

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 403**

51 Int. Cl.:

C12N 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2008 PCT/US2008/076025**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2009 WO09036177**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2008 E 08831020 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2190980**

54 Título: **Métodos de cultivo de especies bacterianas de la familia Anaplasmataceae**

30 Prioridad:

12.09.2007 US 971726 P
12.09.2007 US 971716 P
26.02.2008 US 31428

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.12.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BATTLES, JANE, KWUN-LAI;
PROUDFOOT, KIMBERLY, D.;
MEDING, BRENDA, L.;
FUNK, PATRICK, G. y
WARTHEN, R., MONTY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 594 403 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

Métodos de cultivo de especies bacterianas de la familia *Anaplasmataceae*

5 **Campo de la invención**

La descripción describe un método de cultivo de organismos bacterianos que pertenecen a la familia *Anaplasmataceae* en células embrionarias o fetales de mamífero, tales como células embrionarias o fetales felinas. En particular, la presente descripción describe el crecimiento de organismos bacterianos que pertenecen a la familia *Anaplasmataceae* incluyendo organismos que pertenecen a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* y *Wolbachia*. Los organismos bacterianos pueden cultivarse en células embrionarias o fetales de mamífero, tales como células hospedadoras embrionarias o fetales felinas. El material bacteriano cultivado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento puede usarse como la base de vacunas contra enfermedades asociadas con las bacterias *Anaplasmataceae*.

15

Antecedentes de la invención

Las bacterias de la familia *Anaplasmataceae* son parásitos intracelulares obligados. Como tales, estos microorganismos son con frecuencia difíciles de cultivar y las enfermedades que provocan son difíciles de diagnosticar. Debido a la dificultad de cultivar estos microorganismos, la preparación a gran escala de antígenos de vacuna es costosa y en ocasiones imposible. Las bacterias de la familia *Anaplasmataceae* son agentes patógenos de enfermedades de seres humanos y animales transmitidas por vectores. Se transmiten en su mayoría por vectores invertebrados tales como garrapatas. Dentro de la familia *Anaplasmataceae*, los microorganismos de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* y *Wolbachia* son agentes causantes de enfermedades transmitidas por vector y son difíciles de cultivar, especialmente a gran escala. No se incluyen dentro de la familia *Anaplasmataceae* especies bacterianas que pertenezcan al género *Rickettsiae*.

La anaplasmosis es una enfermedad de ganado portada por garrapatas importante endémica en los Estados Unidos. El agente causante, *Anaplasma marginale*, invade y se multiplica en eritrocitos de vacas, provocando anemia de leve a grave. La mortalidad y morbilidad anual debido a anaplasmosis que afecta a cabañas de vacuno para carne ha provocado daño por valor de millones de dólares debido a, por ejemplo, pérdida de peso durante infecciones agudas y aumento de los costes veterinarios. Véase, por ejemplo, Palmer en *Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines*, J.G. Wright (Ed.) CRC Press Inc., Boca Raton, Fla. 1989.

Anaplasma phagocytophilum provoca fiebre portada por garrapatas en ovejas, vacas y bisontes, y tiene como vector *I. ricinus*. Véase Patente de Estados Unidos n.º 6.284.238, que se incorpora completamente por referencia en el presente documento. A diferencia de *A. marginale* que infecta glóbulos rojos, *A. phagocytophilum* infecta granulocitos.

Las bacterias *Ehrlichia* están estrechamente relacionadas con especies de *Anaplasma*. Las especies para las que se conoce un vector biológico se transmiten por garrapatas, tales como para *E. canis*. Por otro lado *Anaplasma phagocytophilum* prefiere infectar granulocitos en su hospedador mamífero. *Ehrlichia canis* prefiere infectar glóbulos blancos mononucleares. Normalmente, *Anaplasma* y *Ehrlichia* están contenidos dentro de vacuolas unidas a membrana de sus células hospedadoras respectivas.

La primera especie de *Ehrlichia* reconocida fue *E. canis*. Aparece en todas las áreas del mundo en las que vive la garrapata vector *Rhipicephalus sanguineus* (la garrapata del perro). La enfermedad que provoca se denomina en ocasiones pancitopenia tropical canina. Es un problema especialmente en todas las áreas cálidas del mundo, por ejemplo, el sur de los Estados Unidos, América Central y Sudamérica, el Mediterráneo y el sur de Asia. *Ehrlichia canis* puede cultivarse en la línea celular de perro DH82 así como líneas celulares híbridas de ser humano-perro (Véase Rikihisa, Y. 1991. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 286). Se enumeran diversas cepas de *E. canis* en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2006/188524. *Ehrlichia chaffeensis* se asocia con ehrliquiosis humana. Véase Maeda, K. *et al.*, 1987, *N. Eng. J. Med.* 316: 853; Dawson, J. E. *et al.*, 1991, *J. Clin. Microbiol.* 29: 2741. *E. chaffeensis* también puede cultivarse en células DH82.

Las bacterias *Neorickettsia* están estrechamente relacionadas con bacterias *Ehrlichia* y *Anaplasma*. Las especies de *Neorickettsia* incluyen *N. risticii* y *N. sennetsu* (ambas de las cuales se han clasificado previamente en el género *Ehrlichia*). *N. risticii* es el agente causante de la fiebre equina del Potomac. Se sabe que esta enfermedad aparece en Norteamérica, Francia e India. *N. risticii* puede cultivarse en líneas celulares de macrófagos-monocitos tales como P388D1, T- 84 y U937. *N. sennetsu* es el agente causante de la erliquiosis Sennetsu de seres humanos. *N. sennetsu* crece en líneas celulares murinas y humanas tales como P388D, L929 y HeLa.

Pueden diagnosticarse infecciones con organismos bacterianos de la familia *Anaplasmataceae* por examen microscópico directo y/o serodiagnóstico. Puede ser eficaz el tratamiento con antibióticos. Están disponibles en el mercado vacunas equinas para proteger contra *N. risticii*. Véase *Compendium of Veterinary Products*, 6ª ed., Aurora Arriola, ed., North American Compendiums, Ltd., Port Huron, MI (2001). Está disponible en el mercado también al

menos una vacuna de vacas para proteger contra anaplasmosis. Véase misma referencia. Sin embargo, no se han fabricado ni se venden vacunas para prevención a gran escala de otras enfermedades provocadas por organismos bacterianos tales como, por ejemplo, *E. canis*. En la actualidad, se cree que no hay vacunas comerciales para *Ehrlichia canis*.

Se han realizado intentos para cultivar ciertos organismos *Rickettsiales* en diversas células hospedadoras. La Patente de Estados Unidos n.º 5.192.679, se refiere a la propagación continua de *E. canis* en una línea celular de macrófagos y monocitos canina DH82 en un medio *in vitro* que soporta el crecimiento de células DH82. La Solicitud Publicada de Estados Unidos n.º 2005/0202046 se refiere a vacunas de *E. canis* en las que se cultivó la *E. canis* en células DH82. La Patente de Estados Unidos n.º 5.401.656 se refiere a la propagación de *E. chaffeensis* y *E. canis* en una línea celular endotelial humana inmortalizada. La Patente de Estados Unidos n.º 5.869.335 se refiere a cultivar ciertas bacterias *Rickettsiales* en líneas celulares de *Ixodes scapularis*. La Patente de Estados Unidos n.º 5.989.848, se refiere al cultivo de ciertas especies Ehrlichiales en una línea celular endotelial humana inmortalizada. La Patente de Estados Unidos n.º 3.616.202, se refiere al cultivo de *Anaplasma marginale* en un cultivo tisular de médula ósea de conejo. La Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos n.º 2006/0057699 se refiere al cultivo de ciertas especies de *Anaplasma* en células de mamífero. La Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos n.º 2003/0003508, se refiere al cultivo de bacteria *Rickettsia pulicis* en una línea celular de *Xenopus laevis*. Las Patentes de Estados Unidos n.º 5.955.359 y 5.976.860 se refieren al cultivo de ciertas especies bacterianas que pertenecen al orden de *Rickettsiales* en ciertas líneas celulares de mamífero. La Patente de Estados Unidos n.º 5.877.158 se refiere a métodos para introducir y expresar genes en células animales usando ciertos vectores bacterianos invasivos vivos.

Se ha presentado una tesis que analiza la inmunización de perros contra erliquiosis canina usando organismos *Ehrlichia canis* inactivados, Sunita Mahan, Immunisation of German shepherd dogs against canine ehrlichiosis using inactivated *Ehrlichia canis* organisms, tesis presentada a la Facultad de Ciencia Veterinaria de la Universidad de Zimbabue (mayo de 1997). Esta tesis analiza el uso de organismos *E. canis* inactivados por una β -propiolactona en combinación con Quill A.

Debido a que el cultivo de especies bacterianas que pertenecen a la familia *Anaplasmataceae* en células hospedadoras ha obtenido solamente un éxito muy limitado y aparentemente no se ha traducido en una aporte abundante de vacunas, sigue existiendo la necesidad general de desarrollar sistemas de cultivo para cultivar dichas especies bacterianas para facilitar el estudio de estos microorganismos patógenos y para el desarrollo de vacunas para proteger contra las enfermedades que provocan. También existe la necesidad de desarrollar un sistema de cultivo a gran escala para preparar grandes cantidades de antígeno a partir de dichos microorganismos para su uso en diagnóstico y vacunas.

