es reactiva con el anticuerpo INT-LIC-01-28 tal como se produce mediante el híbridoma INT-LIC-01-28 depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París, Francia, con el nº **CNCM I-4048**. Ambos de estos monoclonales se dirigen contra determinantes antigénicos del antígeno de hidrato de carbono dominante del serotipo conocido de *Lawsonia intracellularis*.

Las bacterias de acuerdo con la invención pueden tener cualquier forma, por ejemplo, una forma viva de tipo silvestre, una forma viva mutante, en particular una forma viva atenuada, tal como la que se conoce del documento EP 0 843 818, cuya forma mutante también puede ser una forma recombinante, o muerta, como la que se conoce de las solicitudes de patente anteriormente mencionadas presentadas el 18 de Abril de 2008.

Puede ensayarse si una bacteria *Lawsonia intracellularis* es reactiva o no con los monoclonales, como se describe anteriormente, en un procedimiento de inmunotransferencia, como se describe en los ejemplos acompañantes del párrafo "Inmunocaracterización de bacterias y cortes tisulares") con respecto a bacterias aisladas.

- 5 Dado que el nuevo serotipo difiere inmunológicamente del existente, el diagnóstico del nuevo serotipo requiere el uso de un nuevo conjunto de anticuerpos. Además, dado que el nuevo serotipo es inmunológicamente distinto en particular con respecto al antígeno dominante, es razonable esperar que las vacunas existentes basadas en el serotipo conocido proporcionarán menos protección adecuada, o incluso no proporcionarán ninguna protección, contra una infección por *Lawsonia intracellularis* del nuevo serotipo. La invención actual también incluye vacunas
10 basadas en bacterias *Lawsonia intracellularis* del nuevo serotipo.

- En una realización la bacteria *Lawsonia intracellularis* deriva de una cepa como la depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París, Francia, con el nº CNCM I-4050. En esta
15 realización, "una cepa como la depositada" significa una cepa que tiene las características de la cepa como la depositada. Un derivado puede ser, por ejemplo, uno vivo atenuado, por ejemplo, producido a través de pases de la bacteria un número suficiente de veces, como se conoce, por ejemplo, del documento EP 0 843 818, o producido mediante técnicas recombinantes. También puede ser una bacteria muerta, tal como, por ejemplo, la que se conoce de la solicitud de patente internacional WO2009/144088. En una realización adicional, la bacteria *Lawsonia intracellularis* es la cepa depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur
20 de París, Francia, con el nº CNCM I-4050. Esta cepa ha emergido en los EE.UU. y se cree que una vacuna que comprende antígenos de esta cepa proporcionará una protección óptima contra esta cepa u otras cepas del mismo serotipo.

- También se describe una fracción aislada derivada de una bacteria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores. Dicha fracción aislada derivada puede ser un componente o una mezcla de
25 componentes aislados de la propia bacteria o, si es aplicable, un metabolito de esa bacteria, o una subunidad de la bacteria que, por ejemplo, expresa un microorganismo productor recombinante que expresa la subunidad. Una fracción aislada puede ser útil en el desarrollo de un kit diagnóstico para evaluar la infección con bacterias *Lawsonia intracellularis* del nuevo serotipo. También, en particular cuando la fracción aislada comprende antígenos relevantes
30 para proporcionar protección contra una infección por *Lawsonia intracellularis*, puede usarse satisfactoriamente en una vacuna segura contra dicha infección. Una fracción aislada de la bacteria, cuando se administra a un animal, no causará normalmente la misma enfermedad o trastorno que la bacteria de tipo silvestre, o al menos lo hará a un grado inferior.

- 35 La fracción aislada puede comprender una composición que contenga hidrato de carbono no vivo, encontrándose también el hidrato de carbono en células vivas de *Lawsonia intracellularis* en asociación con la membrana celular externa de estas células. El modo de obtención de dicha fracción de *Lawsonia intracellularis* se describe, por ejemplo, en el "Ejemplo 1" de la publicación de patente internacional WO2009/144088. Esto también se conoce a partir de Kroll *et al.* (Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, junio de 2005, 693-699).

