República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0909769-4 B1

(22) Data do Depósito: 16/04/2009

(45) Data de Concessão: 09/07/2024

(54) Título: USO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULAS INTEGRAIS INATIVADAS DE LAWSONIA INTRACELLULARIS CONTENDO CARBOIDRATO

(51) Int.Cl.: A61K 39/106.

(30) Prioridade Unionista: 06/11/2008 EP 08105738.2; 06/11/2008 US 61/111756; 18/04/2008 EP 08154764.8; 18/04/2008 US 61/046161.

(73) Titular(es): INTERVET INTERNATIONAL B.V..

(72) Inventor(es): PAUL VERMEIJ; RUUD PHILIP ANTOON MARIA SEGERS; CARLA CHRISTINA SCHRIER; ANTONIUS ARNOLDUS CHRISTIAAN JACOBS.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009054516 de 16/04/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/144088 de 03/12/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/09/2010

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO NÃO-VIVA CONTENDO CARBOIDRATO, E, USO DA MESMA. A presente invenção refere-se ao uso de uma composição nãoviva contendo carboidrato, o carboidrato sendo também encontrado em células vivas de Lawsonia intracellularis em associação com a membrana celular exterior destas células, para a fabricação de uma vacina para proteção contra uma infecção por Lawsonia intracellularis, a vacina encontrando-se em uma forma adequada para administração sistêmica.

USO DE UMA COMPOSIÇÃO DE CÉLULAS INTEGRAIS INATIVADAS DE *LAWSONIA INTRACELLULARIS* CONTENDO CARBOIDRATO

[001] A presente invenção refere-se a uma vacina para proteção contra uma infecção por *Lawsonia intracellularis*, sendo que uma vacina neste sentido é uma composição que pelo menos proporciona uma diminuição de uma influência negativa da infecção por *Lawsonia intracellularis*, sendo que referida influência negativa é, p. ex., dano ao tecido e/ou sinais clínicos, como ganho de peso diminuído, diarréia, etc.

[002] Enteropatia proliferativa (também denominada enterite ou ileite) em muitos animais, em particular porcos, apresenta um sinal clínico e síndrome patológica com hiperplasia mucosal de células epiteliais imaturas das criptas, primariamente no íleo terminal. Outros sítios dos intestinos que podem ser afetados incluem o jejuno, ceco e colo. Porcos desmamados e adultos jovens são afetados principalmente por manifestação clínica típica compreendendo rápida perda de peso e desidratação. Doença clínica natural em porcos ocorre em todo o mundo. A doença está associada consistentemente com a presença de bactérias curvas intracelulares, presentemente conhecidas como *Lawsonia intracellularis*.

[003] De uma maneira geral, vacinação oral contra *Lawsonia intracellularis* mostrou ser uma medida economicamente eficiente para controlar a ileíte e permitir uma melhor exploração do potencial de crescimento genético do porco (Porcine Proliferative Enteropathy Technical manual 3.0, julho de 2006; obtenível da Boehringer Ingelheim). Adicionalmente, vacinação oral ao invés de parenteral reduzirá a transmissão de infecções transmitidas pelo sangue, como PRRS, via agulhas de multi-uso e a redução de reações do sítio de injeção e agulhas retidas nas carcaças. Ela reduzirá estresses animais e humanos, tempo, custos de trabalho e esforço em comparação com a vacinação individual (McOrist: "Ileitis - One Pathogen, Several Diseases" no Simpósio sobre Ileíte da IPVS em Hamburgo, 28 de

junho de 2004).

[004] Em geral compreende-se que a vantagem de uma abordagem com vacina viva atenuada é que a eficácia da imunidade usualmente é relativamente boa porque o sistema imune do hospedeiro é exposto a todas as propriedades antigênicas do organismo de uma maneira mais "natural". Particularmente para agentes antibacterianos intracelulares, como *Lawsonia intracellularis*, acredita-se que a abordagem com vacina viva atenuada oferece a melhor proteção disponível para animais vacinados, devido a uma resposta imune total e apropriada à base de células T. Isto contrasta com a imunidade de variável a fraca associada com os tipos de vacina de subunidade ou morta para bactérias intracelulares. Isto também é particularmente verdadeiro para bactérias intracelulares obrigatórias, como *Lawsonia intracellularis* ou a Chlamydia sp, que causam infecções patogênicas no interior da mucosa. Estudos indicam que formas atenuadas vivas integrais das bactérias intracelulares em questão são fornecidas da melhor forma à mucosa-alvo, que elas são necessárias como formas bacterianas vivas integrais para produzir uma resposta imune plenamente protetora na mucosa-alvo, mas que elas também são imunologicamente superiores em comparação com o uso de componentes bacterianos parciais.

[005] Tornou-se compreensão geral que uma vacina contra *Lawsonia intracellularis* precisa ser administrada oralmente (ver i.a. Technical Manual 3.0 como referido acima). Isto baseia-se no fato de que a base da resistência do corpo à ileíte é a imunidade local no intestino, que é o produto de imunidade mediada com célula e defesa local via anticorpos, particularmente IgA. De acordo com o conhecimento corrente, anticorpos do soro (IgG) não proporcionam qualquer proteção simplesmente porque eles não atingem o lúmen do intestino. Demonstrou-se em estudos que a vacinação oral produz imunidade mediada com célula e também produção local de IgA no intestino (Murtaugh, em Agrar- und Veterinar-Akademie, Nutztierpraxis Aktuell,

edição 9, junho de 2004; e Hyland et al. em Veterinary Immunology e Immunopathology 102 (2004) 329-338). Em contraste, administração intramuscular não levou a proteção. Além disso, em seguida à compreensão geral de que uma vacina bem sucedida contra bactérias intracelulares precisa induzir imunidade mediada com célula e também a produção de anticorpos locais, a pessoa versada na arte sabe que apenas um percentual muito baixo de antígenos ingeridos oralmente é efetivamente absorvido pelos enterócitos, e que a incorporação de *Lawsonia intracellularis* na célula é um processo ativo iniciado pela bactéria. Assim, uma vacina inativada poderia dotar o intestino com antígeno imunogênico insuficiente (Haesebrouck et al. em Veterinary Microbiology 100 (2004) 255-268). Esta é a razão porque se acredita que apenas vacinas vivas atenuadas induzem suficiente proteção mediada com célula nas células intestinais (ver Technical Manual 3.0 como referido acima). Presentemente há apenas uma vacina no mercado para proteger contra *Lawsonia intracellularis*, viz. Enterisol® Ileitis comercializada pela Boehringer Ingelheim. Esta vacina é efetivamente uma vacina viva para administração oral.