Sumario de la invención

La descripción describe cultivo de organismos bacterianos que pertenecen a la familia *Anaplasmataceae* en células hospedadoras embrionarias o fetales de mamífero. Los organismos bacterianos cultivados pueden usarse como vacuna contra enfermedades provocadas por los organismos bacterianos. El antígeno usado en la vacuna puede prepararse a partir de los organismos bacterianos aislados de las células hospedadoras de mamífero. Como alternativa, el antígeno usado en la vacuna puede prepararse a partir de cultivos de las células hospedadoras de mamífero infectadas con los organismos bacterianos. Los organismos bacterianos (o la célula hospedadora si está presente) pueden inactivarse. Como alternativa, los organismos bacterianos pueden ser vivos atenuados de modo que se repliquen dentro de un animal al que se administran una o más veces sin provocar la patología típica de la forma patógena no atenuada del organismo bacteriano.

Con mayor particularidad, la descripción describe cultivo de organismos bacterianos de la familia *Anaplasmataceae* en células hospedadoras que son células de mamífero embrionarias. En una realización de la descripción, las bacterias se cultivan en células de mamífero embrionarias no humanas. Dichas células hospedadoras pueden obtenerse de cualquier parte de un embrión o feto animal no humano. Dichas células hospedadoras pueden estar diferenciadas o no diferenciadas. Las células hospedadoras embrionarias pueden derivar de embriones o fetos felinos, caninos, murinos, porcinos, bovinos, ovinos, simios o equinos. En una realización de la invención, las células hospedadoras embrionarias derivan de embriones o fetos felinos.

Los organismos bacterianos de la familia *Anaplasmataceae* pertenecen a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* o *Neorickettsia*. Los organismos bacterianos que pertenecen a la familia *Anaplasmataceae* no incluyen los organismos bacterianos que pertenecen a la familia *Rickettsiaceae* (la familia *Rickettsiaceae* incluye el género *Rickettsia*, que incluye las especies *R. orientia* y *R. rickettsia*). Los organismos bacterianos específicos que pertenecen al género *Anaplasma* pueden ser *A. bovis*, *A. centrale*, *A. marginale* y *A. phagocytophilum*. El organismo bacteriano específico que pertenece al género *Ehrlichia* puede ser *E. canis*. El organismo bacteriano específico que pertenece al género *Neorickettsia* puede ser *N. risticii*.

La descripción describe un método para cultivar una especie bacteriana de la familia *Anaplasmataceae* que comprende: i) obtener especies bacterianas de la familia *Anaplasmataceae*; ii) infectar células embrionarias de

mamífero no humano con dicha especie bacteriana; y iii) cultivar dichas células embrionarias de mamífero no humanas en condiciones que conducen a la propagación de las células embrionarias de mamífero no humanas, cultivando de este modo la especie bacteriana. La especie bacteriana puede obtenerse en un estado purificado libre de ninguna célula hospedadora, en un estado en el que está presente en una célula hospedadora o un estado en el que está presente en un homogenizado de tejido animal infectado. En una realización, las células embrionarias de mamífero no humano se infectan con un homogenizado de células de mamífero aisladas de un animal infectado con un organismo *Anaplasmataceae*. En otra realización, las células embrionarias de mamífero no humano se infectan exponiendo las células embrionarias a un organismo *Anaplasmataceae*. La especie bacteriana *Anaplasmataceae* puede ser de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* o *Neorickettsia*. La especie bacteriana *Anaplasmataceae* puede ser *Anaplasma bovis*, *Ehrlichia canis* o *Neorickettsia risticii*. En una realización, las células embrionarias de mamífero no humano son células felinas. Las células felinas pueden ser células de fibroblastos embrionarios felinos, células embrionarias felinas FEA o células fetales completas de *Felis catus*. Las células embrionarias de mamífero no humano pueden ser indiferenciadas y/o inmortalizadas. En otra realización, las células embrionarias de mamífero no humano son células epiteliales de riñón de embrión de mono.

La descripción también describe composiciones que comprenden células embrionarias de mamífero no humano infectadas con una especie bacteriana de la familia *Anaplasmataceae*. La especie bacteriana puede ser de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* o *Neorickettsia*. La especie bacteriana *Anaplasmataceae* puede ser cualquiera conocida por los expertos en la material incluyendo, sin limitación, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* o *Neorickettsia risticii*. Las células embrionarias de mamífero no humano pueden ser células de fibroblastos embrionarios felinos (FEF), células embrionarias de felinos FEA o células fetales completas de *Felis catus*. Las células embrionarias de mamífero no humano pueden ser indiferenciadas y/o inmortalizadas. Las células embrionarias de mamífero no humanas también pueden ser células epiteliales de riñón de embrión de mono.

La descripción también describe métodos para prevenir la infección en un mamífero administrando al mamífero una vacuna basada en material cultivado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. La descripción también describe métodos para proteger a un mamífero administrando al mamífero una vacuna basada en material cultivado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. La descripción también describe métodos para tratar a un mamífero administrando al mamífero una vacuna basada en material cultivado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. En particular, la descripción también describe proteger a un mamífero contra una enfermedad provocada por un organismo que pertenece a la familia *Anaplasmataceae* proporcionando al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno bacteriano *Anaplasmataceae*. El mamífero puede ser un ser humano, mono, gato, perro, caballo, vaca, cerdo, oveja o cabra. En una realización de la invención, el animal es un perro.

La descripción también describe administrar a un mamífero una cantidad inmunológicamente protectora de material cultivado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento; o administrar a un mamífero una cantidad eficaz de material cultivado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento para producir una respuesta inmunitaria.

Descripción detallada de la invención

A no ser que se indique de otro modo todos los términos usados en el presente documento tienen su significado habitual como se entendería por el experto en la materia. Los términos para los que se proporcionan a continuación definiciones explícitas tienen además de su significado explícito el significado normalmente atribuido por el experto habitual en la materia.

La presente invención se refiere a un método para cultivar en continuo *Ehrlichia canis* en células de fibroblastos embrionarios felinos. La presente divulgación se refiere a métodos para cultivar microorganismos. Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos para cultivar organismos bacterianos que pertenecen a la familia *Anaplasmataceae*. Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos para cultivar en continuo organismos que pertenecen a los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* o *Neorickettsia*.

Los ejemplos no limitantes de especies que pertenecen al género *Anaplasma* que pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación incluyen *A. bovis*, *A. centrale*, *A. marginale*, *ovis*, *A. platys* y *A. phagocytophilum* (previamente denominado *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi*, agente de ehrliquiosis granulocítica humana o agente de HGE). Los ejemplos no limitantes de especies que pertenecen al género *Ehrlichia* que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. muris*. Los ejemplos no limitantes de especies que pertenecen al género *Neorickettsia* que pueden usarse de acuerdo con la descripción incluyen *N. helminthoeca*, *N. risticii* (fiebre equina del Potomac, anteriormente denominado *E. risticii*) y *N. sennetsu*.

De acuerdo con la descripción, se cultivan organismos bacterianos de la familia *Anaplasmataceae* en células hospedadoras embrionarias o fetales de mamífero. Como se usa en el presente documento, "células hospedadoras" son células que pueden infectar organismos bacterianos de la familia *Anaplasmataceae* y en las que los organismos bacterianos pueden replicarse. Los ejemplos no limitantes de células hospedadoras embrionarias o fetales de mamífero incluyen células embrionarias o fetales humanas, felinas, caninas, murinas, porcinas, bovinas, ovinas, de

simios o equinas. Como se usa en el presente documento, "células hospedadoras infectadas" se refieren a células hospedadoras que contienen una o más bacterias *Anaplasmataceae*.

5 Las células hospedadoras pueden derivar de una única célula aislada de tejido embrionario o fetal de mamífero. Por ejemplo, las células pueden derivar de tejido embrionario felino, canino, bovino, equino, murino, porcino, símico o humano.

10 En una realización de la descripción, se cultivan especies bacterianas que pertenecen a las *Anaplasmataceae* en células hospedadoras que derivan de tejido embrionario o fetal de mamífero no humano. Un ejemplo no limitante de células embrionarias o fetales felinas que puede usarse de acuerdo con la invención incluye células de fibroblastos embrionarios felinos (FEF), células embrionarias felinas FEA (Universidad de Glasgow, Glasgow, Escocia; como se describe en Jarret, O. *et al.* J. gen. Virol. 20: 169-175 (1973)), y células fetales completas de *Felis catus* (FCWF-4, Colección Americana de Cultivos Tipo. P.O. Box 1549 Manassas, VA 201 Q8, Estados Unidos (en lo sucesivo, "ATCC") depósito CRL-2787).

15 Los organismos bacterianos cultivados de acuerdo con la presente invención pueden usarse para vacunas, diagnóstico o investigación adicional incluyendo, por ejemplo, producción de cantidades de moléculas biológicas para aislamiento y estudio. En consecuencia, las bacterias cultivadas de acuerdo con la presente invención pueden formularse en una vacuna para administración a un mamífero para prevenir la infección o aliviar la enfermedad provocada por el organismo bacteriano. Por ejemplo, las bacterias cultivadas en las células hospedadoras podrían ser *Ehrlichia canis* para su uso en una vacuna para proporcionar a cánidos para evitar o aliviar la ehrlichiosis canina.