- 40 La presente invención también está relacionada con una vacuna para la protección contra una infección por *Lawsonia intracellularis*, en la que la vacuna comprende una bacteria del nuevo serotipo. Una vacuna para la protección contra una infección por microorganismos en el sentido de esta invención es una constitución adecuada para la aplicación en un animal, que comprende uno o más antígenos, tales como microorganismos atenuados o
45 muertos y/o subunidades de los mismos, o cualquier otra sustancia, tal como un metabolito de un organismo, en una cantidad inmunológicamente efectiva, es decir, capaz de estimular suficientemente el sistema inmunitario del animal al que se dirigen, para reducir al menos los efectos negativos de una exposición de los microorganismos de tipo silvestre, normalmente combinados con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un líquido que contiene agua, que opcionalmente comprende agentes inmunoestimuladores (adyuvantes), que tras la
50 administración al animal inducen una respuesta inmunitaria para ayudar a prevenir, mejorar o tratar una enfermedad o trastorno.

- En general, una vacuna puede fabricarse usando métodos conocidos en la técnica que básicamente comprenden mezclar los antígenos (o una composición que contenga los antígenos) con un vehículo farmacéuticamente
55 aceptable, por ejemplo, un vehículo líquido tal como agua (opcionalmente tamponada) o un vehículo sólido tal como los que se usan comúnmente para obtener vacunas liofilizadas. En la vacuna, los antígenos están presentes en una cantidad inmunológicamente efectiva, es decir, en una cantidad capaz de estimular suficientemente el sistema inmunitario del animal al que se dirigen para reducir al menos los efectos negativos de una exposición post-vacunación de los microorganismos de tipo silvestre. Opcionalmente se añaden otras sustancias tales como
60 adyuvantes, estabilizantes, modificadores de la viscosidad u otros componentes dependiendo del uso que al que se destine o de las propiedades requeridas de la vacuna. En principio, cada sustancia que es capaz de favorecer o amplificar un proceso particular en la cascada de eventos inmunológicos, conduciendo finalmente a una mejor respuesta inmunológica (es decir, la respuesta corporalmente integrada contra un antígeno, en particular una mediada por linfocitos y que normalmente implica el reconocimiento de antígenos por anticuerpos específicos o
65 linfocitos sensibilizados anteriormente), puede definirse como un adyuvante. Obsérvese que, en general, el adyuvante no se requiere para que ocurra dicho proceso particular, pero favorece o amplifica dicho proceso. Para la

vacunación parenteral existen muchas formas idóneas, en particular formulaciones líquidas (con antígenos disueltos, emulsionados o suspendidos) pero también formulaciones sólidas tales como implantes o una forma intermedia tal como un vehículo sólido para el antígeno suspendido en un líquido. La vacunación parenteral y las formas idóneas (físicas) de vacunas para la vacunación parenteral se conocen desde hace más de 200 años. La vacuna puede contener antígenos de *Lawsonia intracellularis* no viva y que esté en una forma idónea para la administración sistémica a una dosis antigénica por vacunación derivada de o que contiene al menos 1×10^7 (1E7) células de *Lawsonia intracellularis*. Se ha mostrado que aplicando una dosis por cada vacunación derivada de o que contiene al menos 1×10^8 (1E8) células de *Lawsonia intracellularis*, se puede llegar aún a una buena protección. Basándose en estos resultados, se cree que una dosis de 1×10^7 es la mínima cantidad requerida para la protección adecuada cuando un antígeno no vivo se administra por vía sistémica. En principio no existe límite superior para la dosis. Sin embargo, a una dosis normalmente mayor de 1×10^{11} células/ml será difícil administrar una vacuna por vía sistémica debido a su alta carga de masa antigénica. Para las subunidades, un límite superior práctico es normalmente de una masa antigénica por ml derivada de, o correspondiente a, 1×10^{14} células. La administración sistémica es una forma de administración en la que la vacuna alcanza el sistema circulatorio del organismo (que comprende el sistema cardiovascular y linfático), afectando de este modo a todo el organismo en lugar de a una localización específica tal como el tracto gastrointestinal. La administración sistémica puede llevarse a cabo, por ejemplo, administrando los antígenos en el tejido muscular (intramuscular), en la dermis (intradérmica), por debajo de la piel (subcutánea), por debajo de la mucosa (submucosa), en las venas (intravenosa), etc. A parte de la muy buena protección obtenible, una ventaja importante de una vacuna no viva es que esta tiene una seguridad intrínseca cuando se compara con una vacuna viva. La dosis de esta realización parece ser de un valor mínimo para obtener la protección aceptable con esta forma de administración.

