

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 131**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2010** **PCT/EP2010/066987**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011** **WO11054951**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2010** **E 10773343 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016** **EP 2499233**

54 Título: **Método para cultivar bacterias Lawsonia intracellularis en células McCoy infectadas de forma persistente**

30 Prioridad:

09.11.2009 EP 09175372
09.11.2009 US 259465 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.03.2017

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim De Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

BIERMANN, YVONNE, MARIA, JOHANNA,
CORINA;
SCHRIER, CARLA, CHRISTINA;
GELDER VAN, PETRUS;
VERDELLEN, BRAM y
LIJSDONK, BARRY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 606 131 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

Método para cultivar bacterias *Lawsonia intracellularis* en células McCoy infectadas de forma persistente

- 5 La presente invención se refiere al cultivo de la bacteria intracelular estricta *Lawsonia intracellularis*, y a su uso para la fabricación de un medicamento, en particular una vacuna, para tratar una infección con bacterias *Lawsonia intracellularis*.

Antecedentes de la invención

- 10 *Lawsonia intracellularis* (denominada también *Lawsonia*) es el agente causante de la enteropatía proliferativa (denominada también enteritis o ileitis) en muchos animales, en particular cerdos, y presenta signos clínicos y síndrome patológico con hiperplasia mucosal de las células epiteliales de la cripta inmaduras, principalmente en el íleo terminal. Otros sitios de los intestinos que pueden estar afectados incluyen el yeyuno, ciego y colon. Los cerdos destetados y adultos jóvenes se ven principalmente afectados por manifestaciones clínicas típicas de pérdida de peso y deshidratación rápida. La enfermedad clínica natural en cerdos se produce en todo el mundo. La enfermedad está regularmente asociada con la presencia de bacterias intracelulares arqueadas, actualmente conocidas como *Lawsonia intracellularis*. En general, la vacunación frente a *Lawsonia intracellularis* ha mostrado ser una medida económicamente eficaz para tratar una infección con *Lawsonia intracellularis*. De esta manera, se puede controlar la ileitis, lo que permite un mejor aprovechamiento del potencial de crecimiento genético del cerdo. Actualmente, existe solo una vacuna en el mercado para proteger frente *Lawsonia intracellularis* denominada Enterisol® Ileitis, comercializada por Boehringer Ingelheim. Esta vacuna es una vacuna viva para administración oral. Se han descrito también otras vacunas, pero no están comercialmente disponibles. En cualquier caso, para la producción comercial de volúmenes sustanciales de una vacuna para tratar una infección con *Lawsonia intracellularis* sería deseable tener un método de cultivo eficaz y económicamente atractivo para estas bacterias intracelulares.

- Del documento EP 843 818 se conoce un método para cultivar bacterias *Lawsonia intracellularis* en células McCoy adheridas a un sustrato (tal como el fondo de un matraz o microtransportadores). Así, se ha demostrado que las células McCoy son células hospedadoras adecuadas para cultivar bacterias *Lawsonia intracellularis*. Se sabe a partir de esta patente que para realizar el pase de un cultivo, en el que crecen actualmente las bacterias *Lawsonia intracellularis* (es decir, para aumentar el número neto de bacterias viables), es preciso incubar células McCoy sin infectar nuevas con un bajo contenido de oxígeno, es decir, por debajo del 18 %; posteriormente, estas células nuevas se inoculan con células McCoy ya infectadas. Se cree que es necesario el pase a células McCoy nuevas ya que las células hospedadoras McCoy infectadas se destruyen en última instancia por las bacterias *Lawsonia intracellularis*. De esta manera, se ha descrito que la infección por *Lawsonia* se disemina a través de células hospedadoras que se lisan y posteriormente liberan las bacterias intracelulares de tal manera que quedan disponibles para infectar otras células. Una desventaja del método conocido es que, en el pase, las células nuevas han de infectarse. Esta es una etapa crítica, que requiere un periodo de tiempo relativamente largo (normalmente de 6 días hasta dos semanas, pero posiblemente incluso más de esto) y tiene un grado alto de incertidumbre con respecto al éxito. Debido a estas características típicas, las etapas de infección adicionales aumentan por tanto significativamente los costes del cultivo de *Lawsonia intracellularis*. Además, con cada etapa de infección adicional *Lawsonia intracellularis* puede adquirir un mayor nivel de atenuación. Esto hace que la técnica de cultivo conocida sea menos atractiva para la producción de bacterias para su uso en vacunas. De esta manera, se han reconocido estas desventajas en la técnica y, por tanto, en el documento WO 2009/088878, las células McCoy infectadas no se pasan a células McCoy nuevas (sin infectar) para cultivar las bacterias *Lawsonia intracellularis*. En su lugar, las células McCoy infectadas se cultivan hasta la infección completa y a continuación se recogen. De esta forma, se puede evitar la etapa de infección repetida cuando se pasan las células McCoy infectadas.

