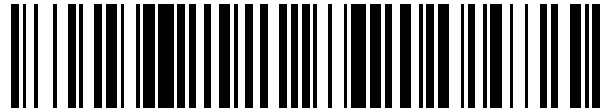


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 392**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2007 E 07804880 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2066340**

54 Título: **Bacterinas tratadas térmicamente y vacunas en emulsión preparadas a partir de tales bacterinas tratadas térmicamente**

30 Prioridad:

11.09.2006 US 843665 P

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

03.12.2013

73 Titular/es:

**ZOETIS P LLC (100.0%)
100 Campus Drive
Florham Park, New Jersey 07932, US**

72 Inventor/es:

**GOODYEAR, MARK DAVIS;
HUETHER, MICHAEL JOHN;
MANNAN, RAMASAMY MANNAR y
OIEN, NANCEE LOIS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 432 392 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

Bacterinas tratadas térmicamente y vacunas en emulsión preparadas a partir de tales bacterinas tratadas térmicamente

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere generalmente al campo de las vacunas y a procedimientos de estabilización de vacunas en emulsión. En particular, la presente invención se refiere a bacterinas tratadas térmicamente, a un procedimiento de producción de bacterinas tratadas térmicamente y a vacunas en emulsión preparadas a partir de tales bacterinas tratadas térmicamente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 La vacunación se usa cada vez más para combatir enfermedades infecciosas en animales. Los adyuvantes se usan frecuentemente en vacunas debido a que pueden aumentar la respuesta inmunitaria humoral y/o celular a un antígeno. Las vacunas se formulan frecuentemente como emulsiones debido a que la emulsión puede actuar de adyuvante y tiene la propiedad de retener el antígeno como un depósito en el sitio de inyección. Los emulsionantes se usan comúnmente en vacunas en emulsión. Además de usar emulsionantes, la estabilidad de las vacunas en emulsión también puede lograrse reduciendo el tamaño de gotita de la emulsión por medios mecánicos.

15 La patente de EE.UU. n° 5.084.269 se refiere a una formulación de adyuvante que contiene lecitina en combinación con aceite mineral que produce menos irritación dentro del animal huésped, y simultáneamente induce elevada inmunidad sistémica. Las composiciones según la patente de EE.UU. 5.084.269 están en uso comercial bajo el nombre comercial AMPHIGEN®, una marca registrada de Pfizer, Inc.

20 Generalmente, los antígenos bacterianos son inestables cuando se calientan e incluso una breve exposición a temperaturas elevadas puede reducir la actividad de los antígenos. Por ejemplo, las actuales vacunas anticarbuncosas pueden perder toda la actividad biológica en 48 horas a 37 °C (S. Sing, N. Ahuja, V. Chauhan, E. Rajasekaran, W. S. Mohsin, R. Bhat, y R. Bhatnagar; Bioche. Biophys. Res. Commun. 2002 Sep. 6; 295(5):1058-62). Zeigler y col. (Bulletin of the Pan American Health Organization, vol.10(N°2):126-130(1976)) describe vacunas basadas en bacterina de *Leptospira* en las que la inactivación se lleva a cabo a 56 °C durante 30 min.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

25 La presente invención se refiere a bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente, a un procedimiento de producción de bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente y a vacunas en emulsión preparadas a partir de tales bacterinas tratadas térmicamente. El procedimiento comprende calentar la bacterina a una temperatura de 60 a 70 °C durante 5 a 10 horas para formar una bacterina tratada térmicamente.

30 La invención proporciona una vacuna en emulsión que comprende (a) una emulsión que comprende un aceite y uno o más emulsionantes, y (b) una bacterina de *Leptospira* tratada térmicamente que comprende una suspensión de bacterias *Leptospira* muertas que tienen una actividad de lipasa del 50% o inferior a la actividad de lipasa de la bacterina antes del tratamiento térmico, y que tienen aceptable actividad antigénica; en la que dicha bacterina de *Leptospira* tratada térmicamente está preparada mediante un procedimiento que comprende calentar la bacterina a una temperatura de 60 a
35 70 °C durante 5 a 10 horas.