La invención también está relacionada con anticuerpos adecuados para diagnosticar el nuevo serotipo de *Lawsonia intracellularis*, en particular los anticuerpos que pertenecen al grupo como el producido por el hibridoma INT-LIC-02-02 o hibridoma INT-LIC-01-28, ambos depositados en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París, Francia, con los nos **CNCM I-4049** y **CNCM I-4048** respectivamente. La invención también está relacionada con estos hibridomas.

La invención se explicará adicionalmente basándose en los siguientes ejemplos de las realizaciones de la presente invención.

Aislamiento de *Lawsonia intracellularis* de intestinos

El material tisular se obtuvo de intestinos de cerdos nacidos y criados en los EE.UU., en los que los cerdos tenían casos de enteropatía proliferativa de origen natural confirmados histológicamente. Las bacterias *Lawsonia intracellularis* se recogieron usando técnicas comúnmente conocidas, conocida, entre otros, de Lawson *et al.* (Journal of Clinical Microbiology, mayo de 1993, páginas 1136-1142) en "MATERIALES Y MÉTODOS", párrafo "material fuente". Las bacterias *Lawsonia intracellularis* crecieron en una línea celular de fibroblastos de ratón (de McCoy) en matraces T de 175 cm² usando métodos establecidos en la técnica (Guedes y Gebhart, Veterinary Microbiology, 93:159-166. 2003). Las bacterias se recogieron de sobrenadantes de cultivo tisular y de células de McCoy infectadas, como se describe en la técnica (Guedes y Gebhart, Veterinary Microbiology, 93:159-166. 2003). Estas bacterias, mencionadas en esta solicitud como aislado SPAH06 de *Lawsonia intracellularis*, y depositadas en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París, Francia, con el nº **CNCM I-4050**, se usaron para caracterizar el nuevo serotipo así como para la preparación de una vacuna.

Muestras tisulares de animales procedentes de los Países Bajos

El material tisular se obtuvo de intestinos de un caballo y un cerdo criados en los Países Bajos, animales de los que se sospechaba que tenían enteropatía proliferativa causada por *Lawsonia intracellularis*. El caballo era un potro Friesian de 5 meses con hipoproteinemia grave y engrosamiento de la pared intestinal tal como se determinó por exploración con ultrasonido. El animal se llevó a una clínica veterinaria. Debido a los signos clínicos se sospechó que tenía una infección por *Lawsonia intracellularis*. También se sospechaba que el cerdo tenía una infección por *Lawsonia intracellularis*. Con el fin de confirmar esto, se recogieron muestras tisulares de los intestinos de estos animales, se fijaron en formalina neutra tamponada y se procesaron en cortes de acuerdo con procedimientos convencionales. Estos cortes se examinaron al microscopio y se sometieron a inmunohistoquímica. El examen microscópico confirmó que las bacterias (de tipo) *Lawsonia* estaban presentes. De aquí en adelante, se describen los resultados con respecto a la inmunohistoquímica.

Producción de monoclonales e hibridomas

Los anticuerpos monoclonales (también mencionados como monoclonales) se produjeron del siguiente modo. Las bacterias *Lawsonia intracellularis* se aislaron de tejido visceral de cerdos infectados esencialmente como describen Lawson *et al* (1993) mencionados anteriormente. Las bacterias aisladas se purificaron adicionalmente por centrifugación de gradiente de percol. Las preparaciones de células purificadas de la membrana externa se realizaron por sonificación seguido de extracción con N-Laurolil Sarcosina. Las preparaciones de la membrana externa se formularon en una emulsión de agua en aceite basada en parafina y se administraron dos veces por vía

intramuscular a ratones Balb/c (con un intervalo de 6 semanas). Una semana después de una vacunación de refuerzo intravenosa adicional, se produjeron los hibridomas fusionando células esplénicas (linfocitos B) de los ratones vacunados con células de mieloma de ratón (NS-1) usando un método de fusión convencional con Polietilenglicol (PEG). Los hibridomas se cultivaron durante aproximadamente dos semanas en medio de selección Hipoxantina-Aminopterina-Timidina (HAT) y se exploraron con un ensayo específico de ELISA y/o de inmunofluorescencia (IF). Se seleccionaron los clones positivos y se conservaron en nitrógeno líquido. Los monoclonales reciben el nombre de INT-LIC-01-028 y INT-LIC-02-02. En línea con el Ejemplo 1 de la publicación de patente internacional WO 2009/144088 se estableció que ambos monoclonales fueron reactivos con un hidrato de carbono asociado a la membrana externa de las bacterias *Lawsonia intracellularis*.