20 Por lo tanto, la descripción también describe composiciones inmunogénicas o vacunas basadas en material cultivado de acuerdo con la presente invención. El agente terapéutico (también denominado antígeno, agente activo o composición inmunogénica) que puede actuar como la base de una vacuna puede ser uno o más de los siguientes:

- a) cultivos recogidos de células hospedadoras que se infectan con bacterias *Anaplasmataceae*;
- b) extractos o fracciones de (a) que están potenciados con respecto a la concentración de las bacterias *Anaplasmataceae* contenidas dentro de las células hospedadoras infectadas;
- 30 c) extractos potenciados de bacterias *Anaplasmataceae* de (a) que contienen restos de las células hospedadoras;
- d) extractos de bacterias *Anaplasmataceae* de (a) que no contienen restos de las células hospedadoras o
- e) inmunógenos bacterianos *Anaplasmataceae* aislados.

35 "Aislado" cuando se usa en el presente documento significa retirado de su ambiente de origen natural. Por lo tanto, las células bacterianas *Anaplasmataceae* aisladas incluyen en general las que se han retirado de sus ambientes de origen natural, pudiendo dichos ambientes incluir artrópodos, insectos o mamíferos infectados vivos o muertos completos. Las células bacterianas *Anaplasmataceae* aisladas incluyen las que están contenidas dentro de tejido de mamífero que se ha retirado de un mamífero infectado por bacterias *Anaplasmataceae*. Las células bacterianas *Anaplasmataceae* aisladas también incluyen las que están completa o parcialmente separadas de células de mamífero de un mamífero infectado por bacterias *Anaplasmataceae*, tal como por lisis de las células hospedadoras. Las células bacterianas *Anaplasmataceae* aisladas también incluyen las que están contenidas dentro de células hospedadoras como se describe en el presente documento, o separadas parcial o completamente de las mismas. Las células bacterianas *Anaplasmataceae* aisladas también incluyen las que están sustancialmente libres de otros microorganismos, por ejemplo, en un cultivo.

40 "Aislados" como se usa en "inmunógenos bacterianos *Anaplasmataceae* aislados" se refiere a inmunógenos bacterianos que se han separado completa o parcialmente desde sus bacterias *Anaplasmataceae* fuente respectivas. Las composiciones de inmunógenos bacterianos *Anaplasmataceae* aislados pueden incluir algunas bacterias *Anaplasmataceae* intactas completas, partes o componentes de bacterias *Anaplasmataceae*, células hospedadoras intactas completas y/o partes o componentes de células hospedadoras. Los inmunógenos bacterianos *Anaplasmataceae* aislados también incluyen composiciones que están enriquecidas con respecto a una o más biomoléculas bacterianas *Anaplasmataceae*.

55 "Inmunógenos bacterianos *Anaplasmataceae*" como se usa en el presente documento incluye bacterias *Anaplasmataceae* completas que son bacterias vivas inactivadas o modificadas. El inmunógeno bacteriano *Anaplasmataceae* como se usa en el presente documento también puede incluir proteínas (lipoproteínas, proteínas membranosas, proteínas citosólicas), fragmentos inmunogénicos de dichas proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, sacáridos, lipopolisacáridos u otras moléculas biológicas derivadas de las bacterias *Anaplasmataceae*. El inmunógeno bacteriano *Anaplasmataceae* puede ser células bacterianas *Anaplasmataceae* completas o partes de las mismas que están presentes en células hospedadoras, en las que las células tanto bacterianas como hospedadoras se destruyen o inactivan. El inmunógeno bacteriano *Anaplasmataceae* también puede ser células bacterianas *Anaplasmataceae* completas o partes de las mismas que están presentes en células hospedadoras, en las que las células bacterianas u hospedadoras no se destruyen o inactivan.

65

El experto en la materia está generalmente familiarizado con las técnicas por las que las células hospedadoras o bacterianas pueden destruirse o inactivarse. Dichas técnicas incluyen medios físicos, químicos y biológicos. Los ejemplos no limitantes de técnicas de inactivación incluyen sonicación, técnicas de congelación-descongelación, presión, tratamiento con calor, productos químicos o enzimas. Los ejemplos no limitantes de agentes de inactivación química incluyen tratamiento con etilenamina binaria (BEA) y formalina (solución de formaldehído).

Como se ha indicado anteriormente, el material cultivado de acuerdo con la presente invención puede usarse para preparar antígeno para vacunas. Como se usa en el presente documento el término "vacuna" o "vacunas" significa y se refiere a un producto, cuya administración se pretende que induzca una respuesta inmunitaria que puede prevenir y/o reducir la gravedad de una o más enfermedades infecciosas. Una vacuna contiene un antígeno (o, "agente activo", "inmunógeno", "agente terapéutico" o "composición inmunogénica") que puede ser material cultivado de acuerdo con la presente invención incluyendo una célula hospedadora infectada con bacterias *Anaplasmataceae*, bacterias *Anaplasmataceae* intactas completas o fracciones, partes o biomoléculas bacterianas de una bacteria *Anaplasmataceae* que actúa para estimular el sistema inmunitario en un animal. Un antígeno puede ser una preparación atenuada viva o muerta de células hospedadoras infectadas por bacterias *Anaplasmataceae*, bacterias *Anaplasmataceae* atenuadas vivas o muertas, células irradiadas vivas, fracciones en bruto o inmunógenos bacterianos *Anaplasmataceae* purificados. Por lo tanto, una vacuna puede comprender antígeno aislado o purificado, enriquecido. Las vacunas pueden prepararse a partir de cultivos inactivados o muertos de células hospedadoras infectadas por *Anaplasmataceae* o bacterias *Anaplasmataceae* inactivadas o muertas.

Una vacuna también puede comprender una combinación de antígenos de más de una especie bacteriana *Anaplasmataceae* o de otros patógenos (por ejemplo, virales, bacterianos, parasitarios o fúngicos) como se describe adicionalmente posteriormente.

Las vacunas hechas de material cultivado de acuerdo con la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del antígeno. En el contexto de la presente divulgación, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un antígeno o una vacuna que induciría una respuesta inmunitaria en un mamífero que recibe el antígeno o la vacuna que es adecuada para prevenir o aliviar señales o síntomas de enfermedad, incluyendo efectos adversos para la salud o complicaciones de los mismos, provocados por infección con una bacteria *Anaplasmataceae* patógena. Puede inducirse inmunidad humoral o inmunidad mediada por células o inmunidad tanto humoral como mediada por células. La respuesta inmunogénica de un animal a una vacuna puede evaluarse, por ejemplo, indirectamente mediante la medición de títulos de anticuerpo, mediante análisis microscópico o directamente mediante supervisión de señales y síntomas después de exposición a cepa de tipo silvestre. La inmunidad protectora conferida por una vacuna puede evaluarse midiendo, por ejemplo, la reducción en señales clínicas tales como mortalidad, morbilidad, temperatura corporal y condición física general y salud y rendimiento generales del sujeto. La cantidad de una vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del virus particular usado, o la condición del sujeto, y puede determinarse por un experto en la materia.

El material cultivado de acuerdo con la presente invención también puede usarse para preparar composiciones inmunogénicas que estimulan una respuesta inmunitaria en un mamífero objeto al que se administran las composiciones. Dichas composiciones pueden usarse para identificar antígenos que pueden actuar como la base de una vacuna. Por lo tanto, por ejemplo, pueden administrarse a un mamífero objeto composiciones inmunogénicas que comprenden material cultivado de acuerdo con la presente invención. A continuación, el título de anticuerpo del mamífero objeto puede supervisarse y pueden seleccionarse antígenos bacterianos *Anaplasmataceae* candidatos para su uso o estudio adicional en vacunas. Las composiciones inmunoactivas de la presente invención incluyen composiciones que estimulan una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria mediada por células en el sujeto que recibe una vacuna.

Como se usa en el presente documento, una "respuesta inmunitaria" se refiere a la respuesta inmunitaria activa del mamífero objeto debido a haber recibido una o más vacunas basadas en el material cultivo de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. La respuesta inmunitaria puede incluir la producción de uno o más anticuerpos en respuesta al antígeno o inmunógeno presente en la vacuna. "Respuesta inmunitaria" en un sujeto se refiere al desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria celular o una respuesta inmunitaria humoral y una celular a un antígeno. Las respuestas inmunitarias pueden determinarse usando inmunoensayos y ensayos de neutralización convencionales, que se conocen en la técnica.

Pueden usarse vacunas hechas de material cultivado de acuerdo con la presente invención para prevenir la infección dentro de un mamífero objeto, proteger a un mamífero objeto o tratar a un mamífero objeto.

"Prevención de la infección" y expresiones similares significan prevenir o inhibir la replicación de la bacteria que provoca la enfermedad identificada, inhibir la transmisión de la bacteria o el virus, o evitar que la bacteria se establezca en su animal hospedador, o aliviar los síntomas de la enfermedad provocada por la infección. El tratamiento se considera terapéutico si hay una reducción en la carga bacteriana.