[006] É um objeto da presente invenção proporcionar uma vacina alternativa para proteger contra uma infecção por *Lawsonia intracellularis*. Para tanto concebeu-se o uso de uma composição não-viva contendo carboidrato, sendo que o carboidrato também é encontrado em células vivas de *Lawsonia intracellularis* em associação com a membrana celular exterior destas células, para a fabricação de uma vacina para proteção contra uma infecção por *Lawsonia intracellularis*, sendo que a vacina encontra-se em uma forma adequada para administração sistêmica. Surpreendemente, contra o entendimento geral persistente de como combater *Lawsonia intracellularis*, verificou-se que usando uma composição não-viva contendo carboidrato, por exemplo, extraída da membrana celular exterior de *Lawsonia intracellularis*, como um antígeno em uma vacina, é possível induzir uma proteção contra

Lawsonia intracellularis que é comparável, ou mesmo melhorada, com relação à proteção proporcionada pelo uso da vacina viva Enterisol ® Ileitis (administrada de acordo com as instruções correspondentes), quando o antígeno é administrado sistemicamente, i.e. de uma maneira que ele atinja o sistema circulatório do corpo (compreendendo o sistema cardiovascular e linfático), desta forma afetando o corpo como um todo, ao invés de um lócus específico, como o trato gastrintestinal. A administração sistêmica pode ser realizada, p. ex., administrando-se os antígenos no tecido muscular (intramuscular), na derme (intradérmica), sob a pele (subcutânea), sob a mucosa (submucosal), nas veias (intravenosa) etc. Além da muito boa proteção que pode ser obtida, uma vantagem importante da presente vacina não-viva é que ela é uma segurança inerente quando comparada com uma vacina viva.

[007] De uma maneira geral, a composição contendo carboidrato pode ser usada para fabricar uma vacina com o uso de métodos conhecidos na arte que compreendem basicamente misturar a composição antigênica contendo carboidrato (ou uma composição derivada da mesma, como uma diluição ou concentrado da composição original ou um extrato, um ou mais componentes purificados etc.) com um veículo farmaceuticamente aceitável, p. ex., um veículo líquido, como água (opcionalmente tamponada) ou um veículo sólido, como usado comumente para se obter vacinas secadas por congelamento. Assim, a fabricação pode ocorrer em um ambiente industrial, mas os antígenos também poderiam ser misturados com os outros constituintes de vacina in situ (i.e. em uma veterinária, uma fazenda etc.), p. ex., (imediatamente) precedendo a administração efetiva a um animal. Na vacina, os antígenos deveriam estar presentes numa quantidade imunologicamente efetiva, i.e. numa quantidade capaz de estimualr o sistema imune do animal-alvo suficientemente para, pelo menos, reduzir os efeitos negativos de uma exposição pós-vacinação com microorganismos de tipo

selvagem. Opcionalmente adiciona-se outras substâncias, como adjuvantes, estabilizantes, modificadores de viscosidade ou outros componentes, dependendo do uso desejado ou das propriedades requeridas da vacina. Para vacinação sistêmica muitas formas são adequadas, em particular formulações líquidas (com antígenos dissolvidos, emulsificados ou suspensos) mas também formulações sólidas, como implantes ou uma forma intermediária, como um veículo sólido para o antígeno suspenso em um líquido. A vacinação sistêmica, em particular a vacinação parenteral (i.e. não através do canal alimentar), e formas adequadas (físicas) de vacinas para vacinação sistêmica são conhecidas há mais de 200 anos.

[008] Observa-se que subunidades de células de *Lawsonia intracellularis* foram reportadas como antígenos em uma vacina para proteção contra esta bactéria. No entanto, estas são particularmente proteínas recombinantes e, até aqui nenhuma delas provou ser capaz de proporcionar boa proteção. Bactérias mortas (que contêm inerentemente o carboidrato que também é encontrado em células vivas de *Lawsonia intracellularis* em associação com a membrana exterior da célula) também são sugeridas como antígenos em vacinas contra *Lawsonia intracellularis*, mas não se testou efetivamente vacinas baseadas em células integrais mortas e não se reportou proporcionarem boa proteção. Além disso, a administração sistêmica não foi usada em conjunto com estas bactérias mortas, devido à compreensão geral de que não há expectativa razoável de sucesso para a administração sistêmica de antígenos para se combater localmente (i.e. nos intestinos) *Lawsonia intracellularis*.

[009] Com relação a isso observa-se que no WO 97/20050 (Daratech PTY Ltd) menciona o uso de bactérias de *Lawsonia intracellularis* mortas para imunizar porcos. No entanto, não se menciona administração sistêmica. Com base no conhecimento corrente de que a vacinação só é efetiva mediante administração oral, é de conhecimento geral que a via oral foi a via de

administração escolhida para os experimentos descritos no pedido Daratech. Outro pedido de patente que menciona bactérias mortas é o WO 2005/011731 (Boehringer Ingelheim). No entanto, revela-se efetivamente o uso de uma vacina viva administrada oralmente. Não se mostra que uma vacina morta pode ser efetiva, muito menos que a vacina morta pode ser dada sistemicamente. A EP 843 818 (Boehringer Ingelheim) descreve a administração intramuscular de uma vacina morta (parágrafo [0115] em combinação com o parágrafo [0119]). No parágrafo [0115] afirma-se que as bactérias foram mortas armazenando-se as mesmas a 4°C em condições atmosféricas normais. No entanto, como é de conhecimento comum, nestas condições bactérias de *Lawsonia intracellularis* sobrevivem. Assim, este documento não ensina o objeto da presente invenção. Observa-se também que uma composição contendo carboidrato, em que o carboidrato também é encontrado em células vivas de *Lawsonia intracellularis* em associação com a membrana celular exterior destas células, também é conhecida de Kroll et al. (Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, junho de 2005, 693-699). No entanto, esta composição é usada para diagnósticos. Ainda não foi testada como um antígeno protetor por razões indicadas acima.