Sumario de la invención

- 50 Sigue habiendo una necesidad de una técnica de cultivo mejorada para las bacterias *Lawsonia intracellularis*. Para esta finalidad, se ha ideado un método para obtener células McCoy infectadas de forma persistente con bacterias *Lawsonia intracellularis* que comprende las etapas de infectar células McCoy con bacterias *Lawsonia intracellularis*, cultivar las células McCoy infectadas en un medio adecuado a una concentración de oxígeno menor del 18 % para llegar a un cultivo de células McCoy infectadas con *Lawsonia intracellularis*, pasar al menos parte del mencionado cultivo a medio fresco y, sin añadir células McCoy sin infectar al medio, cultivar las células McCoy infectadas, contenidas en al menos la mencionada parte, en el medio fresco a una concentración de oxígeno menor del 18 %, para obtener las células McCoy infectadas de forma persistente.
- 60 De forma sorprendente, se ha descubierto que, cuando se cultivan células McCoy infectadas en un medio y en un entorno que soporta el crecimiento de las células McCoy, así como de las bacterias *Lawsonia intracellularis*, y se pasan posterior a medio fresco que no contiene células McCoy no infectadas, y se cultivan de nuevo en dicho medio y entorno, las células McCoy permanecen infectadas mientras siguen creciendo. Frente a las enseñanzas de la técnica anterior, se pueden dispensar etapas de infección repetidas que no solo convierten el cultivo de la bacteria intracelular en algo relativamente sencillo, sino que también disminuye el riesgo de la atenuación en exceso (pérdida de las propiedades inmunógenas adecuadas). Basándose en los presentes resultados, se cree que las células

McCoy infectadas se dividen en múltiples células infectadas. Esta creencia se basa en el presente hallazgo de que las células McCoy, así como las bacterias *Lawsonia* crecen sin ninguna etapa de infección adicional. Puede ser, de esta manera, que las bacterias *Lawsonia* no necesiten dejar células infectadas para infectar otras células hospedadoras McCoy. Sin embargo, no se excluye que el último proceso tenga lugar adicionalmente ya que en el sobrenadante de células McCoy infectadas de forma persistente se pueden encontrar bacterias *Lawsonia* extracelulares. Se señala también que algunas células McCoy infectadas pueden no sobrevivir a la infección por *Lawsonia*. Sin embargo, cuando se usa la presente invención, se puede obtener un aumento neto en las células McCoy infectadas viables, que se denominan células McCoy infectadas de forma persistente.

Se señala que se conocen muchos medios que soportan el crecimiento de células McCoy, así como bacterias *Lawsonia intracellularis*. Hablando de forma general, se sabe comúnmente cómo constituir un medio que soporta el crecimiento de células o bacterias. Para las células, los medios de cultivo clásicos fueron desarrollados originalmente por Eagle, Ham y otros en las décadas de los 50 y 60 del siglo XX. Descubrieron que un medio que cumple las necesidades básicas del crecimiento debe comprender sales inorgánicas, una fuente de nitrógeno (por ejemplo, en la forma de compuestos que contienen nitrógeno tales como péptidos o proteínas), una fuente de carbono y vitaminas. Los medios se tamponan ventajosamente para evitar que llegaran a ser demasiado ácidos o demasiado alcalinos. En esta receta básica, están disponibles muchos constituyentes diferentes. Por ejemplo, se podría optar por componentes derivados de animales para proporcionar los aminoácidos, pero se podrían también seleccionar aminoácidos químicamente definidos. Para los otros compuestos, también son posibles numerosas variaciones. Para cultivar bacterias son necesarios incluso menos requisitos. En resumen, constituir un medio que soporte el crecimiento de las células o de las bacterias es relativamente sencillo en poco tiempo. Sin embargo, la optimización del crecimiento hasta la producción de metabolitos pueden requerir algún tiempo de desarrollo, en particular, cuando se prefiere un medio que esté exento de suero o de otros componentes derivados de animales. Son comúnmente conocidas en la técnica las estrategias para mejorar el comportamiento del medio de fermentación y se han descrito de forma detallada en la bibliografía (véase por ejemplo un artículo de revisión de Kennedy y Krouse en el Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (1999) 23, 456-475). Un medio tan simple como el comúnmente conocido DMEM puede ser suficiente para aplicar la presente invención. El entorno es también no muy crítico, aunque es necesaria una concentración de oxígeno por debajo del 18 % (esto es, por debajo de la concentración de oxígeno en equilibrio con el oxígeno atmosférico normal) para obtener un crecimiento adecuado de las bacterias *Lawsonia intracellularis*.

Se señala también que la realización de pases de células del cultivo (denominado también pases) es un proceso fisiológico completamente diferente del de añadir meramente medio fresco a las células en un cultivo existente. La adición de medio fresco a un cultivo existente (por ejemplo, tal como se conoce a partir del documento WO 2006/056853, ejemplo 1) se lleva a cabo meramente para proporcionar nutrientes que permitan que las células existentes crezcan hasta la confluencia y sigan con vida. La realización de pases significa que las células se resiembran en un medio de cultivo nuevo, normalmente retirando las células de su sustrato y llevándolas a un recipiente de cultivo nuevo, con un sustrato limpio y fresco al cual pueden unirse las células.