La invención proporciona además una vacuna en emulsión que comprende bacterinas de *Leptospira*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona canicola* tratadas térmicamente obtenidas mediante calentamiento de las bacterinas a una temperatura de 65 °C durante 8 horas, y que comprende además AMPHIGEN®, adyuvantes, conservantes y tampón diluyente de manera que la concentración de las bacterinas sea 1200 UN/5 ml de dosis para todas las bacterinas de *Leptospira*, excepto *Leptospira hardjo*, que es 2400 UN/5 ml de
40 dosis, vacuna en emulsión que se ha homogeneizado y microfluidizado, y luego se le ha ajustado el pH a pH 7,0-7,3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

DEFINICIONES

45 Actividad antigénica aceptable - El término "actividad antigénica aceptable" significa la capacidad para inducir una respuesta inmunitaria protectora en animales vacunados después de provocarse o de pasar una prueba de potencia codificada con organismo vivo homólogo.

Bacterina - El término "bacterina" significa una suspensión de bacterias muertas que puede usarse como componente de una vacuna.

Emulsionante - El término "emulsionante" significa una sustancia usada para preparar una emulsión más estable.

Emulsión - El término “emulsión” significa una composición de dos líquidos inmiscibles en la que pequeñas gotitas de un líquido están suspendidas en una fase continua del otro líquido.

Bacterina tratada térmicamente - El término “bacterina tratada térmicamente” significa una bacterina que se ha tratado con calor y que tiene una actividad de lipasa del 50% o inferior a la actividad de lipasa antes del tratamiento térmico, y que tiene actividad antigénica aceptable.

Emulsión inversa - El término “emulsión inversa” significa una emulsión de agua en aceite.

Lipasa - El término “lipasa” significa enzimas esterasas, lipasas y fosfolipasas que pueden producir la rotura de un emulsionante en una vacuna en emulsión.

Emulsión normal - El término “emulsión normal” significa una emulsión de aceite en agua.

10 Emulsión de aceite en agua - El término “emulsión de aceite en agua” significa una emulsión en la que pequeñas gotitas de aceite están suspendidas en una fase acuosa continua.

Temperatura ambiente - El término “temperatura ambiente” significa una temperatura de 18 a 25 °C.

Emulsión de agua en aceite - El término “emulsión de agua en aceite” significa una emulsión en la que gotitas de agua están suspendidas en una fase aceitosa continua.

15 DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a bacterinas de *Leptospira* con actividad de lipasa reducida, vacunas en emulsión preparadas a partir de tales bacterinas y a un procedimiento de reducir la actividad de lipasa de bacterinas. Además de componentes antigénicos, algunas bacterinas tienen actividad de lipasa. Cuando las bacterinas con actividad de lipasa se incorporan en una emulsión, la lipasa puede romper los emulsionantes usados para crear la emulsión. Las vacunas en emulsión que contienen bacterinas que tienen alta actividad de lipasa tienden a ser emulsiones inestables, y aquellas que contienen bacterinas que tienen bajos niveles de lipasa tienden a ser estables. Ejemplos de bacterias que pueden, cuando mueren, producir bacterinas que tienen actividad de lipasa incluyen *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acetobacter paseruianus*, *Aeromonas hydrophila*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Arhaeglobus fulgidus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chromobacterium viscosum*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Lawsonia intracellularis*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella* sp., *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, *Clostridium perfringens*, *Photobacterium luminescens*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas wisconsinensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* C9, *Pseudomonas fluorescens* SIKW1, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas* sp B11-1, *Alcaligenes eutrophus*, *Psychrobacter immobilis*, *Rickettsia prowazekii*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Spirulina platensis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces cinnamomeus*, *Streptomyces exfoliates*, *Streptomyces scabies*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Syechocystis* sp., *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema denticola*, *Treponema minutum*, *Treponema phagedenis*, *Treponema refringens*, *Treponema vincentii*, *Treponema palladium* y especies de *Leptospira*, tales como los patógenos conocidos *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*.

La lipasa, que puede romper los emulsionantes usados para crear la emulsión, y así producir inestabilidad y rotura de la emulsión, puede incluir una o más enzimas que rompen emulsiones tales como esterasas, lipasas y fosfolipasas. Conjuntamente, estas enzimas, esterasas, lipasas y fosfolipasas se denominan lipasa. La actividad de lipasa de una bacteria puede medirse usando un sustrato sintético llamado O-pivaloiloximetilumbeliferona (C-POM). La tasa de hidrólisis producida por la lipasa es la medida de la actividad de lipasa. La tasa de reacción de la hidrólisis producida por la lipasa en esta reacción se monitoriza por un aumento en la intensidad de fluorescencia del producto de la actividad de lipasa. La tasa de reacción depende de las condiciones de prueba de la hidrólisis exactas elegidas, de manera que deben hacerse comparaciones de niveles de actividad de lipasa, medida mediante tasas de hidrólisis, usando los datos producidos por las mismas condiciones de prueba. Procedimientos bibliográficos se desvelan en varios artículos, que incluyen Kurioka S. y Matsuda M. (1976) Ana. Biochem. 75: 281-289, De Silva NS y Quinn PA. (1987) J. Clin. Microbiol. 25: 729-731, y Grau, A., y Ortiz, A. (1998) Chem. Phys. of Lipids. 91: 109-118.