[0010] Em uma concretização, a composição contendo carboidrato é material resultante da morte de bactérias de *Lawsonia intracellularis*. Verificou-se que uma maneira muito convincente de proporcionar o carboidrato para uso de acordo com a presente invenção consiste em simplesmente matar células de *Lawsonia intracellularis* e usar o material resultante como uma fonte para o carboidrato. Em teoria, a extração do carboidrato de células vivas também poderia ser realizada (analogamente à criação de células-fantasmas vivas por meio de remoção da parede celular), mas requer técnicas mais sofisticadas e, portanto, mais onerosas. O material como um todo poderia ser usado, p. ex., como uma suspensão de células integrais ou de um lisado de células de *Lawsonia intracellularis*, ou seria

possível purificar e até mesmo isolar o carboidrato removendo-o do material. Este método pode ser realizado usando-se técnicas relativamente simples conhecidas na arte.

[0011] Em uma concretização preferida a composição contendo carboidrato contém células integrais de bactérias de *Lawsonia intracellularis* mortas. Isto provou ser a maneira mais conveniente de proporcionar o carboidrato como um antígeno na vacina. Além disso, a eficácia da vacina é ainda mais incrementada, possivelmente porque esta maneira de oferecer o antígeno ao sistema imune do animal-alvo emula melhor o ambiente natural do carboidrato.

[0012] Em uma concretização a vacina compreende um adjuvante óleo-em-água contendo gotículas de óleo com tamanho sub-micrométrico. De uma maneira geral, um adjuvante é um agente imunoestimulador não-específico. Principalmente, cada substância que é capaz de favorecer ou amplificar um processo particular na cascata de eventos imunológicos, levando finalmente a uma melhor resposta imunológica (i.e. a resposta corporal integrada a um antígeno, em particular uma mediada por linfócitos e envolvendo tipicamente o reconhecimento de antígenos por anticorpos específicos ou linfócitos previamente sensibilizados), pode ser definida como um adjuvante. Mostrou-se que usando um adjuvante óleo em água contendo gotículas de óleo com tamanho sub-micrométrico proporciona uma proteção muito boa contra *Lawsonia intracellularis*. Efetivamente, a aplicação de adjuvantes óleo em água tais quais é comum em conexão com antígenos não-vivos. No entanto, é de conhecimento geral que as melhores propriedades imunoestimuladoras são obtidas quando as gotículas de óleo são de diâmetro grande. Em particular, usa-se gotículas de óleo com um diâmetro abaixo de 1 micrômetro, em particular quando se acredita que segurança é uma questão importante. Nesse caso, deveria-se usar gotículas pequenas porque estas são conhecidas por suscitarem menor dano ao tecido, sinais clínicos etc. No

entanto, no caso de obter proteção para uma desordem associada com o intestino via vacinação sistêmica (como é o caso na presente invenção), deveria-se selecionar gotículas grandes porque se poderia esperar que a resposta imune tenha que ser reforçada significativamente. Em contraste, nós verificamos que usando gotículas de óleo pequenas na composição proporciona-se resultados muito bons com relação à proteção contra *Lawsonia intracellularis*.

[0013] Em uma concretização ainda mais preferida, o adjuvante compreende gotículas de óleo biodegradável e gotículas de óleo mineral, sendo que as gotículas de óleo biodegradável apresentando um tamanho médio que difere do tamanho médio das gotículas de óleo mineral. Mostrou-se que o uso de uma mistura de óleo biodegradável e óleo mineral proporciona resultados muito bons com relação à eficácia e segurança. Adicionalmente a isto, a estabilidade da composição é muito alta, o que é uma vantagem econômica importante. A estabilidade provou ser muito boa, em particular quando o tamanho médio (ponderado por volume) das gotículas de óleo biodegradáveis ou das gotículas minerais situa-se abaixo de 500 nm (de preferência, em torno de 400 nm).

[0014] Em uma concretização, a vacina compreende adicionalmente antígenos de Mycoplasma hyopneumoniae e circovírus porcino. Até o presente vacinas de combinação de *Lawsonia intracellularis* foram sugeridas no estado da arte. No entanto, não muitas combinações do tipo referido foram efetivamente testadas quanto à eficácia. A razão para isto é que se compreende geralmente que a combinação de antígenos com antígenos de *Lawsonia intracellularis* só pode levar à proteção bem sucedida se os antígenos de *Lawsonia* forem proporcionados como células vivas (atenuadas). Com relação a isso nos referimos ao WO 2005/011731, que também sugere todos os tipos de vacinas de combinação baseadas em *Lawsonia intracellularis*. No entanto, com relação à descrição e estrutura de

reivindicações, o pedido de patente, a requerente (Boehringer Ingelheim) parece estar convencido de que só se pode esperar que vacinas de combinação tenham uma possibilidade razoável de sucesso quando antígenos de *Lawsonia* estiverem presentes em forma de células vivas. O mesmo é verdadeiro para o WO2006/099561, também atribuído à Boehringer Ingelheim. Efetivamente, com base no conhecimento comum este é um pensamento óbvio.

[0015] A invenção será explicada adicionalmente usando-se os exemplos a seguir.