La presente invención se refiere también al uso de células McCoy infectadas de forma persistente con bacterias *Lawsonia intracellularis* para cultivar y obtener estas bacterias en forma purificada. El solicitante reconoce que las células McCoy infectadas de forma persistente son muy convenientes para el cultivo de las bacterias *Lawsonia* ya que la infección permanece sin necesitar ninguna etapa de infección adicional. La invención se refiere también a una línea de células McCoy que está infectada de forma persistente con bacterias *Lawsonia intracellularis*. Se ha descubierto que dichas células siguen siendo viables incluso cuando se congelan (en particular a alrededor de -196 °C) y posteriormente se descongelan, y que la infección permanece persistente incluso después de múltiples ciclos de congelación-descongelación. La invención se refiere también al uso de esta línea celular para cultivar bacterias *Lawsonia intracellularis* para la fabricación de un medicamento que contiene estas bacterias (por ejemplo, un producto tal como la vacuna viva Enterisol Ileit, comercialmente disponible de Boehringer Ingelheim) o un derivado de la misma (tal como un extracto, una subunidad, una bacterina, un lisado, etc., derivado directamente de estas bacterias mediante tratamiento químico y/o físico; tales como, por ejemplo, las vacunas conocidas a partir de la solicitud internacional PCT/EP2009/054516, concedida a Intervet International BV) para tratar una infección con bacterias *Lawsonia intracellularis*.

Definiciones

Célula McCoy: un fibroblasto de origen de ratón

Realización de pases (passing): resembrar células cultivadas en medio fresco para dar soporte al crecimiento continuo de las células

Infectadas de forma persistente: ser capaces y permanecer infectadas durante un tiempo indefinidamente largo sin requerir infección repetida

Medio adecuado: medio adecuado para mantener células viables y permitir el crecimiento de las células

Medio fresco: medio que tiene suficientes nutrientes para dar soporte al crecimiento de células o microorganismos

Crecer (células incluyendo bacterias): aumento neto en la cantidad de células viables

Fase de crecimiento: fase durante el cultivo en el que existe un aumento neto en las células viables (o bacterias), por ejemplo, una fase de crecimiento exponencial o fase logarítmica

Suspensión de células: un estado en el que las células están presentes en un medio sin estar adheridas a una superficie

Purificar: aumentar la concentración, eliminando, por ejemplo, impurezas o disminuir el contenido relativo de medio

Tratar una infección: para ayudar al menos en la prevención, mejora o curación de una infección o de la enfermedad o trastorno que surge de esta infección

Realizaciones de la invención

En una realización, se cultivan las células McCoy mientras están adheridas a una superficie. Se ha descubierto que la presente invención funciona particularmente bien cuando las células McCoy se adhieren a una superficie tal como la parte inferior de un matraz de cultivo, placas de una factoría celular, microperlas transportadoras. Se ha descubierto también que la presente invención es muy adecuada para las células McCoy que se cultivan en suspensión. La suspensión de las células tiene la ventaja de que se evita inherentemente un estado de confluencia (de una superficie), y de esta manera, el cultivo de las células McCoy infectadas puede continuar indefinidamente sin la necesidad de transferir células infectadas de una superficie a otra. En particular, en el caso de un cultivo en suspensión, la presente invención puede conducir a una técnica de cultivo continuo en vez de un cultivo discontinuo como se conoce de la técnica anterior. Esto no habría sido posible basándose en el conocimiento de la técnica anterior. En la técnica anterior se ha descrito que para la infectar una célula McCoy desde una célula McCoy, el hospedador celular lisa, después de lo cual las bacterias *Lawsonia* liberadas pueden infectar nuevas células. Se cree sin embargo que dicha infección es muy difícil en células McCoy no polarizadas (no unidas). De ahí, el método del documento EP 843 818 y numerosas publicaciones posteriores del mismo grupo de investigación, que se basan en células McCoy unidas, o el método que se conoce a partir del documento WO 2009/088878 que dispensa etapas de infección adicionales cuando células McCoy infectadas están suspensión para el crecimiento de las bacterias *Lawsonia intracellularis*. La presente realización está por tanto en completo contraste con las enseñanzas de la técnica anterior. Se señala que, en la presente invención, en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, se podría combinar un crecimiento adherente con un crecimiento en suspensión, por ejemplo, en etapas de cultivo subsiguientes o concurrentes.

En otra realización, el pase tiene lugar cuando las células McCoy infectadas están en fase de crecimiento. El solicitante ha descubierto que el cultivo es muy adecuado cuando el pase tiene lugar en un punto temporal en el que las células McCoy están todavía creciendo. Aparentemente, cuando se alcanza un estado estacionario, las células McCoy pueden llegar a algún tipo de estado latente que no se puede abandonar instantáneamente. Puede ser que dicho estado se haya confundido en el pasado con un estado en el que las células McCoy ya no son viables. Sin embargo, antes de que las células McCoy infectadas pierdan la viabilidad, pueden llegar a salir del estado latente y comenzar a crecer de nuevo, por ejemplo, cuando se pasan a un medio fresco. Sin embargo, esto puede tardar algún tiempo, lo que hace que el uso de células McCoy infectadas en dicho estado sea menos preferido. Preferentemente, las células McCoy infectadas están en fase de crecimiento exponencial en el pase. Esto ha demostrado conducir a un método de cultivo muy favorable con respecto a la velocidad de cultivo y al factor de crecimiento (aumento de células infectadas viables con respecto al número de células presente inicialmente).