Immunocaracterización de bacterias y cortes tisulares

La inmunocaracterización de las bacterias *Lawsonia* aisladas se llevó a cabo usando técnicas de transferencia convencionales, es decir, SDS-PAGE usando un gel NuPage al 10 % de Bis-Tris en condiciones reductoras con un tampón MOPS/MES con SDS. Se usó el método de transferencia de Western semiseca de acuerdo con Towbin (Towbin, H; Staehlin, T. y Gordon, J., Proc. Nat. Acad. Sci. 76, 4350, 1979) para transferir el gel a una membrana de transferencia Immobilon P de PVDF de 0,45 µm (Millipore). La transferencia se bloqueó con 100 ml de PBS 0,04 M que contenía Tween 20 al 0,5 % (pH 7,2) y leche en polvo al 1 % m/v durante una hora a 37 °C. La transferencia se lavó una vez con PBS 0,04 M y Tween 20 al 0,5 % (pH 7,2) durante 30 segundos. Posteriormente, se incubó la transferencia durante una hora a 37 °C en 20 ml de PBS 0,04 M que contenía Tween 20 al 0,05 % y leche en polvo al 1 % que contenía una dilución de 200 veces de uno de los anticuerpos monoclonales, seguido tres lavados, durante cinco minutos con 100 ml de PBS 0,04 M que contenía Tween 20 al 0,5 % (pH = 7,2). Después se incubó la transferencia durante una hora a 37 °C con 20 ml de PBS 0,04 M que contenía Tween 20 al 0,05 % y leche en polvo al 1 % e (IgG) de cabra anti-ratón-HRP diluido 1000 veces, seguido tres lavados durante cinco minutos con 100 ml de PBS 0,04 M que contenía Tween 20 al 0,5 % (pH = 7,2). La transferencia se incubó en solución de sustrato Vector SG (kit de sustrato Vector SG para peroxidasa (Vector, SK-4700)) hasta que se revelara el color lo suficiente. Se detuvo la reacción lavando dos veces durante cinco minutos en API (agua para inyección). Los resultados se representan en la Figuras 1 y 2. La Figura 1 muestra los resultados de la tinción usando el anticuerpo monoclonal INT-LIC-02-02. Está claro que este monoclonal reacciona con las cepas conocidas públicamente BI; UE y BI; EE.UU. con una banda de aproximadamente 15 kDa. También puede verse que estas dos cepas difieren ligeramente dado que las preparaciones que no se trataron con proteinasa K (indicado como Prot K: -) difieren ligeramente en el peso molecular. También hay una reacción positiva con la cepa SPAH06. El control (preparación de células de McCoy) no da ninguna tinción. En la figura 2 se dan los resultados de la tinción con el anticuerpo monoclonal INT-LIC-01-028. Parece que este monoclonal reacciona con el mismo antígeno de hidrato de carbono de las cepas BI; UE y BI; EE.UU. Sin embargo, en estas circunstancias no hay ninguna reacción entre el monoclonal INT-LIC-01-028 y una preparación de la cepa SPAH06 en el sentido de la presente invención dado que no se descubrió ninguna banda visible en este procedimiento. Se observa que, con las bacterias *Lawsonia intracellularis* del nuevo serotipo, podría ocurrir alguna ligera reacción inespecífica con el monoclonal INT-LIC-01-28, pero en las circunstancias como las descritas anteriormente en el presente documento, dicha reacción inespecífica no podría detectarse usando la técnica de visualización prescrita (es decir, deteniendo la incubación con el Vector VG hasta que se produzca un revelado de color suficiente para las dos cepas BI).

La inmunocaracterización de muestras tisulares de intestino infectado por *Lawsonia* se llevó a cabo del siguiente modo. Las muestras tisulares se fijaron en formalina neutra tamponada y se procesaron en cortes de acuerdo con procedimientos convencionales. Las bacterias *Lawsonia* presentes en los cortes tisulares se exploraron con los monoclonales INT-LIC-01-28 o INT-LIC-02-02 y se visualizaron después usando el sistema EnVision™ / HRP de ratón (disponible en DAKO, Carpintería, CA; EE.UU.). Las muestras tisulares del caballo y del cerdo, procedentes de Holanda, como se menciona anteriormente en el presente documento en el párrafo "Muestras tisulares de animales procedentes de Holanda", se sometieron a este ensayo de inmunocaracterización. Cuando para explorar se usó el monoclonal INT-LIC-02-02 pudo observarse tinción específica de los cortes tisulares mientras que el monoclonal INT-LIC-01-28 no produjo tinción positiva específica.