"Protección", "Proteger" y similares, como se usa en el presente documento con respecto a una bacteria, significa que la vacuna previene o reduce los síntomas de la enfermedad provocada por el organismo del que deriva el

antígeno o los antígenos usados en la vacuna. Los términos “protección” y “proteger” y similares, también significan que la vacuna puede usarse para “tratar” la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad que ya existe en un sujeto.

5 “Tratar” se refiere a invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir un trastorno, una afección o una enfermedad a la que se aplica dicho término, o prevenir uno o más síntomas de dicho trastorno, afección o enfermedad. El tratamiento también se refiere a la aceleración de la recuperación de una infección por uno o más organismos *Anaplasmataceae*. “Tratamiento” se refiere al acto de “tratar”.

10 Por lo tanto, pueden usarse vacunas hechas de material cultivado de acuerdo con la presente invención para prevenir infección bacteriana de *Anaplasmataceae* en un mamífero objeto, proteger un mamífero objeto contra bacterias *Anaplasmataceae* y tratar la infección bacteriana de *Anaplasmataceae* en un mamífero objeto. Dicha prevención, protección o tratamiento puede incluir (sin limitación) reducir o eliminar el riesgo de infección por el organismo *Anaplasmataceae* patógeno, mejorar o aliviar los síntomas de una infección por dicho organismo

15 *Anaplasmataceae*, reducción de la carga bacteriana de *Anaplasmataceae*, reducir la incidencia o duración de infecciones por *Anaplasmataceae*, reducir los niveles de proteína de suero de fase aguda de bacterias *Anaplasmataceae*, temperaturas rectales reducidas y/o aumento del consumo de alimentos y/o crecimiento, por ejemplo.

20 “Farmacéuticamente aceptable” como se usa en el presente documento se refiere a sustancias (por ejemplo, adyuvantes, inmunoestimulantes, vehículos, diluyentes, agentes emulsionantes o estabilizantes), que están dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de sujetos sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares indebidos, adecuado para una relación beneficio de frente a riesgo razonable, y eficaz para su uso pretendido. Las sustancias farmacéuticamente aceptables no interfieren con la

25 eficacia del agente terapéutico y no son tóxicas para el sujeto al que se administran.

“Sujeto” o “mamífero objeto” se refiere a cualquier animal que tenga un sistema inmunitario, que incluye mamíferos tales como seres humanos, gatos, vacas, caballos, cerdos y perros.

30 El material cultivado de acuerdo con la presente invención también puede usarse en aplicaciones de diagnóstico para diagnosticar la presencia de enfermedades o dolencias provocadas por bacterias *Anaplasmataceae*. Los ejemplos no limitantes de dichas aplicaciones de diagnóstico incluyen uso de fracciones bacterianas, proteínas u otras biomoléculas en ensayo de unión a anticuerpo. Las fracciones bacterianas, proteínas u otras biomoléculas también pueden usarse para generar anticuerpos policlonales o monoclonales para dichos ensayos.

35 Cultivo de células hospedadoras

Se preparan en primer lugar células hospedadoras para cultivar organismos bacterianos de acuerdo con la presente invención antes de infectar con el organismo bacteriano deseado. Se siembra una muestra de una línea celular

40 embrionaria felina aislada en medio para cultivo en suspensión o adherente. Como se usa en el presente documento, las condiciones de cultivo adherente son en las que una capa de células recubre superficies contenidas dentro de la vesícula en la que se cultivan las células. Las superficies pueden incluir la superficie interna de la vesícula en sí misma o superficies de vidrio o perlas poliméricas contenidas dentro de la vesícula para aumentar el área de superficie. También pueden usarse microvehículos para aumentar el área de superficie y cultivo de células

45 hospedadoras. A diferencia del cultivo adherente, puede ser posible cultivar las células hospedadoras en suspensión, en la que las células hospedadoras no necesitan unirse a superficies dentro de la vesícula de cultivo.

El experto en la materia está en general familiarizado con las variedades de medios de cultivo que pueden usarse para cultivar las células hospedadoras. El medio de cultivo de células hospedadoras puede derivar de animales.

50 Como alternativa, el medio de cultivo de células hospedadoras puede ser vegetal o basado en levadura y puede ser sin proteínas animales. El medio de cultivo puede derivar de extractos de soja o de otras plantas ricas en proteínas o productos alimenticios vegetales ricos en proteínas incluyendo, por ejemplo, legumbres. Los ejemplos no limitantes de medios específicos útiles para cultivar células hospedadoras incluyen Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM), Medio Esencial Mínimo de Glasgow, RPMI1640, OptiMEM, AIM V.

55 El medio de cultivo puede contener o complementarse con suero bovino fetal (FBS), solución de triptosa, solución de hidrolizado de lacto-albúmina, L-glutamina, bicarbonato sódico; hidrolizado de lactalbúmina, Polimixina B, piruvato sódico, glucosa, sulfato de magnesio.

60 El medio de cultivo nuevo puede renovarse o reponerse a las células hospedadoras antes o después de infección o exposición de las células hospedadoras a las bacterias *Anaplasmataceae*.

Las células pueden cultivarse a 36-38 °C durante 2-9 días a CO₂ al 5 %.

65

5 Infección de las células hospedadoras

Las células hospedadoras pueden exponerse a o infectarse con organismos bacterianos de la familia *Anaplasmataceae* poniendo las células hospedadoras en contacto con otras células eucariotas que se sabe que están infectadas con los organismos bacterianos. El experto en la materia está familiarizado con la determinación de si dichas otras células eucariotas de un mamífero, por ejemplo, están infectadas con dichos organismos bacterianos. Las células de mamífero infectadas pueden derivar de cualquier tejido, incluyendo el bazo, hígado, páncreas, pulmones, corazón u otro tejido muscular, cerebro, vesícula biliar, sangre, riñones, ganglios linfáticos o estómago. Las células de mamífero infectadas pueden prepararse a partir de un extracto tisular mediante homogeneización en mezclador en una solución isotónica apropiada. El homogeneizado puede después usarse para inocular (es decir, infectar) un cultivo de células hospedadoras, aplicado como una capa sobre las células hospedadoras o sencillamente puesto en contacto con ellas.

15 Como alternativa, las células hospedadoras pueden exponerse a o infectarse con organismos bacterianos aislados de la familia *Anaplasmataceae*. El experto en la materia está familiarizado con técnicas para aislar dichos organismos bacterianos, o puede obtener reservas de organismos bacterianos aislados de un almacén biológico.

20 El medio de cultivo usado para preparar células hospedadoras antes de contacto con bacterias *Anaplasmataceae* puede ser el mismo que el medio usado para propagar las células hospedadoras después de dicho contacto. Las células hospedadoras expuestas a bacterias *Anaplasmataceae* (o infectadas) pueden cultivarse durante hasta 95 días, hasta 35 días o durante hasta 5 a 10 días, para conseguir un título de $\geq 1 \times 10^4$ DICT₅₀ (Dosis Infecciosa de Cultivo Tisular), y después el cultivo puede recogerse y procesarse.

25 Recogida

Las células hospedadoras infectadas por bacterias *Anaplasmataceae* pueden recogerse recolectando los fluidos y/o las células de cultivo celular tisular. Las células hospedadoras pueden recogerse del medio (y las vesículas de cultivo) con las células bacterianas *Anaplasmataceae* contenidas con las paredes de las células hospedadoras. Como alternativa, durante la recogida la concentración de las bacterias *Anaplasmataceae* puede enriquecerse por técnicas que mejoran la liberación de las células bacterianas infecciosas del sustrato de cultivo, por ejemplo sonicación, congelación y descongelación, calentamiento o lisis enzimática química o selectiva de las células hospedadoras eucariotas. Una recogida enriquecida de bacterias *Anaplasmataceae* puede incluir material que esté libre de células hospedadoras o material de células hospedadoras. Como alternativa, una recogida enriquecida de bacterias *Anaplasmataceae* puede incluir material que contiene células hospedadoras o material de células hospedadoras.

35 Inactivación

El experto en la materia está familiarizado en general con las técnicas por las que las células hospedadoras o bacterianas pueden destruirse o inactivarse. Dichas técnicas incluyen medios físicos, químicos y biológicos. Los ejemplos no limitantes de técnicas de inactivación incluyen sonicación, técnicas de congelación-descongelación, presión, tratamiento con calor, productos químicos o enzimas. Los ejemplos no limitantes de agentes de inactivación química incluyen tratamiento con etilenimina binaria (BEI), formalina (solución de formaldehído), beta-propiolactona, mertiolato, glutaraldehído, dodecil sulfato sódico o similares, o una mezcla de los mismos. Las células hospedadoras pueden también inactivarse por calor o psoraleno en presencia de luz ultravioleta. Estos agentes de inactivación químicos o medios de inactivación físicos también pueden usarse para inactivar las células bacterianas *Anaplasmataceae* después de haberse extraído o separado de las células hospedadoras.