En una realización del uso de acuerdo con la presente invención, concretamente el uso de células McCoy infectadas de forma persistente con bacterias *Lawsonia intracellularis*, para cultivar y obtener estas bacterias en forma purificada, el uso comprende las etapas de cultivar las células McCoy infectadas de forma persistente en un medio adecuado a una concentración de oxígeno menor del 18 % para llegar a un primer cultivo de células McCoy infectadas con bacterias *Lawsonia intracellularis*, recoger al menos una parte del primer cultivo para obtener un primer lote de bacterias *Lawsonia intracellularis*, pasar otra parte del primer cultivo a un medio fresco, cultivar las células McCoy infectadas contenidas en dicha otra parte del cultivo en el medio fresco a una concentración de oxígeno menor del 18 % para llegar a un segundo cultivo de células McCoy infectadas, y recoger al menos una parte del segundo cultivo para obtener un segundo lote de bacterias *Lawsonia intracellularis*. En esta realización, se emplea un método de cultivo sustancialmente continuo, basándose en las células McCoy infectadas de forma persistente de la presente invención. En esta realización, las células McCoy infectadas se cultivan, por ejemplo, hasta que la velocidad de crecimiento de las células McCoy infectadas comienza a disminuir de forma notable. A continuación, una parte del cultivo se recoge, normalmente la parte principal hasta por ejemplo el 90 % del cultivo, para obtener las bacterias *Lawsonia* para uso adicional. La parte restante del cultivo se pasa a un medio fresco, por ejemplo, añadiendo simplemente medio fresco al recipiente de cultivo. A continuación, esta parte restante, que

contiene una cantidad relativamente pequeña de células McCoy infectadas de forma persistente, se deja después que vuelva a crecer. Tras un crecimiento suficiente, por ejemplo, de nuevo hasta un momento en que la velocidad de crecimiento de las células McCoy infectadas comienza a disminuir de forma notable, puede tener lugar una segunda etapa de recogida, y también, una parte restante puede volver a crecer de nuevo para rellenar el recipiente de cultivo.

Preferentemente, al pasar la dicha otra parte (restante) del primer cultivo se diluye x veces para llegar a una primera densidad celular de células McCoy infectadas; posteriormente, las células McCoy infectadas comprendidas en dicha otra parte se cultivan para llegar a una densidad celular que es al menos x veces mayor que la primera densidad celular, antes de que se recoja la dicha al menos parte del segundo cultivo. De esta forma, se puede asegurar que las etapas se pueden repetir una vez y otra (n veces, siendo n un número natural) sin necesidad de volver a comenzar el cultivo con células McCoy nuevas (sin infectar) y un inóculo nuevo de bacterias *Lawsonia intracellularis*.

En una realización alternativa del uso de células McCoy infectadas de forma persistente, el uso comprende las etapas de cultivar las células McCoy infectadas de forma persistente en un medio adecuado a una concentración de oxígeno menor del 18 % para llegar a un primer cultivo de células McCoy infectadas con bacterias *Lawsonia intracellularis*, que tiene al menos una densidad predeterminada de células McCoy infectadas, pasando una parte del primer cultivo a medio fresco, cultivar las células McCoy infectadas contenidas en dicha parte a una concentración de oxígeno menor del 18 % para llegar a un segundo cultivo de células McCoy infectadas y recoger el segundo cultivo para obtener las bacterias *Lawsonia intracellularis* contenidas en el anterior, añadir medio fresco a la parte restante del primer cultivo, y cultivar las células McCoy infectadas contenidas en esta parte restante del cultivo a una concentración de oxígeno menor del 18 %, para llegar a un cultivo que tiene al menos sustancialmente la misma densidad predeterminada de células McCoy infectadas que el primer cultivo. En este método, se obtiene en primer lugar un cultivo de células McCoy infectadas que tiene al menos una densidad predeterminada de células infectadas. Este cultivo se usa más o menos como un cultivo en espera o cultivo "madre". Una parte de este cultivo madre se cultiva fuera de línea en un recipiente de cultivo diferente, pasando las células McCoy infectadas a un medio fresco contenido en este recipiente. A continuación, las células McCoy infectadas se cultivan en este recipiente, por ejemplo, hasta que el crecimiento de las bacterias *Lawsonia intracellularis* ha alcanzado un máximo. Después de esto, el contenido de este recipiente se recoge para obtener bacterias *Lawsonia intracellularis* purificadas. En ese tiempo, las células McCoy infectadas en el cultivo madre se pasan también añadiendo medio fresco y las células McCoy infectadas se volvieron a cultivar hasta que se alcanzó al menos sustancialmente la misma densidad de células McCoy infectadas que tenía el cultivo madre antes de que la parte anteriormente mencionada se pasara al recipiente diferente. A continuación, una segunda parte de este cultivo madre se puede pasar al recipiente diferente para obtener un nuevo lote de bacterias de *Lawsonia intracellularis*. En una realización, el segundo cultivo (es decir, el cultivo en el recipiente diferente) se recoge en una fase en la que el número de células McCoy infectadas viables está disminuyendo. El solicitante ha descubierto de forma sorprendente que el número de bacterias *Lawsonia* puede aumentar aun significativamente incluso en una situación en la que las células McCoy pierden en última instancia la viabilidad. De esta manera, dejando las células McCoy en el recipiente diferente hasta que la fase en la que pierden la viabilidad, el rendimiento de *Lawsonia intracellularis* puede quedar significativamente aumentado.