En una vacuna en emulsión, la rotura de la emulsión produce separación de fases de los componentes. Esto es no deseable debido a que cuando hay separación de fases, la dosis individual sacada del recipiente puede no contener el mismo nivel de componentes de vacuna. Además, la pérdida de emulsión puede conducir a una pérdida de la actividad del adyuvante del emulsionante y conducir a una reducción en el efecto antigénico de la vacuna.

Frecuentemente se incluyen virus vivos atenuados en las vacunas junto con bacterinas. Tales vacunas son útiles debido a

que una única vacuna puede usarse para crear inmunidad a diferentes enfermedades con una vacuna. Si la actividad de lipasa está presente en la bacterina, producirá liberación del emulsionante de la emulsión. Este emulsionante libre puede romper e inactivar los virus de la vacuna vivos, conduciendo así a una pérdida de infectividad vírica.

5 Una bacterina útil en vacunas puede formarse cultivando la bacteria de interés, y luego destruyendo las bacterias para producir una bacterina que contiene una variedad de componentes bacterianos, que incluye componentes de la pared celular. Las bacterias pueden destruirse mediante una variedad de procedimientos que incluyen exponerlas a un compuesto tal como mertiolato, formalina, formaldehído, dietilamina, etilenamina binaria (BEI), beta-propiolactona (BPL) y glutaraldehído. Pueden usarse combinaciones de estos compuestos. Además, es posible destruir las bacterias con radiación esterilizante.

10 Ahora se ha encontrado que la actividad de lipasa de una bacterina que tiene tal actividad de lipasa puede reducirse por tratamiento térmico. Específicamente, la actividad de lipasa de una bacterina puede reducirse según la invención mediante calentamiento de la bacterina a una temperatura de 60 a 70 °C para formar una bacterina tratada térmicamente que tenga actividad antigénica aceptable. El tratamiento térmico se realiza durante un periodo de tiempo suficiente de manera que la actividad de lipasa de la bacterina tratada térmicamente sea del 50% o inferior a la encontrada en la
15 bacterina antes del tratamiento térmico. Para la buena estabilidad de la vacuna en emulsión es necesario que la actividad de lipasa se reduzca a cero. Los presentes inventores han encontrado que las vacunas que tienen una buena caducidad pueden prepararse a partir de bacterinas tratadas térmicamente que tienen nivel de actividad de lipasa que es del 50% o inferior al nivel de actividad de lipasa antes del tratamiento térmico.

20 Si una tasa de hidrólisis de un sustrato de prueba se ha usado como medida de la actividad de lipasa de una bacterina, entonces la tasa de hidrólisis del sustrato de prueba antes del tratamiento térmico se compara con la tasa de hidrólisis después del tratamiento térmico. El tratamiento térmico se realiza de manera que se reduzca la tasa de hidrólisis al 50% o inferior a la tasa de hidrólisis que se observa para la bacterina fresca.

25 El procedimiento exacto de medir el nivel de actividad de lipasa no es crítico mientras que el procedimiento se use para medir la actividad antes del tratamiento térmico y la actividad después del tratamiento térmico. Por ejemplo, si la tasa de hidrólisis de un sustrato de prueba se mide usando un sustrato, un sustrato diferente podría producir una tasa diferente. Sin embargo, si el mismo sustrato se usa para la determinación de actividad inicial y la determinación de actividad después del tratamiento, las tasas relativas mostrarán todavía el efecto del tratamiento térmico.