50 Formulación

Las células hospedadoras infectadas, inactivadas o células bacterianas *Anaplasmataceae* enriquecidas pueden actuar como el antígeno y pueden formularse como una suspensión líquida o pueden liofilizarse para su uso en la preparación de una vacuna contra enfermedades provocadas por organismos de *Anaplasmataceae*. El material cultivado de acuerdo con la presente invención puede formularse con cualquier adyuvante, inmunoestimulante, vehículo, diluyente, agente emulsionante o estabilizante farmacéuticamente aceptable, de los que se analizan posteriormente ejemplos no limitantes. El experto en la materia, sin embargo, reconocería que pueden usarse otros adyuvantes, inmunoestimulantes, vehículos, diluyentes, agentes emulsionantes o agentes estabilizantes en la formulación de vacunas basándose en el material cultivado de acuerdo con la presente invención.

60 Adyuvantes e inmunoestimulantes

Un adyuvante en general es una sustancia que refuerza la respuesta inmunitaria de la diana de una manera no específica. Se conocen en la técnica muchos adyuvantes diferentes. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes que pueden usarse en la formulación de una vacuna hecha de material cultivado de acuerdo con la presente invención incluyen sales de aluminio (por ejemplo, alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, óxido de aluminio), colesterol, adyuvantes de monofosforil lípido A, antígeno, tocofenoles, monofosfenil lípido A, dipéptido muramílico,

emulsiones de aceite, glucanos, carbómeros, copolímeros en bloque, adyuvante de lípido de Avridina-amina, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante o no), toxina del cólera, o dipéptido de muramilo, adyuvante Completo e Incompleto de Freund, vitamina E, polímeros en bloque no iónicos y poliaminas tales como dextransulfato, carboxipol, pirano, saponinas y derivados de saponina, co-polímeros en bloque y adyuvantes tales como los identificados en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.578.269, 4.744.983, 5.254.339. Los ejemplos no limitantes de péptidos que pueden actuar como adyuvantes incluyen muramil dipéptidos, dimetilglicina o tuftsina. Los ejemplos no limitantes de aceites que pueden actuar como adyuvantes incluyen aceite mineral, aceites vegetales o emulsiones de los mismos.

Las vacunas hechas de material cultivado de acuerdo con la presente invención pueden formularse como emulsiones de aceite en agua o como emulsiones de agua en aceite. Los ejemplos no limitantes de emulsiones de aceite en agua incluyen emulsiones de aceite en agua de parafina, o emulsiones hechas de una o más de escualeno, copolímeros en bloque de óxido de etileno y óxido de propileno, tensioactivos de polisorbato y/o análogos de treonilo de dipéptido de muramilo.

Los aceites usados como adyuvantes pueden ser metabolizables por el sujeto que recibe la vacuna tales como aceites vegetales o animales. Dichos aceites normalmente consisten principalmente en mezclas de triacilglicérols, también conocidos como triglicéridos o grasas neutras. Estas sustancias no polares, insolubles en agua, son triésteres de ácidos grasos de glicerol. Los triacilglicérols difieren de acuerdo con la identidad y la colocación de sus tres restos de ácidos grasos.

Los adyuvantes también pueden ser no metabolizables consistentes en componentes que no pueden metabolizarse por el cuerpo del sujeto o animal al que se administra la emulsión. Los aceites no metabolizables adecuados para su uso en las emulsiones de la presente invención incluyen alcanos, alquenos, alquinos y sus ácidos y alcoholes correspondientes, los éteres y ésteres de los mismos, y mezclas de los mismos. Los compuestos individuales del aceite pueden ser compuestos de hidrocarburo ligeros, por ejemplo, compuestos que tienen de 6 a 30 átomos de carbono. El aceite puede prepararse o purificarse de forma sintética a partir de productos del petróleo. Los ejemplos no limitantes de aceites no metabolizables para uso en la preparación de vacunas basadas en material cultivado de acuerdo con la presente invención incluyen aceite mineral, aceite de parafina y cicloparafinas. La expresión "aceite mineral" se refiere a un aceite adyuvante no metabolizable que es una mezcla de hidrocarburos líquidos obtenidos de vaselina mediante una técnica de destilación. La expresión es sinónimo de "parafina licuada", "vaselina líquida" y "aceite mineral blanco". También se pretende que la expresión incluya "aceite mineral ligero", es decir, aceite que se obtiene de forma similar por destilación de vaselina, pero que tiene una gravedad específica ligeramente menor que el aceite mineral blanco.

Otros compuestos capaces de potenciar una respuesta de inmunidad tumoral que pueden usarse en la formulación de vacunas basadas en el material cultivado de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitación, copolímero de anhídrido etileno maleico (EMA), emulsiones de látex de un copolímero de estireno con una mezcla de ácido acrílico y ácido metacrílico.

Además del adyuvante, una vacuna basada en material cultivado de acuerdo con la presente invención puede incluir agentes inmunomoduladores tales como, por ejemplo, interleucinas, interferones u otras citocinas (por ejemplo, citocinas relacionadas con Th1, tales como interleucina-12 (IL-12), interleucina-18 (IL-18) o interferón gamma).

La cantidad de adyuvante o inmunoestimulante añadido en una formulación de vacuna basada en material cultivado de acuerdo con la presente invención depende de la naturaleza del adyuvante o inmunoestimulante en sí mismo. El experto en la materia es capaz de seleccionar una cantidad que es suficiente para potenciar una respuesta inmunitaria al agente inmunizante bacteriano de *Anaplasmataceae*.

50 Soportes

Los soportes farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en vacuna formulada basada en material cultivado de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier soporte líquido convencional adecuado para composiciones farmacéuticas veterinarias, incluyendo soluciones salinas equilibradas tales como las adecuadas para su uso en medios de cultivo tisulares. Se entiende que los soportes farmacéuticamente aceptables son compuestos que no afectan de forma adversa a la salud del animal para vacunar, al menos no en la medida en que el efecto adverso es peor que los efectos vistos cuando el animal no está vacunado. Los soportes adecuados también incluyen agua estéril, solución salina, tampones acuosos tales como PBS, disolventes, diluyentes, agentes isotónicos, agentes tamponantes, dextrosa, etanol, manitol, sorbitol, lactosa y glicerol, y similares.

60 Vehículo

Las vacunas formuladas a partir de material cultivado de acuerdo con la presente invención también pueden comprender un vehículo. Un vehículo es un compuesto con el que se adhieren las células hospedadoras, células bacterianas *Anaplasmataceae*, o proteínas, fragmentos proteicos, ácidos nucleicos o partes de las mismas, sin unirse covalentemente al mismo. Los ejemplos no limitantes de dichos vehículos incluyen bio-microcápsulas, micro-

alginatos, liposomas y macrosoles. Algunos materiales que actúan como adyuvantes también pueden actuar como vehículos tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio u óxido de aluminio, sílice, caolín y bentonita, todos conocidos en la técnica.

5 Estabilizadores

Con frecuencia, una vacuna se mezcla con estabilizadores, por ejemplo para proteger los componentes propensos a degradación de su degradación, para potenciar el periodo de validez de la vacuna o para mejorar la eficacia de liofilización. Los ejemplos no limitantes de estabilizadores que pueden añadirse a formulaciones de vacuna basadas en material cultivado de acuerdo con la presente invención incluyen SPGA (Bovarnik *et al.*, 1950, J. Bacteriology, vol. 59, p. 509), leche desnatada, gelatinas, albúmina de suero bovino, carbohidratos (por ejemplo sorbitol, manitol, trehalosa, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa), proteínas (por ejemplo, albúmina, caseína o productos de degradación de las mismas), estabilizadores de origen no animal y tampones (por ejemplo, fosfatos de metales alcalinos). En composiciones de vacuna liofilizadas, pueden añadirse uno o más estabilizadores.

15 Vacunas multivalentes

El inmunógeno recogido del material cultivado de acuerdo con la presente invención puede formularse en una vacuna que comprende uno o más inmunógenos adicionales. El componente o los componentes inactivos adicionales pueden ser parásitos completos, bacterias o virus (inactivados o vivos modificados), o una parte o extracto fraccionado de los mismos (por ejemplo, proteínas, lípidos, lipopolisacáridos, carbohidratos o ácidos nucleicos).

Cuando el inmunógeno recogido del material cultivado de acuerdo con la presente invención se usa en una vacuna canina, pueden añadirse antígenos para otros patógenos caninos a la formulación. Los ejemplos no limitantes de otros patógenos para los que pueden añadirse antígenos adicionales incluyen *Bordetella bronchiseptica*, virus del moquillo canino (CDV), adenovirus caninos de tipos 1 y 2 (CAV-1, CAV-2), virus paragripal canino (CPI), coronavirus canino (CCV), parvovirus canino (CPV), *Leptospira interrogans* serovar *canicola*, *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans* serovar *bratislava*, *Leptospira interrogans* serovar *pomona*; *Leptospira kirschneri* serovar *grippotyphosa*, virus de la rabia, *Borrelia burgdorferi*, rotavirus canino (CRV), herpesvirus canino (CHV), y Virus Diminuto de Caninos (MVC), *Babesia canis*, *Giardia* y *Leishmania*.

Como alternativa, puede administrarse una vacuna basada en material cultivado de acuerdo con la presente invención simultáneamente o conjuntamente con otras vacunas vivas o inactivadas.