Se señala que la presente invención podría permitir también el cultivo de *Lawsonia intracellularis* en el denominado reactor tanque agitado continuo o quimiostato. En dicho sistema, un reactor que contiene células McCoy infectadas de forma persistente con bacterias *Lawsonia intracellularis*, podría recibir continuamente medio fresco y, por otra parte, se podría realizar haber una recogida continua de células McCoy infectadas extrayendo un flujo del contenido mixtos del reactor. Dicho sistema es hasta el momento desconocido para el cultivo de *Lawsonia intracellularis*.

En una realización de cualquiera de los usos de células McCoy infectadas de forma persistente recientemente descubiertos descritos anteriormente, la realización de los pasos tiene lugar cuando las células McCoy infectadas están en una fase de crecimiento, preferentemente en una fase de crecimiento exponencial. Preferentemente, las células McCoy se mantienen en suspensión mientras crecen. Esto último está favorecido significativamente cuando la concentración de Ca^{2+} en el medio es menor de 0,3 mmol/l. Cuando esta concentración está por encima de 0,3 mmol/l las células McCoy tienden a adherirse a la superficie disponible o a formar grumos en el recipiente de la suspensión.

Como se ha señalado anteriormente en el presente documento, la presente invención se refiere también a una línea de células McCoy que está infectada de forma persistente con bacterias *Lawsonia intracellularis*.

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

En este ejemplo, se obtuvieron células McCoy infectadas de forma persistente con *Lawsonia intracellularis*, infectando células adherentes (recientes y no infectadas), haciéndolas crecer en un estado adherente y pasando parte del cultivo en crecimiento a medio fresco, en el que posteriormente volvieron a crecer las células. Para este experimento, se usaron células McCoy (ATCC CRL 1696, lote 194167) de un día de edad sembradas en un matraz T75 (75 cm² de superficie disponible) (Becton Dickinson Falcon, tapón con cierre precinto de color azul, venteadado, de

0,2 m) a una densidad de $0,1 \times 10^5$ células/cm². Las bacterias *Lawsonia* se aislaron de un cerdo de origen estadounidense que padecía enteropatía proliferativa porcina, se concentró y se resuspendió en SPG con FBS al 10 % según los métodos conocidos en la técnica para llegar a un inóculo de *Lawsonia*. El medio usado para cultivar las células y las bacterias es una mezcla 1:1 de medio esencial mínimo de Eagle (MEME) y medio Glasgow modificado por Eagle (GMEM) suplementado con caldo de triptosa fosfato al 0,083 % (p/v), triptosa al 0,1 % (p/v), hidrolizado de lactoalbúmina al 0,12 % (p/v), hidrogenocarbonato de sodio al 0,000245 % (p/v) y suero bovino fetal (FCS) al 10 % (v/v). Los porcentajes son en "volumen", salvo que se indique otra cosa.

Las células McCoy se incubaron en el matraz T75 a 37°C en una atmósfera con un 8 % de O₂, 8 % de CO₂ y N₂ durante una hora. Se añade medio para llegar a un volumen de 25 ml. Después de esto, 0,3 ml del inóculo de *Lawsonia* se añadieron para infectar las células McCoy. Esta mezcla se incubó durante siete días en una atmósfera proporcionada mediante el uso de un Campypack Gaspac (Becton Dickinson; la atmósfera contiene, por tanto 5-12 % de dióxido de carbono, 5-15 % de oxígeno, hidrógeno y nitrógeno) para permitir que las células McCoy infectadas con *Lawsonia* puedan crecer. Después de siete días las células McCoy infectadas se liberaron desde el fondo del matraz, y estas células infectadas se sembraron a una densidad de $0,1 \times 10^5$ células/cm² en un matraz T75 nuevo al que se habían añadido 25 ml del mismo medio. Estas células se hicieron crecer en las mismas circunstancias mencionadas anteriormente en el presente documento para la primera incubación de 7 días. Los resultados se mencionan a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de pasar a un medio fresco para obtener células McCoy infectadas de forma persistente

	Densidad de McCoy al principio [10^5 células/cm ²]	Densidad de McCoy al final [10^5 células/cm ²]	Porcentaje de células McCoy infectadas
Primera incubación (día 0-7)	0,1	1,9	60
Segunda incubación (día 7-14)	0,1	2,4	90

Parece que la incubación consecutiva en condiciones que favorecen el crecimiento de las células McCoy, así como de la bacteria *Lawsonia*, da origen a que se infecten un 90 % de las células McCoy. Estas células se utilizaron como base para ulteriores experimentos descritos más adelante en el presente documento que confirman que estas células son están infectadas de forma persistente.

Ejemplo 2

En este experimento, las células McCoy infectadas de forma persistente obtenidas según el método descrito en el Ejemplo 1 se pasaron varias veces a matraces T75 nuevos. Cada vez, las células infectadas se volvieron a sembrar a una densidad de $0,1 \times 10^5$ células/cm². Otras circunstancias se mantuvieron análogas a las del Ejemplo 1, salvo que el medio se cambió a DMEM suplementado con un 10 % de FCS después de seis pases. Los resultados se indican a continuación en la Tabla 2.