A partir de estos casos se puede llegar a la conclusión de que varias cepas de *Lawsonia intracellularis* del nuevo serotipo inmunológico están presentes en distintas especies animales, tal como se define anteriormente en la parte preliminar de esta descripción y en las reivindicaciones adjuntas. Cada una de estas cepas se asocia con signos clínicos y lesiones tisulares que se corresponden con enteropatía proliferativa.

Estudios de vacunación con aislado de *Lawsonia intracellularis* SPAH06

Se llevó a cabo un estudio en cerdos para ensayar si una vacuna muerta basada en aislado de *Lawsonia intracellularis* SPAH06 podía proporcionar protección contra la enfermedad causada por *Lawsonia*. Las bacterias vivas se inactivaron por adición de Etileneimina Binaria (EBI) y después se formularon en el adyuvante Emunade® (disponible en Intervet Schering-Plough Animal Health). Las bacterias inactivadas y formuladas en adyuvante se ensayaron a dos niveles de dosis; 1×10^8 y 5×10^8 bacterias por dosis. La exposición con un homogenizado visceral preparado del intestino de un cerdo al que se le diagnosticó una infección por *Lawsonia* tuvo lugar en el día 42. La medida de eficacia principal se basó en la reducción significativa ($p < 0,05$) de la prevalencia y gravedad de las

lesiones macroscópicas y microscópicas en el íleon de los animales vacunados frente a los controles. Las lesiones macroscópicas se puntuaron basándose en una escala de 0-3 y las lesiones microscópicas se puntuaron basándose en una escala de 0-4. El programa del estudio y las actividades principales se muestran en la Tabla 1. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 2. Los datos presentados en la Tabla 2 muestran que hubo una reducción significativa en las puntuaciones de las lesiones de íleon entre los animales vacunados y control tratados con placebo (ensayo t, $p < 0,05$). Además, hubo una reducción significativa en la colonización de los animales vacunados frente al control con placebo, tal como se determinó mediante tinción inmunohistoquímica de los tejidos del íleon afectados. Estos datos demuestran que la vacunación de los cerdos con una bacterina basada en aislado de *Lawsonia intracellularis* SPAH06 inactivado da como resultado la protección significativa de la enfermedad causada por este tipo de bacteria.

Tabla 1: Grupos de tratamiento y actividades de vacunación/exposición

Grupo de tratamiento	Nº de Animales	Dosis de Vacuna	Dosis/Vía	Vacunación (Día del Estudio)	Días de la Recogida del Suero	Días de la Necropsia
A	15	5×10^8	2 ml/IM	0,21	0, 21, 42, 63	63
B	15	1×10^8	2 ml/IM	0,21	0, 21, 42, 63	63
C	15	-	2 ml/IM	0,21	0, 21, 42, 63	63

TABLA 2: Impacto de la vacunación con la bacterina *Lawsonia* sobre la colonización del epitelio de las criptas y las lesiones del íleon

Tratamiento	Puntuación de la Lesión del Íleon	Puntuación IHC	% de animales positivos para <i>Lawsonia</i>
5×10^8	$0,33 \pm 0,15$	$1,1 \pm 0,31$	54
1×10^8	$0,36 \pm 0,14$	$1,56 \pm 0,25$	91
Control	$1,0 \pm 0,19$	$2,53 \pm 0,18$	100