[0016] O Exemplo 1 descreve um método para se obter uma composição substancialmente isenta de proteína contendo carboidrato e uma vacina que é preparada usando-se esta composição. O Exemplo 2 descreve um experimento em que uma segunda vacina de acordo com a presente invenção é comparada com a vacina correntemente no mercado e uma vacina experimental compreendendo proteínas de subunidade de *Lawsonia intracellularis*. O Exemplo 3 descreve um experimento em que duas vacinas diferentes de acordo com a presente invenção são comparadas com a vacina correntemente no mercado.

[0017] O Exemplo 4 descreve um experimento em que um efeito de dosagem de uma vacina de acordo com a invenção é estabelecido.

Exemplo 1

[0018] Neste exemplo descreve-se um método para obter uma composições de carboidrato substancialmente isenta de proteína associada com a membrana celular exterior de células de *Lawsonia intracellularis* e uma vacina que pode ser preparada usando esta composição. De uma maneira geral, um carboidrato é um composto orgânico que contém carbono, hidrogênio, e oxigênio, usualmente na relação de 1:2:1. Exemplos de carboidratos são açúcares (sacarídeos), amidos, celuloses, e gomas. Usualmente eles servem como uma fonte principal de energia na dieta de animais. Lawsonia intracellularis é uma bactéria gram negativa, que contém,

portanto, uma membrana exterior que não é construída unicamente de fosfolipídeo e proteína, mas também contém carboidratos, em particular polissacarídeo (usualmente polissacarídeos, como lipopolissacarídeo, lipo-oligossacarídeo, ou mesmo não-lipo polissacarídeos).

Fração de carboidrato para preparação de vacina

[0019] Tomou-se vinte mililitros de água tamponada (0,04 M de PBS, solução salina tamponada com fosfato) contendo células de *Lawsonia intracellularis* a uma concentração de 3,7E8 (= 3,7x108) células/ml. As células foram lisadas mantendo-se as mesmas a 100°C durante 10 minutos. Adicionou-se proteinase K (10 mg/ml) em 0,04 M de PBS a uma concentração final de 1,7 mg/ml. Esta mistura foi incubada a 60°C durante 60 minutos para degradar todas as proteínas e manter os carboidratos intactos. Subsequentemente, a mistura foi incubada a 100°C durante 10 minutos para inativar a Proteinase K. O material resultante, que é uma composição contendo carboidrato, em particular contendo os carboidratos como presentes em bactérias vivas de *Lawsonia intracellularis* em associação com sua membrana celular exterior (ver parágrafo below), foi armazenado a 2-8°C até uso posterior. A composição foi formulada em adjuvante Diluvac forte. Este adjuvante (ver também EP 0 382 271) compreende 7,5 porcento em peso de gotículas de acetato de vitamina E com um tamanho ponderado por volume médio de aproximadamente 400 nm, suspenso em água e estabilizado com 0,5 porcento em peso de Tween 80 (polioxietileno sorbitol mono-oleato). Cada vacina de mililitro continha material que havia sido extraído de 1,2E8 células de Lawsonia intracellularis.

Precipitação imune de antígenos de carboidrato de Lawsonia

[0020] Duas bateladas de anticorpos monoclonais (MoAb's) desenvolvidos contra célula integral de *Lawsonia intracellularis* foram precipitadas com Na2SO4 saturado à temperatura ambiente de acordo com procedimentos convencionais. O precipitado foi pelotizado por meio de

centrifugação (10.000 g durante 10 minutos). O pellet foi lavado com 20 % de Na2SO4 e ressuspenso em 0,04 M de PBS. Pérolas Dynal ativadas com Tylosyl (DynaBeads, DK) foram pré-lavadas com 0,1 M de NaPO4 (pH 7,4), de acordo com o manual do fabricante. De cada batelada de MoAb's retirou-se 140 µg e isto foi adicionado a 2E8 de pérolas pré-lavadas e incubadas de um dia para o outro a 37°C. As pérolas foram pelotizadas por meio de centrifugação e removeu-se MoAb's não-ligados por meio de aspiração do sobrenadante. Medições espectrofotométricas mostraram que entre 20 e 35 % dos MoAb's adicionados ligaram-se às pérolas.

[0021] Duas bateladas de 1 ml de células de *Lawsonia intracellularis* (3,7E8/ml) em 0,04 M de PBS foram sonificadas durante 1 minuto. Os lisados de células resultantes foram adicionados às pérolas ativadas com Tylosyl - complexos monoclonais e incubados de um dia para o outro a 4°C. As pérolas ativadas com Tylosyl - complexos monoclonais foram lavadas três vezes com 0,1 M de NaPO4 (pH 7,4). Os compostos ligados foram eluídos lavando-se as pérolas em 0,5 ml de uréia 8M em 0,04 M de PBS (E1); 0,5 ml de glicina 10 mM pH 2,5 (E2); e 0,5 ml de HCl 50 mM (E3), de uma maneira sequencial. Após eluição, E2 e E3 foram neutralizados com 100 µl e 200 µl de 1 M Tris/HCl (pH8,0).

[0022] Obteve-se amostras de cada etapa e [estas] foram carregadas em géis de SDS-PAGE. Géis foram corados usando Commassie Brilliant Blue (CBB) e manchamento prata ou manchados. Os manchamentos foram desenvolvidos usando-se os mesmos MoAb's mencionados acima. Inspeção dos géis e manchamentos mostraram que os MoAb's reconheceram bandas com um peso molecular aparente de 21 e 24 kDa que não foram vistas nos géis de CBB, mas que foram visíveis nos géis manchados com prata [Silver]. Determinou-se também que a fração das células que se ligam aos MoAb's foi resistente à Proteinase K. Assim, com base nestes resultados pode-se concluir que esta fração contém carboidratos (ou seja: toda a proteína é lisada, e

frações de DNA sonificadas não [se] mostrarão como uma banda clara em um manchamento com prata [Silver]), e que os carboidratos encontram-se em associação com (i.e. fazendo parte de, ou sendo ligados a) a membrana celular exterior de *Lawsonia intracellularis* (ou seja: os MoAb's desenvolvidos contra esta fração também são células integrais de *Lawsonia intracellularis*). Dado o fato de que *Lawsonia intracellularis* é uma bactéria gram-negativa, acredita-se que a composição de carboidrato compreende polissacarídeo(s).