Se destaca que la masa antigénica (MA) de las bacterias *Lawsonia* se estableció usando un ensayo ELISA. Aunque la MA corresponde como mínimo al número de bacterias *Lawsonia* que han crecido en las células McCoy infectadas, se cree que la TCID₅₀ se corresponde mejor se corresponde con el número de bacterias *Lawsonia* viables. La última medida se establece de la siguiente forma: Se hicieron crecer células McCoy en una placa de 96 pocillos (Greiner), a 2×10^4 células/ml, 0,1 ml/pocillo durante un día. La cosecha de *Lawsonia* (sobrenadante y células) se diluyó de 10^1 a 10^8 veces en DMEM + 3,7 g/l de bicarbonato de sodio suplementado con un 10 % (v/v) de FCS, después de lo cual se añadieron 100 ml por pocillo. Las placas se incubaron durante 7 días a 37°C en una atmósfera con 8 % de CO₂, 8 % de O₂ y 3,1 % de H₂. La infección se analizó usando inmunofluorescencia. Los títulos se calcularon con el método de Reed y Munch. "ND" significa que no se determinó la cifra correspondiente (por ejemplo, debido a un fallo práctico o un cambio en las determinaciones de rutina)

Tabla 2

Pase	Densidad de McCoy al final del pase [10^5 células/cm ²]	Masa antigénica [cantidad relativa]	TCID ₅₀ [10^1 log]
1	4,0	77	4,7
2	3,3	180	4,7
3	3,0	ND	5,0
4	ND	966	5,3
...	...	...	...

27	1,4	ND	5,7
28	1,6	ND	6,2

Como se puede observar, las células McCoy infectadas pueden mantenerse durante al menos 28 pases sin añadir células nuevas, simplemente pasando las células infectadas a medio fresco y permitiendo que tanto las células McCoy como las bacterias *Lawsonia* crezcan. En el pase 28, el valor de TCID₅₀ sigue siendo elevado. Este experimento confirma que las células McCoy están infectas de forma persistente con las bacterias *Lawsonia*.

Ejemplo 3

En este ejemplo se utiliza un medio alternativo para mostrar que la presente invención no depende de un determinado tipo de medio. El medio utilizado es un medio DMEM (Gibco) exento de glutamina conocido, suplementado con 10 % de FCS y L-glutamina 4 mM. El resto de circunstancias fueron las mismas que para el Ejemplo 2. Los resultados se indican en el presente documento en la Tabla 3.

Tabla 3

Pase	Densidad de McCoy al final del pase [10^5 células/cm ²]	Masa antigénica [cantidad relativa]	TCID ₅₀ [10^0 log]
1	3,1	786	5,6
2	3,4	2643	5,7
3	2,3	2618	5,3
4	1,4	1365	4,0
5	1,6	1258	5,5
6	1,6	1690	6,1
7	1,3	963	6,3
8	1,4	2511	5,9

Como se muestra, las células McCoy permanecen infectadas durante al menos 8 pases en este medio alternativo, y mantienen el crecimiento en al menos un factor de 13 (incluso hasta un factor de 34) después de cada pase a un medio fresco. La masa antigénica de *Lawsonia* parece fluctuar, pero la dosis infecciosa del tejido de cultivo sigue siendo elevada.

Ejemplo 4

En este ejemplo, el medio usado en el Ejemplo 3 se alteró ligeramente, y también se modificaron las condiciones atmosféricas para observar si esto tenía alguna influencia significativa sobre el cultivo de las células McCoy infectadas de forma persistente. El medio se suplementó con glutatión 3,3 mM y la atmósfera se mantuvo al 8 % de O₂, 8 % de CO₂ y N₂ qs. El resto de circunstancias se mantuvieron iguales a las del Ejemplo 3. Los resultados se indican a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4

Pase	Densidad de McCoy al final del pase [10^5 células/cm ²]	TCID ₅₀ [10^0 log]
1	2,8	5,3
2	3,3	5,4
3	2,9	5,0
4	2,7	5,2

De nuevo, las células McCoy se mantienen infectadas con *Lawsonia intracellularis* y la dosis infecciosa permanece en un nivel adecuado. La adición de glutatión parece tener poco efecto sobre el crecimiento de las células infectadas. La adición de cisteína, sin embargo, tuvo sorprendentemente un efecto significativo sobre el mantenimiento de las células McCoy infectadas de forma persistente (no se muestran los datos en el presente documento).

Ejemplo 5

En este ejemplo, se usó un DMEM convencional que contenía L-glutamina, suplementada con un 10 % de FCS. La atmósfera fue la misma que la usada en el Ejemplo 4. El resto de circunstancias fueron también las mismas que para el Ejemplo 4. Este experimento se llevó a cabo para comprobar los resultados del Ejemplo 2 (manteniendo las células McCoy infectadas de forma persistente durante un elevado número de pases), pero en circunstancias diferentes. Los resultados se indican a continuación en la Tabla 5(solamente se muestran algunos resultados intermedios y el resultado final).

Tabla 5

Pase	Densidad de McCoy al final del pase [10^5 células/cm ²]	TCID ₅₀ [¹⁰ log]
17	2,4	5,4
27	1,4	5,7
28	1,6	6,2
30	2,7	5,7
31	3,0	6,6
37	3,2	6,3
38	3,0	6,3

De nuevo, se muestra que las células McCoy permanecen infectadas con *Lawsonia intracellularis* y que la dosis infecciosa sigue estando a un nivel adecuado para un elevado número de pases.