35 Liofilización/reconstitución

Por motivos de estabilidad o economía, las vacunas basadas en material cultivado de acuerdo con la presente invención pueden liofilizarse. En general esto permitirá un almacenamiento prolongado a temperaturas por encima de 0 °C, por ejemplo a 4 °C. Los expertos en la materia conocen procedimientos para liofilización; está disponible en el mercado equipamiento para liofilización a diferentes escalas. Para reconstituir la vacuna liofilizada, se puede suspender en un diluyente fisiológicamente aceptable. Dichos diluyentes pueden ser tan sencillos como agua estéril o una solución salina fisiológica u otro vehículo como se ha analizado anteriormente.

45 Dosificación

Las vacunas basadas en material cultivado de acuerdo con la presente invención pueden formularse en una forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y asegurar la uniformidad de dosificación. En el presente documento, una unidad de dosificación en lo que concierne a la composición de vacunas se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de inmunógeno bacteriano de *Anaplasmataceae* que se ha calculado que produce el efecto inmunogénico deseado en asociación con el sistema de adyuvante requerido y vehículo o transportador.

La cantidad inmunizante eficaz de inmunógeno bacteriano de *Anaplasmataceae* puede variar dependiendo de la cepa o las cepas elegidas y puede ser cualquier cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria protectora. Por ejemplo, son adecuadas cantidades en las que la unidad de dosificación comprende al menos aproximadamente 1×10^4 DICT₅₀ de bacterina *Anaplasmataceae* inactivada.

60 Administración

La administración de la vacuna a un sujeto da como resultado estimulación de una respuesta inmunitaria en el mamífero objeto. La vía de administración para vacunas basadas en material cultivado de acuerdo con la presente invención puede administrarse a la diana del mamífero de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, intradérmico, intramuscular, intraocular, intraperitoneal, intravenoso, oral, oronasal y subcutáneo, así como inhalación, supositorio o transdérmico. Las vías de administración incluyen inyección intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, oronasal y subcutánea. La vacuna puede administrarse por

cualquier medio que incluye, pero sin limitación, jeringas, nebulizadores, agentes formadores de bruma, dispositivos de inyección sin aguja o pistolas génicas de bombardeo de microproyectiles (bombardeo Biolístico).

Son vías alternativas de aplicación que son factibles aplicación tópica como una gota, pulverización, gel o pomada al epitelio mucoso del ojo, la nariz, la boca, el ano o la vagina, o a la epidermis de la piel externa en cualquier parte del cuerpo; por pulverización como aerosol o polvo. Como alternativa, la aplicación puede ser mediante la vía alimentaria, combinando con el alimento, pienso o agua para beber por ejemplo como un polvo, un líquido o un comprimido, o mediante la administración directamente a la boca como un líquido, un gel, un comprimido o una cápsula o al ano como un supositorio. La vía de aplicación preferida es mediante inyección intramuscular o subcutánea.

La vacuna de acuerdo con la invención puede estar en varias formas, por ejemplo: un líquido, un gel, una pomada, un polvo, un comprimido o una cápsula, dependiendo del método deseado de aplicación a la diana.

El esquema de la aplicación de la vacuna de acuerdo con la invención al mamífero diana puede ser en dosis individuales o múltiples, que pueden proporcionarse al mismo tiempo o secuencialmente, de una manera compatible con la dosificación y formulación, y en tal cantidad que sea inmunológicamente eficaz.

Modelo de exposición

Para estudiar y evaluar eficazmente los mecanismos patógenos de las bacterias *Anaplasmataceae* y los mecanismos de defensa de los mamíferos hospedadores y de este modo avanzar en la técnica de la vacuna y mejorar los productos de vacuna, debería emplearse un modelo de exposición eficaz.

Un modelo de exposición para ehrliquiosis canina, por ejemplo, puede basarse en el porcentaje de animales de ensayo que demuestran síntomas clínicos persistentes y graves que se asocian habitualmente con ehrliquiosis canina, tales como fiebre, trombocitopenia, descarga ocular mucopurulenta, deshidratación o similares. Como alternativa, puede emplearse el modelo de exposición descrito por la Solicitud de Estados Unidos publicada n.º 2006/0188524. Esta exposición a *E. canis* puede obtenerse en un animal de ensayo administrando a dicho animal de ensayo una reserva de exposición de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que contienen un cultivo virulento de bacterias *E. canis* vivas. El cultivo de *E. canis* virulento se prepara pasando repetidas veces el microorganismo de *E. canis* tal como *E. canis* Ebony, *E. canis* Broadfoot o similares, en un hospedador; separando las PBMC de la muestra de sangre del hospedador; y mezclando las PMBC separadas con suero bovino fetal al 20 % y dimetil sulfóxido al 10 %.

Un método para la inducción de ehrliquiosis canina clínica en un animal de ensayo incluye administrar a dicho animal una cantidad eficaz de una reserva de exposición de *E. canis*, que consiste esencialmente en un microorganismo *E. canis* virulento en células mononucleares de sangre periférica. Se han depositado cultivos viables de cada uno de *E. canis* Broadfoot (en ocasiones denominado *E. canis* BF o Broadfoot) y *E. canis* Ebony (en ocasiones denominado Ebony) (11 de febrero de 2004) en la ATCC, University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 Estados Unidos, y se les han proporcionado respectivamente los números de referencia ATCC PTA-5811 para la cepa Broadfoot y PTA-5812 para la cepa Ebony.

Existen varios otros métodos de diagnóstico celular para determinar la presencia de infección. Por ejemplo, la presencia de invención puede determinarse por inmunofluorescencia directa. Otros métodos para detectar infección incluyen tinción, por ejemplo, Giemsa, Wright/Giemsa. También puede utilizarse Naranja de Acridina para teñir los organismos.

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

Para un entendimiento más claro de la invención, se exponen a continuación los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son únicamente ilustrativos y no se entiende que limiten el alcance o los principios subyacentes de la invención de ninguna manera. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de los ejemplos expuestos posteriormente en el presente documento y la descripción anterior. También se pretende que dichas modificaciones queden dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cultivo de *E. canis* en células FEF en presencia de células DH82

1.1. Propagación de células DH82 no infectadas

Un vial congelado de células DH82 no infectadas (Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) n.º de referencia CRL-10389, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108) se descongeló, se clarificó y se usó para inocular un matraz de cultivo celular de 75 cm² que contenía Medio de Cultivo DH82, y se incubó a 37 °C con CO₂ 5 %. El Medio de Cultivo DH82 consiste en base MEM de Dulbecco complementada con suero bovino fetal (FBS) al 10 % y HEPES 1 %. Tras la formación de una monocapa, las células se rasparon al medio de cultivo, se recogieron y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min. El sedimento celular se resuspendió en 5 ml de Medio de Cultivo DH82 nuevo y se dividió a una relación que varió de 1:3 a 1:5.

1.2. Infección de células DH82 no infectadas con células DH82 infectadas con *E. canis*

Un vial congelado de células DH82 infectadas por *E. canis* (ATCC n.º de referencia CRL – 10390) se descongeló, se clarificó y se usó para inocular un matraz de cultivo de celular de 175 cm² que contenía una monocapa (confluencia del 80-90 %) con aproximadamente 10⁷ células DH82 no infectadas en Medio de Cultivo DH82. Se mantuvieron cultivos de DH82 infectados por *E. canis* renovando, es decir, reemplazando 50 % del medio de cultivo gastado con Medio de Cultivo DH82 nuevo como se ha descrito anteriormente. Se supervisaron los cultivos infectados por *E. canis* usando el método de tinción de Diff-Quik en portaobjetos que contenían células fijadas con acetona de acuerdo con las directrices del fabricante (VWR, West Chester, PA n.º 47733-150) o una técnica de anticuerpo inmunofluorescente convencional (IFA). Brevemente, se incubaron placas que contenían células fijadas en acetona a partir de cultivos DH82 infectados por *E. canis* y no infectados con un suero de perro de *E. canis* policlonal, se lavaron con PBS, se incubaron con IgG gamma de cabra anti-perro marcado con fluoresceína (Kirkegaard y Perry n.º 02-19-02), se lavaron con PBS y se examinaron con un microscopio de fluorescencia.

1.3. Propagación de células FEF no infectadas

Un vía de células de fibroblastos embrionarios felinos congelados (FEF) se descongeló, se clarificó y se usó para inocular un matraz de cultivo celular de 175 cm² que contenía Medio de Cultivo FEF y se incubó a 37 °C con CO₂ 5 %. El Medio de Cultivo FEF consiste en medio M6B8 (base MEM, base Glasgow-MEM, fosfato de triptosa, triptosa, hidrolizado de lacto-albúmina, L-glutamina y bicarbonato sódico) y FBS al 5 %. Después de incubación durante 4-5 días, los cultivos estaban listos para pase cuando la monocapa fue confluyente al 90-95 %. Después del tratamiento con tripsina al 0,25 %, las células se dividieron a una relación de 1:5 a 1:10.