Exemplo 2

[0023] Este experimento foi realizado de uma maneira adequada para formular o antígeno de carboidrato em uma vacina, viz. via uma célula integral morta (também conhecida como bacterina). Como controles usou-se a vacina comercialmente obtenível Enterisol® Ileitis e uma vacina de subunidade experimental compreendendo subunidades de proteína. Em seguida, usou-se animais não-vacinados como um controle.

Projeto experimental do Exemplo 2

[0024] Uma vacina de células integrais inativadas foi preparada como a seguir. Recolheu-se células vivas de *Lawsonia intracellularis* derivadas dos intestinos de porcos com PPE. As células foram inativadas com 0,01 % de BPL (beta-propiolactona). O material resultante, que é inerentemente uma composição não-viva contendo carboidrato no sentido da presente invenção (em particular, porque contém os carboidratos como presentes em bactérias vivas de *Lawsonia intracellularis* em associação com suas membrana exterior da célula), foi formulado em adjuvante Diluvac forte (ver Exemplo 1) a uma concentração de aproximadamente 2,8x108 células por ml de vacina.

[0025] A vacina de subunidade continha P1/2 e P4 recombinante como se sabe da EP 1219711 (as proteínas com 19/21 e 37 kDa respectivamente), e as proteínas recombinantes expressas por genes 5074, 4320 e 5464 como descrito no WO2005/070958. As proteínas foram formuladas em adjuvante Diluvac fortec. A vacina continha aproximadamente

50 μg de cada uma das proteínas por mililitro.

[0026] Usou-se quarenta porcos SPF com 6 semanas de vida. Os porcos foram divididos em 4 grupos de dez porcos cada. O grupo 1 foi vacinado uma vez oralmente (a T=0) com 2 ml de "Enterisol ® Ileitis" vivo (Boehringer Ingelheim) de acordo com as instruções do fabricante. Os grupos 2 e 3 foram vacinados duas vezes intramuscularmente (a T=0 e T=4w) com 2 ml da vacina de células integrais de Lawsonia inativadas e a vacina de combinação de subunidade recombinante como descrita acima, respectivamente. O grupo 4 foi deixado como controle não-vacinado. Em T=6w todos os porcos foram expostos oralmente com mucosa homogeneizada infectada com *Lawsonia intracellularis*. Subsequentemente todos os porcos foram observados diariamente quanto a sinais clínicos de Enteropatia proliferativa porcina (PPE, Porcine Proliferative Enteropathy). Em períodos regulares e após a exposição, recolheu-se dos porcos amostras de sangue sérico (para sorologia) e fezes (para PCR). Em T=9w todos os porcos foram eutanizados e necropsiados. Obteve-se amostras histológicas do íleo e estas foram examinadas microscopicamente.

[0027] O inóculo de exposição foi preparado de mucosa infectada: 500 gramas de mucosa infectada (raspada de intestinos infectados) foram misturados com 500 ml de solução salina fisiológica. Esta mistura foi homogeneizada em um omnimixer durante um minuto a plena velocidade sobre gelo. Todos os porcos foram expostos oralmente com 20 ml de inóculo de exposição a T=6w.

[0028] Em T=0, 4, 6, 7, 8 e 9w obteve-se uma amostra de fezes (quantidades em gramas) e uma amostra de sangue sérico de cada porco e isto foi armazenado até testes ulteriores. As amostras de fezes foram testadas em um teste de PCR quantitativa (Q-PCR) e expressas como o logaritmo da quantidade encontrada em picogramas (pg). Amostras de soro foram testadas no teste IFT comumente aplicado (teste com anticorpos imuno-fluorescentes

para detectar anticorpos contra células de Lawsonia intracellularis no soro). Para classificação histológica obteve-se uma amostra relevante do íleo, fixada em formalina tamponada a 4 %, embutida rotineiramente e cortada em lâminas. Estas lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (corante de HE) e com um manchamento imuno-histoquímico usando anticorpos monoclonais anti-Lawsonia intracellularis (manchamento de IHC). As lâminas foram examinadas microscopicamente. Os marcadores da histologia são como a seguir:

manchamento com HE:
nenhuma anormalidade detectada escore=0
lesão duvidosa escore=1/2
lesões brandas escore=1
lesões moderadas escore=2
lesões severas escore=3
manchamento com IHC:
nenhuma evidência de bactéria L. intracelluaris escore=0
presença duvidosa de bactérias escore=1/2
presença de quantidades pequenas/individuais de
bactérias na lâmina escore=1
presença de quantidades moderadas de bactérias
na lâmina escore=2
presença de grandes números de bactérias na lâmina escore=3

[0029] Todos os dados foram registrados para cada porco individualmente. O marcador por grupo foi calculado como a média dos animais positivos para os diferentes parâmetros após a exposição. Usou-se o teste U de Mann-Whitney não-paramétrico para avaliar a significância estatística (testado em dois lados e nível de significância ajustado em 0,05).

Resultados do Exemplo 2

Sorologia

[0030] Antes da primeira vacinação todos os porcos foram soronegativos quando testados para titulações de anticorpos no IFT. Após a vacinação com a bacterina de células integrais (grupo 2) porcos desenvolveram altas titulações de anticorpos no IFT enquanto que os controles e os porcos vacinados com a vacina de subunidade permaneceram negativos até a exposição (Tabela 1). Dois dos porcos vacinados com Enterisol® (grupo 1) desenvolveram titulações moderadas no IFT enquanto que todos os outros porcos neste grupo permaneceram soronegativos. Após a exposição todos os porcos desenvolveram altas titulações de anticorpos no IFT. Resultados médios são ilustrados na tabela 1 (com a diluição usada, 1,0 foi o nível de detecção no lado inferior).