Ejemplo 6

En este ejemplo, se usó un medio de suspensión para dejar las células en un estado en el que no se adhieran al fondo del matraz T75. El medio consistió en una mezcla 1:1 de DMEM-s (DMEM con alto contenido en glucosa, que no contiene L-glutamina, piruvato de sodio y cloruro de calcio; disponible de Gibco, n.º de artículo 21068-028) que contiene L-glutamina 4 mM y Ex-cell 293 (SAFC Biosciences, n.º catálogo 14570). Esta mezcla se complementó con un 10 % de FCS. La atmósfera de los matraces estaba compuesta por un 8 % de O₂, 8 % de CO₂, 3,1 % de H₂ y 80,9 % de N₂. Otras circunstancias fueron las mismas que para el ejemplo 5 (a saber, el pase de las células a un medio fresco se realizó cada 7 días, las células se sembraron a una densidad de $0,1 \times 10^5$ células/cm²). Esto se confirmó mediante examen microscópico que las células McCoy no se adhieren al fondo del matraz y por lo tanto estaban en suspensión real en el medio. Los resultados se indican a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6

Pase	Densidad de McCoy al final del pase [10^5 células/cm ²]	AM [-]	TCID ₅₀ [¹⁰ log]
1	2,8	1152	ND
2	1,8	383	ND
3	1,8	2385	ND
4	1,5	398	4,7
5	0,8	1731	6,0
6	1,0	5420	ND
7	1,0	1354	ND
8	1,4	4530	ND

Como se puede observar, las células McCoy vuelven a crecer después de cada pase en un factor de 8 (hasta un factor de 28) mientras seguían estando infectadas. La masa antigénica de las bacterias *Lawsonia* fluctúa significativamente, pero, en cualquier caso, después de ocho pases, la masa está en un nivel significativamente mayor que en el punto de partida. Esto significa que las bacterias *Lawsonia* son viables y crecen. La dosis infecciosa en cultivo de tejido se ha establecido solamente en el pase 4 y 5 con fines de confirmación. Puesto que la masa antigénica después del pase 4 parece ser relativamente baja, se decidió medir el valor de la TCID₅₀ para confirmar que el cultivo sigue conteniendo bacterias *Lawsonia intracellularis* infecciosas. Así, este parece ser el caso. Tras el pase 5, tanto la MA como la TCID₅₀ volvieron a un nivel elevado. Dadas las fluctuaciones observadas, puede ser que este medio no sea idóneo para el cultivo en suspensión de células McCoy infectadas de forma persistente. Así, las células permanecen viables e infectadas durante todo el experimento, en el que no se añadieron células McCoy

nuevas.

Ejemplo 7

- 5 El experimento del Ejemplo 6 se repitió en una atmósfera que no contenía hidrógeno (las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono son las mismas que en el Ejemplo 6). Esto es para establecer si el hidrógeno, indudablemente se puede considerar como no esencial para mantener las células McCoy infectadas de forma persistente con *Lawsonia intracellularis*, incluso aunque las células hospedadoras estén en suspensión. Los resultados se indican en la Tabla 7.

10

Tabla 7

Pase	Densidad de McCoy al final del pase [10^5 células/cm ²]	AM [-]
1	2,4	994
2	1,6	390
3	3,1	687
4	3,1	625

15

Parece que las células McCoy infectadas de forma persistente se pueden mantener en suspensión en una atmósfera que no contiene hidrógeno. Las células parecen crecer a al menos un factor de 16 en cada pase. La masa antigénica de *Lawsonia* parece ser algo menor que en el experimento de acuerdo con el Ejemplo 6, pero el número sigue estando a un nivel significativo.

Ejemplo 8

20

En este ejemplo se comprobó si los resultados del Ejemplo 7 se pueden confirmar en un sistema en las que las células McCoy infectadas de forma persistente están en una suspensión de flujo libre, en un fermentador agitado continuo. Para esto, los inventores utilizaron un fermentador de 1250 ml que se agitó a 250 r.p.m. El medio tiene una dO₂ del 10 % y el pH se mantiene a 7,2 mediante burbujeo de dióxido de carbono a través del medio. La capa superior del fermentador es de nitrógeno gaseoso. Se añadieron al medio gentamicina (40 mg/l) y un agente antiespumante (Dimethicon, 10,5 mg/l, Caldic Netherlands). Las células McCoy se sembraron a $0,3 \times 10^6$ células/ml, y se pasaron dos veces. De esta forma, se puede establecer si las células McCoy persistentes y la infección por *Lawsonia* se puede mantener en estas circunstancias por sí mismas. Los resultados se indican a continuación en la Tabla 8.

30

Tabla 8

Pase	Densidad McCoy al principio [10^6 células/cm ³]	Densidad McCoy al final [10^6 células/cm ³]	TCID ₅₀ [¹⁰ log]
1	0,3	3,3	3,6
2	0,3	3,0	3,5

35

Estos resultados indican que las células McCoy infectadas de forma persistente se pueden mantener también en suspensión de flotación libre, incluso en un medio (atmósfera) que no contiene hidrógeno. Las células crecieron al menos en un factor 10 después de cada pase. La dosis infecciosa de cultivo de tejido permanece estable, lo que significa que la infección por *Lawsonia* crece junto con las células McCoy.