30 Para las bacterinas que comprenden una o más de las siguientes, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira pomona*, hay una prueba codificada para actividad antigénica (9CFR § 113.101, §113.102, §113.103, §113.104 y §113.105). Para estas especies, la actividad antigénica aceptable se define como la capacidad para inducir una respuesta inmunitaria protectora en hámsteres vacunados de forma que cuando los hámsteres se provoquen con bacterias vivas homólogas, al menos el 75% de los hámsteres vacunados sobrevivan en un modelo en el que al menos el 80% de los hámsteres no vacunados no sobreviven. En el caso del antígeno *Leptospira hardjo*, la actividad antigénica aceptable se define como la capacidad de una vacuna para inducir un título medio geométrico de aglutinación serológica contra *Leptospira hardjo* de ≥ 40 en terneros que se han vacunado con una vacuna que comprende el antígeno bacteriano *Leptospira hardjo*. Para otras bacterinas de la divulgación, la actividad antigénica
35 aceptable se define como la capacidad para inducir una respuesta inmunitaria protectora en animales vacunados después de exponerse a o pasar una prueba de potencia codificada con organismo vivo homólogo.

40 El tratamiento térmico de la divulgación puede realizarse durante un intervalo de temperaturas y durante una longitud de tiempo variable. Generalmente, el calentamiento de la divulgación puede hacerse a una temperatura de aproximadamente 35 a aproximadamente 80 °C durante aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 24 horas. Si la bacterina se calienta a una mayor temperatura, tal como aproximadamente 75 a aproximadamente 80 °C, el tiempo de calentamiento está en el extremo corto del intervalo de tiempo. Si el calentamiento se hace a una menor temperatura, el calentamiento se hace durante un periodo de tiempo más largo. Según la presente invención, la bacterina se calienta a una temperatura
45 de 60 a 70 °C durante 5 a 10 horas. Otra combinación de temperatura y tiempo es calentar a una temperatura de aproximadamente 60 a aproximadamente 70 °C durante aproximadamente 9 a aproximadamente 10 horas. Otra combinación de temperatura y tiempo es calentar a una temperatura de aproximadamente 65 a aproximadamente 70 °C durante aproximadamente 5 a aproximadamente 8 horas. Otra combinación de temperatura y tiempo es calentar a una temperatura de 65 °C durante 8 horas. Una combinación de temperatura y tiempo de la divulgación es calentar a una
50 temperatura de aproximadamente 65 a aproximadamente 70 °C durante aproximadamente una hora. Otra combinación de temperatura y tiempo es calentar a una temperatura de aproximadamente 55 a aproximadamente 65 °C durante aproximadamente 5 a aproximadamente 8 horas.

55 Las bacterinas, después del tratamiento térmico, tienen una menor actividad de lipasa que las bacterinas recientemente preparadas, pero por lo demás pueden formularse del mismo modo que las bacterinas recientemente preparadas. Por consiguiente, las bacterinas tratadas térmicamente pueden incorporarse en vacunas por procedimientos comunes de producción de vacunas. Estos procedimientos son muy conocidos en la técnica.

Las vacunas en emulsión pueden formarse combinando la bacterina deseada con una fase aceitosa y un emulsionante, o emulsionantes. La combinación se somete entonces a agitación intensa para formar una emulsión. Procedimientos de agitación adecuados incluyen homogeneizar y posteriormente microfluidizar. También pueden incluirse conservantes y excipientes en la combinación antes de la emulsión.

- 5 Las vacunas pueden incluir tanto bacterinas como antígenos víricos. En la preparación de una vacuna que incluye bacterinas y antígenos víricos, las bacterinas, cualquier antígeno vírico que vaya a incluirse, el emulsionante, o emulsionantes, y opcionalmente conservantes y excipientes, se combinan con una fase aceitosa, y se emulsionan. Tras la formación de la emulsión, el pH de las formulaciones puede ajustarse a un pH apropiado usando tanto disoluciones de NaOH como de HCl. Para uso en vacunas, es generalmente deseable que el pH sea próximo a neutro para prevenir la irritación en el sitio de inyección. Es común un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,3.

10 Fases aceitosas adecuadas para la formación de vacunas en emulsión incluyen aceites no metabolizables y aceites metabolizables. Los aceites no metabolizables incluyen aceites minerales, tales como aceite mineral blanco y aceite mineral ligero. Los aceites metabolizables incluyen aceites vegetales, aceites de pescado y glicéridos de ácidos grasos sintéticos.