Tabela 1. Titulações médias de anticorpos no IFT (2log) de soro de porco após vacinação e exposição

Grupo	T=0 semanas	T=4 semanas	T=6 semanas	T=9 semanas
1	<1,0	1,1	1,7	>11,4
2	<1,0	3,7	>11,8	>12,0
3	<1,0	<1,0	<1,0	>11,6
4	<1,0	<1,0	<1,0	>12,0

PCR em tempo real em amostras de fezes

[0031] Antes da exposição todas as amostras de fezes foram negativas. Após a exposição verificou-se reações positivas em todos os grupos. Grupo 1 (p=0,02), grupo 2 (p=0,01) e grupo 3 (p=0,03) apresentaram um nível de desprendimento significativamente menor em comparação com o controle. Uma sinopse pós-exposição é dada na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados médios de PCR em amostras de fezes (log pg) após vacinação e exposição

Grupo	T=6 semanas	T=7 semanas	T=8 semanas	T=9 semanas	Pós-exposição total
1	0	1,3	3,6	1,8	6,3
2	0	0,8	2,8	1,9	5,5
3	0	0,5	3,8	2,0	5,9
4	0	0,8	4,9	4,9	10,0

Marcadores de histologia

[0032] Grupo 2 apresentou o menor marcador de histologia HE (p=0,05), marcador de IHC (p=0,08) e marcador de histologia total (p=0,08).

Os outros grupos apresentaram marcadores mais elevados e não foram significativamente diferentes do grupo de controle. Ver a Tabela 3.

Tabela 3. Marcador médio da histologia para o íleo.

Grupo	marcador de HE	marcador de IHC	marcador total
1	1,8	1,5	3,3
2	1,3	1,5	2,7
3	1,8	1,6	3,4
4	2,4	2,3	4,7

Conclusões com relação ao Exemplo 2

[0033] Dos resultados pode-se concluir que a administração sistêmica da vacina de células integrais não-vivas de *Lawsonia intracellularis* que contêm inerentemente o carboidrato como também encontrado em associação com a membrana exterior de células vivas de *Lawsonia intracellularis*, induziu pelo menos proteção parcial. Todos os parâmetros estudados e marcadores de histologia foram significativamente ou quase significativamente melhores em comparação com os controles.

Exemplo 3

[0034] Este experimento foi realizado para testar uma vacina compreendendo uma composição contendo carboidrato como antígeno. Uma segunda vacina a ser testada continha, adicionalmente a células integrais mortas de Lawsonia intracellularis, antígenos de Mycoplasma hyopneumoniae e circovírus porcino (a vacina "combi"). Como um controle usou-se a vacina comercialmente obtenível Enterisol® Ileitis. Em seguida a isto, usou-se animais não vacinados como um segundo controle.

Projeto experimental do Exemplo 3

[0035] A vacina baseada em uma composição contendo carboidrato substancialmente isenta de proteína foi obtida como descrito no Exemplo 1.

[0036] A vacina combi experimental continha antígeno de células integrais de *Lawsonia intracellularis* inativadas (ver Exemplo 2 para o método usado de proporcionar as bactérias inativadas) em um nível de 1,7x108 células/ml. Em seguida a isto ela continha antígeno PCV-2 inativado (20 μgramas da proteína codificada em ORF 2 de PCV 2 por ml; sendo que a

proteína é expressa em um sistema de expressão de baculovírus como é de conhecimento geral na arte, p. ex., como descrito no WO 2007/028823) e antígeno de Mycoplasma hyopneumoniae inativado (o mesmo antígeno na mesma dose como é conhecido da vacina comercialmente obtenível Porcilis Mhyo®, obtenível da Intervet, Boxmeer, Países Baixos). Os antígenos foram formulados em um adjuvante de emulsão duplo "X". Este adjuvante é uma mistura de 5 partes em volume de adjuvante "A" e 1 parte em volume de adjuvante "B". Adjuvante "A" consiste de gotículas de óleo mineral com um tamanho médio aproximado (ponderado por volume) em torno de 1 μm, estabilizado com Tween 80 em água. Adjuvante "A" compreende 25 % em peso do óleo mineral e 1 % em peso do Tween. O resto é água. O adjuvante "B" consiste de gotículas de acetato de vitamina E biodegradável com um tamanho médio aproximado (ponderado por volume) de 400 nm, também estabilizado com Tween 80. O adjuvante "B" compreende 15 % em peso de acetato de vitamina E e 6 % em peso de Tween 80, o resto é água.

[0037] Usou-se sessenta e quatro leitões SPF com 3 dias de vida. Os porcos foram divididos em quatro grupos de 14 leitões e um grupo de 8 leitões (grupo 4). O grupo 1 foi vacinado intramuscularmente aos 3 dias de vida com 2 ml da vacina combi, seguido de uma segunda vacinação aos 25 dias de vida. O grupo 2 foi vacinado intramuscularmente uma vez com 2 ml de vacina combi aos 25 dias de vida. O grupo 3 foi vacinado oralmente com 2 ml de Enterisol® Ileitis (Boehringer Ingelheim) aos 25 dias de vida de acordo com as prescrições. O grupo 4 foi vacinado intramuscularmente aos 3 e 25 dias de idade com 2 ml da vacina de carboidrato não-proteína. O grupo 5 foi deixado não-vacinado como um grupo de controle de exposição. A 46 dias de vida todos os porcos foram expostos oralmente com mucosa infectada homogeneizada. Subsequentemente todos os porcos foram observados diariamente quanto a sinais clínicos de enteropatia proliferativa porcina (PPE). Em tempos regulares antes e após a exposição obteve-se amostras de

sangue sérico e fezes dos porcos quanto à sorologia e PCR respectivamente. Aos 68 dias de vida todos os porcos foram eutanizados e examinados pós-mortem. O íleo foi examinado histologicamente.

[0038] Os outros tecidos no projeto experimental foram os mesmos como descrito no Exemplo 2, exceto se indicado de outra forma.