1.4 Infección de células FEF no infectadas con células DH82 infectadas por *E. canis*

Se recogieron células DH82 infectadas por *E. canis* raspando al medio de cultivo, se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 min y se resuspendieron a 1x10⁶ células/ml en Medio de Cultivo DH82 nuevo. Los cultivos de FEF no infectados que se sembraron a 6x10⁵ células por matraz de cultivo celular de 175 cm² en Medio de Cultivo FEF y se incubaron durante 18-24 h a 37 °C con CO₂ 5 % se suspendieron en medio de cultivo y se colocaron en matraces de cultivo celular de 75 cm² a una relación de división de 1:3. Después se usaron seis ml de células DH82 infectadas por *E. canis* resuspendidas para infectar cada matraz de cultivo celular de 75 cm² que contenía células FEF no infectadas en suspensión, y se incubaron a 37 °C con CO₂ 5 %. Los cultivos mixtos DH82/FEF infectados por *E. canis* se suministraron cada tres días reemplazando medio de cultivo gastado con Medio Cultivo de FEF nuevo. A los 14 días después de la infección, los cultivos mixtos se dividieron 1:2 y se transfirieron suspensiones celulares a los pocillos de placas de cultivo celular de 24 pocillos a 1 ml por pocillo. Después de incubación durante 16 h a 37 °C con CO₂ 5 %, se transfirieron sobrenadantes de cultivo de los pocillos a portaobjetos, se fijaron con acetona y se evaluaron con respecto a la presencia de infección por *E. canis* usando IFA como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 2: Cultivo de *E. canis* en una población homogénea de FEF

Se infectaron perros por vía intravenosa con 0,5 – 2 ml de células DH82 infectadas por *E. canis* expandidas a partir de células obtenidas de la ATCC como se ha descrito anteriormente. Dichas células DH82 infectadas por *E. canis* se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 5.192.679. Los perros se identificaron positivamente como infectados con *E. canis* mediante PCR de ADN del bazo y de la sangre. El ADN se purificó a partir de muestras de sangre y tisulares usando un Mini Kit de ADN QIAamp (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó PCR en un termociclador robótico RoboCycler® (Stratagene, Ceder Creek, TX) usando reacciones de 25 µl que consistían en 2,5 µl de tampón de reacción 10X (Genscript Corporation, Piscataway, NJ), 0,2 µl de dNTP 100 mM (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), 1 µl de cebador oligonucleotídico 1 (5'-AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG C-3') y cebador oligonucleotídico 2 (5'-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A-3') y 0,2 µl de Taq polimerasa 5U/µl (Genscript Corp.) en un protocolo de termociclación consistente en una etapa de desnaturalización preliminar de 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min, y 72 °C durante 1 min, seguido de una etapa de elongación final de 72 °C durante 10 minutos. Se prepararon homogeneizados en el medio de cultivo nuevo a partir de muestras de bazos, ganglios linfáticos o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de perros infectados por *E. canis* y usados como una superposición para infectar células FEF.

Se inoculó un homogeneizado de bazo infectado por *E. canis* en células FEF no infectadas en dos matraces de cultivo celular de 75 cm² separados que contenían 30 ml de suspensión de células FEF sembrado a 2 x 10⁵

células/ml por matraz llevando el homogeneizado hasta una dilución final 1:10 a 1:100. Después de 18-24 horas de incubación a 37 °C con CO₂ 5 %, el medio de cultivo se reemplazó con 30 ml de Medio de Cultivo FEF nuevo. Después de 5-7 días de incubación, la monocapa celular se tripsinizó y se resuspendió en 5-10 ml de Medio de Cultivo FEF nuevo. Después se inocularon cinco ml de esta suspensión en cada uno de dos matraces de cultivo celular de 175 cm² que contenían 50 ml de Medio de Cultivo FEF. Las células se incubaron después durante 7-10 días a 37 °C con CO₂ 5 %. Para mantener la viabilidad, los cultivos requirieron “suministro”, que se consiguió reemplazando el 50 % del medio de cultivo gastado con Medio de Cultivo FEF nuevo. Después de 10-14 días más de incubación a 37 °C con CO₂ 5 %, las células se tripsinizaron y se resuspendieron como se ha descrito anteriormente. Para mantener la propagación continua, se pasaron de 1 a 2 ml de suspensión de células FEF infectadas a células FEF no infectadas y se incubó a 37 °C con CO₂ 5 %. Los cultivos infectados se pasaron de 7 a 13 veces usando tiempos de incubación que variaban de 4 a 14 días. La presencia de *E. canis* en las células FEF cultivadas se confirmó mediante el uso de IFA y PCR como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 3: Cultivo de *E. canis* en una población homogénea de células FCWF-4

3.1. Propagación de células FCWF-4 no infectadas (ATCC n.º CRL-2787)

Un vial congelado de células de feto completo de *Felis catus*-4 (FCWF-4) no infectadas (ATCC n.º CRL-2787) se descongeló, se clarificó y se usó para inocular un matraz de cultivo celular de 75 cm² que contenía Medio de Cultivo FCWF, y se incubó a 37 °C con CO₂ 5 %. El Medio de Cultivo FCWF consiste en E-MEM (Medio Esencial Mínimo de Eagle con solución salina equilibrada de Earle y L-glutamina 2 mM), piruvato sódico 1,0 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, bicarbonato sódico 1,5 g/litro y FBS 10 %. Después de 4-5 días de incubación, la monocapa confluyente al 90-95 % se trató con tripsina 0,25 % y se dividió a una relación de 1:4 a 1:6.

3.2. Preparación de población homogénea de células FCWF-4 infectadas por *E. canis*

Antes de la infección con *E. canis*, las células FCWF-4 no infectadas se sembraron en un matraz de 175 cm² a 6x10⁶ por matraz y se incubaron durante 18-24 h. Se usó homogeneizado de bazo infectado por *E. canis* para infectar células FCWF-4 como se ha descrito para células FEF excepto que se usó el Medio de Cultivo FCWF en lugar del Medio de Cultivo FEF. La presencia de *E. canis* en las células FCWF-4 cultivadas se confirmó mediante el uso de IFA y PCR como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 4: Cultivo de *E. muris* en una población homogénea de células FEA

4.1 Propagación de células embrionarias felinas FEA no infectadas

Un vial de células embrionarias felinas FEA no infectadas congeladas se descongeló, se clarificó y se usó para inocular un matraz de 75 cm² que contenía Medio de Cultivo FEA, y se incubó a 37 °C con CO₂ 5 %. El Medio de Cultivo FEA consiste en MEM de Dulbecco, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1,0 mM y FBS 10 %. Después de 7 días de incubación, la monocapa confluyente se trató con tripsina 0,25 % y se pasó a una relación de división de 1:2.

4.2 Preparación de población homogénea de células embrionarias felinas FEA infectadas por *E. muris*

Se propagaron células DH82 no infectadas como se ha descrito anteriormente, y se infectaron con *E. muris* usando células DH82 infectadas por *E. muris* (n.º de referencia de ATCC VR-1411 – cepa Asuke). El protocolo para la preparación de materiales e infección esencialmente siguió el protocolo como se ha descrito anteriormente para células DH82 infectadas por *E. canis*, excepto que las células DH82 infectadas por *E. muris* sustituyeron las células DH82 infectadas por *E. canis*. Los ratones se infectaron por vía intraperitoneal con 0,5 ml de células DH82 infectadas por *E. muris*.

Los ratones se identificaron positivamente como infectados con *E. muris* mediante PCR de ADN de bazo y de sangre. El ADN se purificó a partir de muestras sanguíneas y tisulares usando un Mini Kit de ADN QIAamp de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó PCR en un termociclador robótico RoboCycler® (Stratagene) usando reacciones de 25 µl que consistían en 2,5 µl de tampón de reacción 10X (Genscript), 0,2 µl de dNTP 100 mM (Invitrogen), 1 µl de cebador oligonucleotídico 1 10 µM (5'- AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG C-3') y cebador oligonucleotídico 2 (5'- CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A-3'), y 0,2 µl de *Taq* polimerasa (Genscript) en un protocolo de termociclación consistente en una etapa de desnaturalización preliminar de 94 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min, y 72 °C durante 1 min, seguido de una etapa de elongación final de 72 °C durante 10 minutos.

Se prepararon homogeneizados en medio de cultivo nuevo a partir de muestras de bazo obtenidas de ratones infectados por *E. muris* y se usaron en células embrionarias felinas FEA. Se inoculó un ml del homogeneizado de bazo de ratón infectado por *E. muris* en células embrionarias felinas FEA no infectadas en un matraz de cultivo celular de 25 cm² que contenía una monocapa de células embrionarias felinas FEA de 24 h (a ~ 80 % de confluencia) y 8 ml de medio de cultivo FEA a una dilución de homogeneizado final de 1:9. Después de 5-24 horas

de incubación a 37 °C con CO₂ 5 %, el medio de cultivo se reemplazó con 8 ml de Medio de Cultivo FEA nuevo. Después de 5-7 días de incubación, la monocapa celular se tripsinizó y se resuspendió en 2 ml de medio de cultivo FEA nuevo. Se inoculó un ml de esta suspensión de células infectadas por *E. muris* en un matraz de cultivo celular de 75 cm² que contenía una monocapa de células embrionarias felinas FEA de 24 horas y 30 ml de medio de cultivo FEA. Las células se incubaron durante 4-7 días a 37 °C con CO₂ 5 %. Los cultivos infectados se pasaron 5 veces usando tiempos de incubación que variaban de 4-9 días a 37 °C con CO₂ 5 %. Para pase adicional, se usaron 1 a 2 ml de células infectadas que se tripsinizaron y resuspendieron en 4 a 8 ml de medio de cultivo para infectar células embrionarias felinas FEA no infectadas adicionales. Las células infectadas se inocularon en matraces que contenían monocapa de células embrionarias FEA de 24 horas, se incubaron durante 5-48 h a 37 °C con CO₂ 5 %, se renovaron con medio de cultivo nuevo y se incubaron adicionalmente durante 4-9 días a 37 °C con CO₂ 5 %. La presencia de *E. muris* en los cultivos de células embrionarias felinas FEA se confirmó mediante el uso de IFA y PCR, como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 5: Cultivo de *E. muris* en una población homogénea de células FEF