- 15 Ejemplos de emulsionantes que pueden usarse en la preparación de vacunas en emulsión de la presente invención son fosfolípidos, ésteres de sorbitán, ésteres de sorbitán polietoxilados y derivados de manitol que son emulsionantes de vacuna comunes. Los emulsionantes de fosfolípido incluyen lecitina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y lecitina, (por ejemplo, tales como AMPHIGEN[®]). Los emulsionantes de éster de sorbitán incluyen monolaurato de sorbitán (por ejemplo, Span[®] 20 y Arlacel[®] 20), monooleato de sorbitán (por ejemplo, Span[®] 80 y Arlacel[®] 80),
 20 monopalmitato de sorbitán (por ejemplo, Span[®] 40 y Arlacel[®] 40) y monoestearato de sorbitán (por ejemplo, Span[®] 60 y Arlacel[®] 60). Los ésteres de sorbitán polietoxilados incluyen monolaurato de polietoxisorbitán (por ejemplo, Tween[®] 20 y Tween[®] 21), monooleato de polietoxisorbitán (por ejemplo, Tween[®] 80), monopalmitato de polietoxisorbitán (por ejemplo, Tween[®] 40) y monoestearato de polietoxisorbitán (por ejemplo, Tween[®] 60). Los emulsionantes de derivados de manitol incluyen éteres octadecanoicos de manitol. Span[®], Arlacel[®] y Tween[®] son marcas registradas de ICI Americas.
 25 AMPHIGEN[®] es una marca registrada de Pfizer, Inc. Generalmente, las vacunas se formulan como emulsiones normales de aceite en agua, aunque es posible preparar emulsiones inversas de agua en aceite.

- Una variedad de adyuvantes, tales como Quil A, colesterol, fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio, y conservantes tales como mertiolato, pueden usarse en vacunas. Quil A es una mezcla purificada de saponinas de quillaja extraídas de la corteza del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina. Quil A actúa directamente sobre el sistema inmunitario
 30 activando un estado de sensibilidad generalizado. Como resultado, induce tanto respuestas humorales como mediadas por células. La cadena lipófila permite la interacción de antígeno y adyuvante que va a administrarse al citosol para procesarse en una ruta endógena. Quil A se usa frecuentemente con colesterol debido a que el colesterol elimina los efectos secundarios menos deseables cuando se añade en las proporciones apropiadas. El colesterol forma complejos insolubles con Quil A que forman estructuras similares a hélice a medida que el colesterol se une a Quil A, exponiendo así
 35 las unidades de azúcar de la molécula que ayudan a estimular la respuesta inmunitaria.

- Es común añadir antígenos víricos a vacunas que contienen bacterinas. Una ventaja de este enfoque es que una vacuna puede usarse para crear inmunidad a varias enfermedades en lugar de requerir dosificaciones de varias vacunas diferentes para lograr el mismo resultado. Tanto los virus muertos como los virus vivos atenuados pueden usarse en vacunas. Entre los virus que pueden usarse están virus del herpes aviar, virus del herpes bovino, virus del herpes canino, virus del herpes equino, virus de la rinotraqueítis vírica felina, virus de la enfermedad de Marek, virus del herpes ovino, virus del herpes porcino, virus de la pseudorrabia, paramixovirus aviares, virus respiratorio sincitial bovino, virus del moquillo, virus paragripal canino, paragripe 3 bovina, paragripe 3 ovina, virus de la peste bovina, virus de la enfermedad de Border, virus de la diarrea vírica bovina (DVB), virus de la fiebre porcina clásica, virus de la leucosis aviar, virus de la inmunodeficiencia bovina, virus de la leucemia bovina, virus de la anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia felina, virus de la leucemia felina, virus de la neumonía progresiva ovina, virus del adenocarcinoma pulmonar ovino,
 45 coronavirus canino, coronavirus bovino, coronavirus entérico felino, virus de la peritonitis infecciosa felina, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, coronavirus de pavo, virus de la fiebre efímera bovina, rabia, virus de la estomatitis vesicular, gripe aviar, virus de la gripe equina, virus de la gripe porcina, virus de la gripe canina, virus de la encefalitis equina del este (EEE), virus de la encefalitis equina venezolana y virus de la encefalitis equina del oeste.
 50

Si la actividad de lipasa está presente en la bacterina, puede producir liberación del emulsionante de la emulsión. Este emulsionante libre puede romper la envoltura del virus vivo e inactivar los virus de la vacuna viva, conduciendo así a una pérdida de infectividad vírica. Por consiguiente, el tratamiento térmico de la bacterina sirve para estabilizar la emulsión y preservar su efecto adyuvante, además de preservar la infectividad vírica de los virus.