Resultados do Exemplo 3

Sorologia

[0039] Antes da primeira vacinação todos os porcos foram soronegativos para titulações de anticorpos de *Lawsonia* no IFT. Após vacinação com a vacina combi (grupos 1 e 2) e a vacina de carboidrato não-proteína (grupo 4), muitos porcos desenvolveram titulações de anticorpos no IFT, enquanto que os controles e os porcos vacinados com Enterisol permaneceram soronegativos até a exposição. Após a exposição todos os porcos (exceto dois no grupo Enterisol) desenvolveram titulações de anticorpos no IFT. Para uma sinopse dos valores médios obtidos, ver Tabela 4 (devido à maior diluição quando comparado com o exemplo 2, o nível de detecção foi de 4,0).

Tabela 4. Titulações médias de anticorpos de *Lawsonia* no IFT (2log) de soro de porco após vacinação e exposição

Grupo	T=3 dias	T=25 dias	T=46 dias	T=67 dias
1	<4,0	<4,0	7,9	10,3
2	<4,0	<4,0	4,8	9,8
3	<4,0	<4,0	<4,0	8,5
4	<4,0	<4,0	6,9	10,6
5	<4,0	<4,0	<4,0	9,0

[0040] Com relação a Mhyo, no início do experimento e também no dia do reforço (25 dias de vida) todos os porcos foram soronegativos para Mhyo. Após a vacinação de reforço o grupo 1 desenvolveu elevadas titulações de anticorpos Mhyo, comparáveis com aquelas obtidas com a vacina comercialmente obtenível.

[0041] Com relação ao PCV, aos 3 dias de vida os leitões apresentaram elevadas titulações de anticorpos de PCV derivados

maternalmente. No dia do reforço (25 dias de vida) os vacinados (grupo 1) apresentaram uma titulação similar em comparação com o grupo 2 e o grupo de controle. A titulação de PCV aos 25 dias de vida foi ligeiramente menor em comparação com a titulação aos 3 dias de vida. Após a vacinação aos 25 dias de vida as titulações do grupo 1 (2 vacinações no dia 3 e 25) e grupo 2 (uma vacinação no dia 25) permaneceram em um nível elevado, enquanto que leitões de controle apresentaram uma diminuição normal em anticorpos derivados maternalmente. As titulações de PCV obtidas são comparáveis com as titulações obteníveis com vacinas comercialmente obteníveis.

PCR em tempo real sobre amostras de fezes

[0042] Três semanas após a exposição, porcos do grupo 1, 2 e 4 apresentaram menos Lawsonia (DNA) em suas fezes, em comparação com os grupos 3 e 5. Apenas as diferenças entre grupo 1 e 3 (Enterisol) e grupo 4 e 3 foram estatisticamente significativas ($p<0,05$, teste U de Mann-Whitney). Para os resultados médios, ver tabela 5.

Tabela 5. Resultados médios de PCR em amostras de fezes (log pg) após vacinação e exposição

Grupo	Valor médio
1	1,0
2	1,2
3	2,0
4	0,6
5	1,8

Marcadores histológicos

[0043] Marcadores de histologia do grupo 1 e 4 foram significativamente menores em comparação com aqueles dos grupos 3 e 5 ($p<0,05$, teste U de dois lados de Mann-Whitney (ver tabela 6). O número de porcos com PPE confirmada foram 2/13 no grupo 1, 6/12 no grupo 2, 12/14 no grupo 3, 2/7 no grupo 4 e 12/14 no grupo de controle 5. Grupos 1 e 4 apresentaram uma incidência significativamente menor de PPE em comparação com grupos 3 e 5 ($p<0,05$, teste exato de dois lados de Fischers).

Tabela 6. Marcador médio de histologia para o íleo.

Grupo	marcador de HE	marcador de IHC	marcador total

1	0,4	0,6	1,0
2	0,7	0,7	1,4
3	1,6	1,4	3,0
4	0,4	0,4	0,8
5	1,9	1,5	3,4

Conclusão do Exemplo 3

[0044] Dos resultados pode-se concluir que a administração sistêmica da bacterina de Lawsonia de células integrais combinada com antígeno de PCV e Mhyo e também a vacina compreendendo o carboidrato (substancialmente isenta de proteína), administrada aos 3 dias de vida e 25 dias de vida, induzem proteção parcial contra infecção experimental por *Lawsonia intracellularis*. É particularmente surpreendente que a vacina é efetiva quando a primeira administração ocorre antes do desmame (mais jovens que 21-25 dias). Observe-se que nos exemplos 2 e 3 as vacinas, no que tange antígenos de Lawsonia, por ml contém material antigênico derivado de mais de 1E8 células de Lawsonia intracellucaris. Dado o fato de que estas vacinas, embora se use adjuvantes brandos (viz. adjuvantes contendo pequenas gotículas e nenhum ou pouco óleo mineral), conferem boa proteção contra ileite, em particular quando comparado com a vacina comercialmente obtenível Enterisol® Ileitis, a dose de antígenos poderia ser reduzida. Isto poderia ser realizado administrando-se menos vacina (tão pouco quanto, p. ex., 0,2 ml, vantajoso para, p. ex., aplicação intradérmica), ou diminuindo-se o teor antigênico da vacina. Com base em análogos na tecnologia de vacinas acredita-se que com uma dose antigênica (por vacinação) derivada de ou contendo 1E7 células, em particular 2,5E7 células ou mais, ainda é possível obter resultados comparáveis ou mesmo melhores do que com a vacina corrente comercialmente obtenível. Dado o fato de que a vacina de combinação proporcionou titulações para anticorpos de Mhyo e PCV a um nível comparável com os níveis obteníveis com vacinas simples comercialmente obteníveis, compreende-se que a vacina de combinação também proporciona proteção contra Mycoplasma hyopneumoniae e circovírus porcino.

Exemplo 4

[0045] Este experimento foi realizado para estabelecer um efeito de dosagem de uma vacina de acordo com a invenção. Também neste experimento usou-se animais não vacinados como um controle.