Se prepararon homogeneizados en medio de cultivo a partir de muestras del bazo obtenidas de ratones infectados por *E. muris* como se ha descrito anteriormente y se usó para infectar células FEF, cultivadas como se ha descrito anteriormente. Cada línea celular no infectada se inoculó con 0,5 ml de homogeneizado de bazo infectado por *E. muris* por cada matraz de cultivo celular de 25 cm² que contenía una monocapa de 24 h y 8 ml de medio de cultivo. Esta es una dilución de homogeneizado final de 1:17. Después de 24 horas de incubación a 37 °C con CO₂ 5 %, el medio de cultivo se reemplazó con 8 ml de medio de cultivo nuevo apropiado. Después de 7 días de incubación, la monocapa celular se tripsinizó y los contenidos celulares infectados completos del matraz de 25 cm² se inocularon en un matraz de 75 cm² que contenía 30 ml de medio nuevo (es decir una división 1:3,75). Los cultivos infectados se pasaron 2 veces usando tiempos de incubación que variaron de 7-8 días a 37 °C con CO₂ 5 %. La presencia de *E. muris* se confirmó mediante el uso de IFA y PCR, como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 6: Cultivo de *E. muris* en una población homogénea de células FCWF-4

Se prepararon homogeneizados en medio de cultivo a partir de muestras del bazo obtenidas de ratones infectados por *E. muris* como se ha descrito anteriormente y se usó para infectar FCWF-4, cultivadas como se ha descrito anteriormente. Cada línea celular no infectada se inoculó con 0,5 ml de homogeneizado de bazo infectado por *E. muris* por cada matraz de cultivo celular de 25 cm² que contenía una monocapa de 24 horas y 8 ml de medio de cultivo. Esta es una dilución de homogeneizado final de 1:17. Después de 24 horas de incubación a 37 °C con CO₂ 5 %, el medio de cultivo se reemplazó con 8 ml de medio de cultivo nuevo apropiado. Después de 7 días de incubación, la monocapa celular se tripsinizó y los contenidos celulares infectados completos del matraz de 25 cm² se inocularon en un matraz de 75 cm² que contenía 30 ml de medio nuevo (es decir una división 1:3,75). Los cultivos infectados se pasaron 2 veces usando tiempos de incubación que variaban de 7-8 días a 37 °C con CO₂ 5 %. La presencia de *E. muris* en los cultivos de células se confirmó mediante el uso de IFA y PCR, como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 7: Infección de células FEF con células P388D1 infectadas por *N. risticii*

Pueden prepararse materiales para infectar células FEF con *N. risticii* de células P388D1 infectadas por *N. risticii* como se ha descrito anteriormente, o como se ha descrito previamente en Vemulapalli, R. *et al.*, J. Clin. Micro. 33(11): 2987-2993 (1995), como se ha descrito previamente en la Patente de Estados Unidos n.º 4.759.927.

Se añadieron células P388D1 (ATCC n.º de referencia CCI-46) infectadas con la cepa 90-12 de *N. risticii* a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,0006 a 0,0028 en frascos rotatorios de 850 cm² que contenían monocapas de células FEF de 3-4 días de edad. Antes de la infección, el medio de cultivo gastado en los frascos rotatorios se reemplazó con 300 ml del medio de cultivo usado para infección. Después de inoculación a la MOI especificada, los frascos rotatorios se incubaron a 37 °C sin CO₂. El medio de cultivo ensayado incluyó pero sin limitación D-MEM, MEM Earles y M6B8; se usó FBS de 0 a 5 %. Los cultivos infectados se recogieron cuando el efecto citopático (CPE) alcanzó de 75 % a 85 %, que varió de 8-16 días dependiendo de la MOI usada. El CPE observado incluyó hinchamiento, redondeo y desprendimiento de células infectadas. Los cultivos se recogieron golpeando suavemente los laterales de los frascos rotatorios para desprender las células al medio de cultivo. La presencia de infección se confirmó usando un protocolo de IFA convencional en células que se fijaron con acetona 70011> y metanol al 30 % en placas de 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal de *N. risticii* e IgG de cabra marcado con fluoresceína anti-ratón (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX).

Ejemplo 8: Infección de células MA-104 con *E. Muris*

8.1. Propagación de células MA-104 no infectadas

Un vial de células MA-104 congeladas (células epiteliales de riñón de embrión de mono, ATCC n.º de referencia CRL-2378.1) se descongeló, se clarificó y se usó para inocular un matraz de cultivo celular de 75 cm² que contenía Medio de Cultivo MA-104 y se incubó a 37 °C con CO₂ 5 %. El Medio de Cultivo MA-104 consiste en Medio Esencial

Mínimo de Eagle con BSS Earles y L-glutamina 2 mM (EMEM) que se complementa con piruvato sódico 1,0 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, bicarbonato sódico 1,5 g/l, una L-glutamina 1 % adicional y FBS 10 %. Después de la incubación durante 5-7 días, los cultivos estuvieron listos para el paso cuando la monocapa tuvo 90-95 % de confluencia. Después del tratamiento con tripsina 0,25 %, las células se pasaron a una relación de división de 1:5 a t:t0.

8.2. Preparación de población homogénea de células MA-104 infectadas por *E. muris*

Se prepararon homogeneizados a partir de muestras del bazo de ratones infectados por *E. muris* y se usaron para infectar células MA-104. Se usó homogeneizado de bazo de ratón infectado por *E. muris* para solapar células MA-104 en matraces de cultivo celular de 25 cm². Se inocularon monocapas MA-104 de veinticuatro horas de edad a una confluencia de ~85 % con una dilución 1:91 de homogeneizado del bazo (0,1 ml de homogeneizado del bazo en 9 ml de medio de matraz de 24 horas existente).

El Medio de Cultivo MA-104 consiste en medio Esencial Mínimo de Eagle con BSS Earles y L-glutamina 2 mM (EMEM) que se complementa con piruvato sódico 1,0 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, bicarbonato sódico 1,5 g/l, una L-glutamina 1 % adicional y FBS 10 %. Después de 5 días de incubación a 37 °C con CO₂ 5 %, las células se trataron con tripsina y todas las células se resuspendieron en 30 ml de Medio de Cultivo MA-104 nuevo; estos 30 ml se distribuyeron después en un matraz de cultivo celular de 75 cm². Después de 8 días de incubación a 37 °C con CO₂ 5 %, estas células se trataron con tripsina y todas las células se resuspendieron en 50 ml de Medio de Cultivo MA-104 nuevo; estos 50 ml se distribuyeron después en un matraz de cultivo celular de 175 cm². Para pase adicional, se inocularon 3 ml de células infectadas que se tripsinizaron y se suspendieron en 9-10 ml de medio de cultivo en 50 ml de medio de cultivo nuevo en matraces de cultivo celular de 175 cm². Se añadieron células MA-104 no infectadas durante el pase cuando el efecto citopático en las células infectadas parecía avanzado, las células infectadas eran escasas o las células infectadas parecían débiles. El intervalo de incubación para las células infectadas fue de 5-8 días a 37 °C con CO₂ 5 %. La presencia de *E. muris* en las células MA-104 cultivadas se confirmó mediante el uso de IFA.

REIVINDICACIONES

1. Un método para cultivar en continuo *Ehrlichia canis* que comprende:

- 5 i) obtener *Ehrlichia canis*;
ii) obtener células de fibroblastos embrionarios felinos;
iii) infectar las células de fibroblastos embrionarios felinos con dicha *Ehrlichia canis*; y
iv) cultivar en continuo dichas células de fibroblastos embrionarios felinos en medio de cultivo celular embrionario
10 felino en condiciones que conducen a la propagación de las células de fibroblastos embrionarios felinos,
cultivando de este modo en continuo la *Ehrlichia canis*.

2. Un método para cultivar en continuo *Ehrlichia canis* que comprende:

- 15 i) infectar a un perro con *Ehrlichia canis*;
ii) obtener tejido infectado del perro infectado;
iii) obtener células de fibroblastos embrionarios felinos;
iv) poner en contacto las células de fibroblastos embrionarios felinos con el tejido infectado; y
v) cultivar en continuo dichas células de fibroblastos embrionarios felinos en medio de cultivo celular embrionario
20 felino en condiciones que conducen a la propagación de las células de fibroblastos embrionarios felinos,
cultivando de este modo en continuo la *Ehrlichia canis*.

3. El método de la reivindicación 2, en el que el tejido infectado del perro infectado es un homogeneizado de bazo.

4. Una composición que comprende una célula de fibroblastos embrionarios felinos infectada con *Ehrlichia canis*.