REIVINDICACIONES

1. Bacteria *Lawsonia intracellularis* de un serotipo que es reactivo con el anticuerpo monoclonal INT-LIC-02-02 tal como el producido por el hibridoma INT-LIC-02-02 depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París, Francia, con el nº **CNCM I-4049**, **caracterizada por que** no es reactiva con el anticuerpo INT-LIC-01-28 tal como el producido mediante el hibridoma INT-LIC-01-28 depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París, Francia, con el nº **CNCM I-4048**.
2. Bacteria *Lawsonia intracellularis* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** deriva de una cepa tal como la depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París, Francia, con el nº **CNCM I-4050**.
3. La bacteria *Lawsonia intracellularis* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** es la cepa depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París, Francia, con el nº **CNCM I-4050**.
4. Vacuna para la protección contra una infección por *Lawsonia intracellularis*, que comprende una bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Anticuerpos adecuados para diagnosticar la bacteria *Lawsonia intracellularis* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizados por que** los anticuerpos pertenecen al grupo tal como el producido por el hibridoma INT-LIC-02-02 o el hibridoma INT-LIC-01-28, ambos depositados en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París, Francia, con los nos **CNCM I-4049** y **CNCM I-4048**, respectivamente.
6. Un hibridoma para producir un anticuerpo como se define en la reivindicación 5, **caracterizado por que** el hibridoma se selecciona del grupo constituido por el hibridoma INT-LIC-02-02 depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París, Francia, con el nº **CNCM I-4049** y el hibridoma INT-LIC-01-28 depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París, Francia, con el nº **CNCM I-4048**.