Projeto experimental do Exemplo 4

[0046] Vacinas de células integrais inativadas foram realizadas como indicado no exemplo 2. O material antigênico foi formulado em adjuvante Diluvac forte a uma concentração de aproximadamente 2,0 x108 células por ml de vacina, respectivamente 5,0X107 e 1,25X107 células por ml de vacina. Usou-se sessenta leitões SPF com 3 dias de vida. Os porcos foram divididos em quatro grupos de 15 porcos cada. Os leitões dos grupos 1, 2 e 3 foram vacinados intramuscularmente (na nuca) aos 3 dias de vida e 25 dias de vida com 2 ml da vacina em cada momento. O grupo 4 foi deixado como controle não-vacinado. Aos 46 dias de vida todos os porcos foram expostos oralmente com bactérias de *Lawsonia* como indicado no exemplo 2. Aos 67 dias de vida todos os porcos foram eutanizados e examinados. Realizou-se testes como indicado no exemplo 2. Em seguida a isso, realizou-se PCR em amostras de mucosa. Para isto, coletou-se uma amostra de íleo de cada animal, onde aplicável de uma área que apresentava espessamento.

Resultados do Exemplo 4

Ganho de peso

[0047] Aos 14 dias e daí em diante ocorreram diferenças significativas no ganho de peso total entre os grupos. O grupo 1 apresentou um ganho de peso total médio de aproximadamente 5350 gramas. No grupo 2 este foi de 5150 gramas. O grupo 3 apresentou um ganho de peso de cerca de 4250 gramas, enquanto que o grupo 4 apresentou um ganho de peso de 4550 gramas.

PCR em tempo real em amostras de fezes

[0048] Três semanas após a exposição verificou-se reações positivas

em todos os grupos. O grupo 1 e grupo 2 apresentaram um nível de desprendimento significativamente menor em comparação com o controle. Uma sinopse pós-exposição do número de animais infectados (como determinado por PCR) é dada na tabela 7.

Tabela 7. Resultado de PCR em amostras de fezes após vacinação e exposição

Grupo	Número de animais infectados após a exposição
1	1/15
2	2/15
3	7/15
4	8/15

PCR em tempo real em amostras de mucosa

[0049] Três semanas após a exposição verificou-se reações positivas em todos os grupos. O grupo 1 e grupo 2 apresentou um nível de desprendimento significativamente menor em comparação com o controle. Uma sinopse pós-exposição do número de animais infectados (como determinado por PCR) é dada na tabela 8.

Tabela 8. Resultado de PCR sobre amostras de mucosa após vacinação e exposição

Grupo	Número de animais infectados após a exposição
1	0/15
2	2/15
3	5/15
4	6/14 (nenhuma amostra do porco nº 8)

Marcadores de histologia

[0050] O marcador total de histologia e o número de animais que foram confirmados como apresentando PPE são ilustrados na tabela 9.

Tabela 9. Marcador médio de histologia para o íleo.

Grupo	Marcador total	Número de animais com PPE
1	0,3	0/15
2	0,8	2/14
3	1,1	4/15
4	1,9	7/15

Conclusão do Exemplo 4

[0051] Contrariamente ao que se esperou, os resultados indicam que há uma diminuição muito súbita do efeito protetor em torno da menor dosagem usada nestes experimentos. Embora a dosagem de material antigênico derivado de 2,5x107 células ainda proporcionasse um efeito

protetor comparável com aquele da vacina comercialmente obtenível, o fato de que a diminuição entre uma dosagem que é apenas 0,6 log maior é tão significante (dificilmente qualquer efeito observado sobre ganho de peso, número de animais infectados e PCR na mucosa; no entanto, ainda uma diminuição no número de animais reconhecidos com PPE), proporcionou a compreensão de que, em geral, uma dose efetiva mínima prática do antígeno pode ser derivada a: uma quantidade de antígenos inferior do que derivada de ou contendo 1x107 células não levará, na prática, nas correntes circunstâncias do mercado, a resultados economicamente relevantes. A razão para a existência deste aparente valor de corte (cut-off) não é 100 % clara. Usualmente espera-se uma diminuição mais gradual na proteção quando a dosagem é reduzida. Pode ser que controlar uma infecção local na mucosa dos intestinos via uma resposta imune derivada sistemicamente necessita de uma quantidade mínima de antígenos. Em seguida ao acima, o efeito surpreendente observado no Exemplo 3, viz. que uma vacina baseada em um antígeno de carboidrato administrada sistemicamente, é efetiva quando a primeira administração ocorre antes do desmame (mais jovens que 21-25 dias), é confirmado neste experimento com o uso de outro adjuvante. Portanto é possível compreender razoavelmente que esta característica é genérica para uma vacina não viva compreendendo um antígeno de carboidrato.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma composição de células integrais inativadas de *Lawsonia intracellularis* contendo carboidrato, o carboidrato também sendo encontrado em células vivas de *Lawsonia intracellularis* em associação com a membrana celular exterior destas células, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de uma vacina para proteção contra enteropatia proliferativa porcina causada por *Lawsonia intracellularis*, em que a composição contendo carboidrato é material resultante da morte de bactérias de *Lawsonia intracellularis* e em que a composição contendo carboidrato contém células integrais de bactérias de *Lawsonia intracellularis* mortas.

2. Uso de uma composição de células integrais inativadas de *Lawsonia intracellularis* contendo carboidrato de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a vacina compreende um adjuvante óleo em água contendo gotículas de óleo com tamanho sub-micrométrico.

3. Uso de uma composição de células integrais inativadas de *Lawsonia intracellularis* contendo carboidrato de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o adjuvante compreende gotículas de óleo biodegradável e gotículas de óleo mineral, as gotículas de óleo biodegradável tendo um tamanho médio que difere do tamanho médio das gotículas de óleo mineral.

4. Uso de uma composição de células integrais inativadas de *Lawsonia intracellularis* contendo carboidrato de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a vacina compreende adicionalmente antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* e circovírus porcino.