Ejemplo 9

40

En este ejemplo se demuestra que las bacterias *Lawsonia* pueden continuar creciendo en las células McCoy incluso si la viabilidad de las últimas células disminuye. Para este experimento, los inventores usaron las células McCoy del pase 17 del Ejemplo 5. Estas células se sembraron a $0,1 \times 10^5$ células/cm² en un matraz T75 en el mismo medio que se usó en el Ejemplo 5. La atmósfera utilizada contiene un 8 % de O₂, 8 % de CO₂, 3,1 % de H₂ y 80,9 % de N₂. La temperatura es 37°C. Tras el pase, las células se incubaron durante 14 días sin añadir medio fresco. En los días 7, 8, 11, 12 y 14, el número de células McCoy viables se determinó junto con la masa antigénica de *Lawsonia*. Los resultados se indican a continuación en la Tabla 9.

45

Tabla 9

día	Densidad de McCoy al final del día [10^5 células/cm ²]	AM [-]
7	2,9	345
8	2,6	821
11	2,2	2719
12	1,4	2659
14	0,5	4297

Parece que, después de siete días, el número de células McCoy viables disminuye rápidamente. La masa antigénica de las bacterias *Lawsonia*, sin embargo, alcanza un nivel muy alto después de 14 días.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener células McCoy infectadas de forma persistente con bacterias *Lawsonia intracellularis*, que comprende:

- infectar células McCoy con bacterias *Lawsonia intracellularis*,
- cultivar las células McCoy infectadas en un medio adecuado a una concentración de oxígeno menor del 18 % para llegar a un cultivo de células McCoy infectadas con bacterias *Lawsonia intracellularis*,
- pasar al menos una parte de dicho cultivo a medio fresco, y
- sin añadir células McCoy no infectadas al medio, cultivar las células McCoy infectadas contenidas en la dicha al menos parte en el medio fresco a una concentración de oxígeno menor del 18 % para obtener las células McCoy infectadas de forma persistente.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** las células McCoy se cultivan mientras están adheridas a una superficie.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** las células McCoy se cultivan mientras están en suspensión.

4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el pase tiene lugar cuando las células McCoy infectadas están en una fase de crecimiento.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** las células McCoy infectadas están en una fase de crecimiento exponencial.

6. Uso de células McCoy infectadas de forma persistente con bacterias *Lawsonia intracellularis* para cultivar y obtener estas bacterias en forma purificada, que comprende las etapas de:

- cultivar las células McCoy infectadas de forma persistente en un medio adecuado a una concentración de oxígeno menor del 18 % para llegar a un primer cultivo de células McCoy infectadas con bacterias *Lawsonia intracellularis*,
- recoger al menos una parte del primer cultivo para obtener un primer lote de bacterias *Lawsonia intracellularis*,
- pasar otra parte del primer cultivo a medio fresco,
- cultivar las células McCoy infectadas contenidas en dicha otra parte del cultivo en el medio fresco a una concentración de oxígeno menor del 18 % para llegar a un segundo cultivo de células McCoy infectadas, y
- recoger al menos una parte del segundo cultivo para obtener un segundo lote de bacterias *Lawsonia intracellularis*.

7. Un uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** en el pase, dicha otra parte del primer cultivo se diluye x veces para llegar a una primera densidad celular de células McCoy infectadas, tras lo cual las células McCoy infectadas comprendidas en dicha otra parte se cultivan para llegar a una densidad celular que es al menos x veces mayor que la primera densidad celular, antes de que se recoja la dicha al menos parte del segundo cultivo.

8. Un uso de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** las etapas de pase y crecimiento se repiten n veces, siendo n un número natural.

9. Uso de células McCoy infectadas de forma persistente con bacterias *Lawsonia intracellularis* para cultivar y obtener estas bacterias en forma purificada, que comprende las etapas de:

- cultivar las células McCoy infectadas de forma persistente en un medio adecuado a una concentración de oxígeno menor del 18 % para llegar a un primer cultivo de células McCoy infectadas con bacterias *Lawsonia intracellularis*, que tiene al menos una densidad predeterminada de células McCoy,
- pasar una parte del primer cultivo a medio fresco, cultivar las células McCoy infectadas contenidas en dicha parte a una concentración de oxígeno menor del 18 % para llegar a un segundo cultivo de células McCoy infectadas y recoger el segundo cultivo para obtener las bacterias *Lawsonia intracellularis* contenidas en el mismo,
- añadir medio fresco a una parte restante del primer cultivo y cultivar las células McCoy infectadas contenidas en dicha parte restante del cultivo a una concentración de oxígeno menor del 18 % para llegar a un cultivo que tiene al menos sustancialmente la misma densidad predeermiinada de células McCoy infectadas que el priner cultivo.

10. Un uso de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** el segundo cultivo se recoge en una fase en la que el número de células McCoy infectadas viables está disminuyendo.

11. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, **caracterizado por que** el pase tiene lugar cuando las células McCoy infectadas están en una fase de crecimiento, preferentemente en una fase de crecimiento exponencial.
- 5 12. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, **caracterizado por que** las células McCoy se mantienen en suspensión durante el cultivo.
13. Un uso de acuerdo con la reivindicación 12 en el que la concentración de Ca^{2+} en el medio es menor de 0,3 mmol/l.