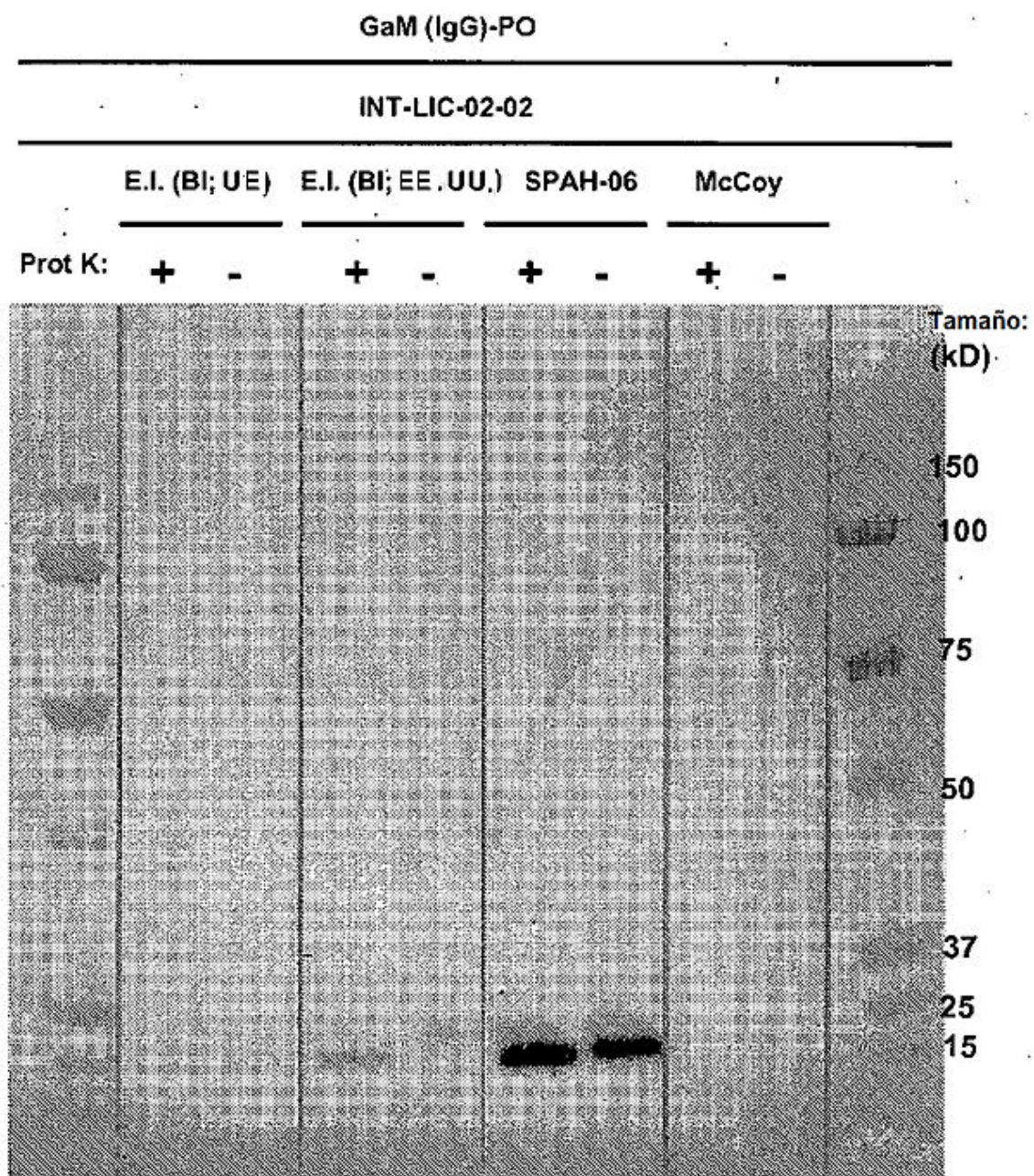


FIGURA 1

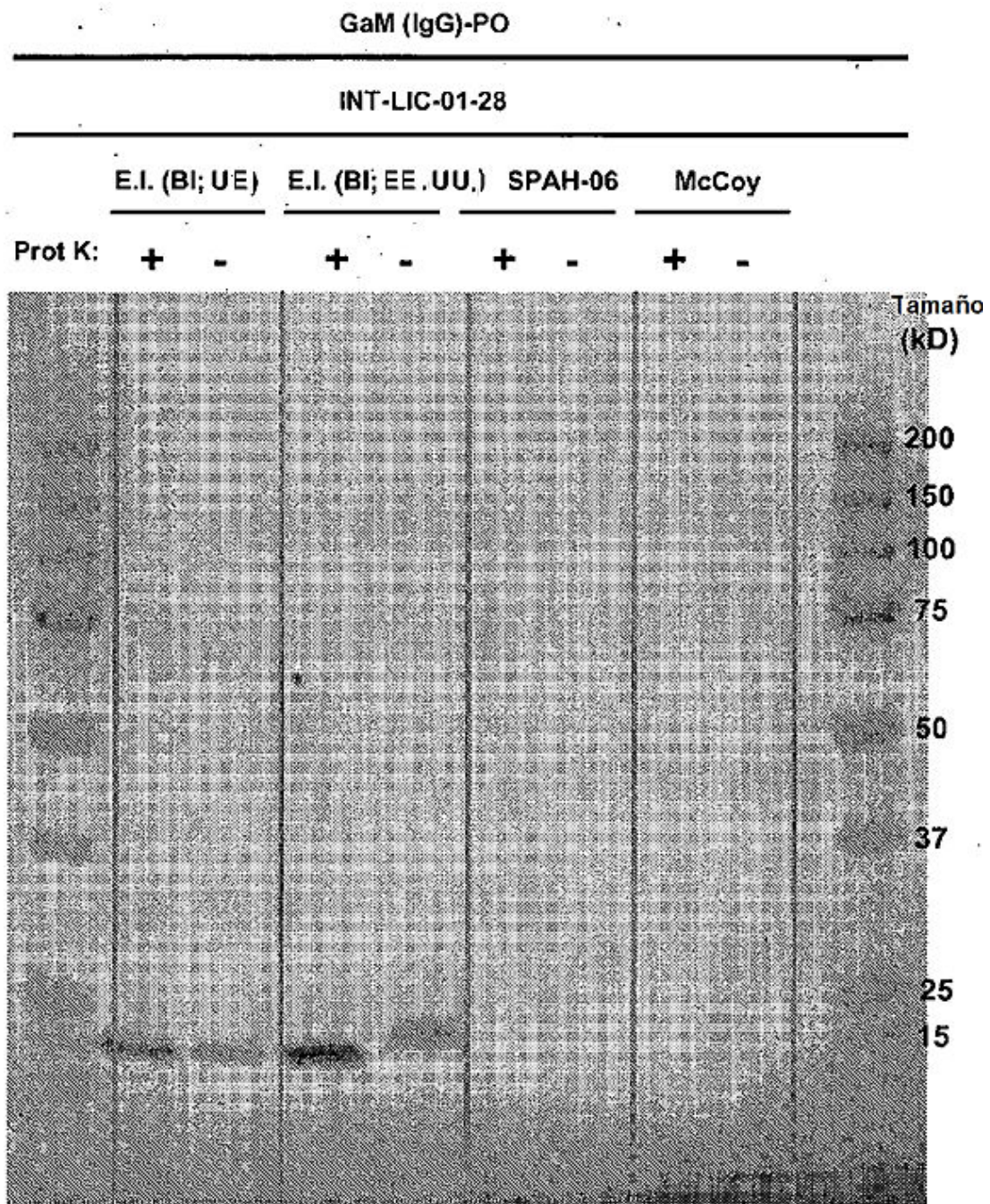


FIGURA 2