- 55 PROCEDIMIENTOS

Procedimiento 1 Determinación de la turbidez

La turbidez se determina en unidades nefelométricas (UN) por un procedimiento de dispersión de la luz. La intensidad de luz dispersada por la muestra bajo condiciones definidas se compara con la intensidad de luz dispersada por una suspensión de referencia estándar. Cuanto mayor sea la intensidad de la luz dispersada, mayor será la turbidez de la muestra. Una fuente de luz se dirige a la muestra y la dispersión de la luz se mide a 90° con respecto a la dirección de la fuente de luz. El instrumento se calibra midiendo la dispersión de la luz de una suspensión de formazina.

Calibración del instrumento nefelómetro

Se prepara agua ultra-filtrada filtrando agua destilada a través de un filtro de membrana que tiene un tamaño de poro de 0,2 µm. Se prepara una primera disolución disolviendo 1,00 g de sulfato de hidracina, (NH₂)₂H₂SO₄, en agua ultra-filtrada y se diluye con agua ultra-filtrada a 100 ml, en un matraz volumétrico. Se prepara una segunda disolución disolviendo 10,00 g de hexametilentetramina en agua ultra-filtrada y diluyendo con agua ultra-filtrada a 100 ml, en un matraz volumétrico. Se prepara una suspensión de formazina mezclando 5,0 ml de la primera disolución con 5,0 ml de la segunda disolución. La mezcla se deja reposar durante 24 horas a aproximadamente 24 °C. La mezcla se diluye a 100 ml con agua ultra-filtrada para formar una suspensión madre de turbidez que tiene una turbidez de 400 UN. Se prepara una suspensión de turbidez de formazina de 40 UN diluyendo 10,00 ml de la suspensión de turbidez madre a 100 ml con agua ultra-filtrada. Adicionalmente se preparan disoluciones de calibración diluyendo la disolución madre.

Medición de turbidez

La muestra que va a medirse se diluye con agua ultra-filtrada de manera que la turbidez se encuentre dentro del intervalo calibrado del nefelómetro. La turbidez se mide y la turbidez original se calcula usando la siguiente ecuación:

$$\text{Turbidez original en UN} = \frac{M \times (D + O)}{O}$$

en la que: M es la turbidez de la muestra diluida en UN

D es el volumen de agua de dilución, en ml

O es el volumen de muestra original, en ml

Procedimiento 2 Análisis de lipasas

La actividad de lipasa se determinó usando O-pivaloximetilumbeliferona como sustrato fluorógeno. La hidrólisis catalizada por lipasa de este sustrato no fluorescente produce un hidroximetiléter que es inestable bajo condiciones acuosas. La descomposición del hidroximetiléter inestable genera formaldehído y el producto fluorescente umbeliferona. El seguimiento de la intensidad de fluorescencia de la umbeliferona producida, en función del tiempo, proporciona una medición cinética sensible de la actividad enzimática de lipasa.

Se prepararon disoluciones de O-pivaloximetilumbeliferona (producto de Molecular Probes nº P35901) en DMSO puro, a una concentración madre de 5 mM; la disolución sin usar se almacenó a -20 °C, protegida de la luz. La disolución de O-pivaloximetilumbeliferona 5 mM se diluyó a 750 µM usando tampón TRIS-HCl 58 mM (pH 8,0) y la disolución resultante se precalentó a 37 °C. La muestra de *Leptospira* o el tampón/medio de control se centrifugó durante 10 minutos a temperatura ambiente a 6500 X gravedad para formar un sedimento y un sobrenadante. Las reacciones se realizaron combinando 15 µl de tampón TRIS-HCl 100 mM (pH 8,0) con 15 µl del sobrenadante a temperatura ambiente de la muestra de *Leptospira* o el tampón/medio de control, en pocillos de ensayo de placas de 96 pocillos de bajo volumen (Corning 3393, superficie de no unión de poliestireno negro, media área); pre-incubando durante 10 minutos a 37 °C; luego iniciando la reacción mediante la adición de 20 µl de O-pivaloximetilumbeliferona 750 µM o el tampón/medio de control. Las mezclas de reacción resultantes contuvieron tampón TRIS-HCl 53 mM (pH 8,0) y O-pivaloximetilumbeliferona 0 o 300 µM. La intensidad de fluorescencia se midió a intervalos de 30-45 segundos durante un periodo de una hora (Spectramax Gemini XS, 37 °C, λ_{ex} = 360 nm, λ_{em} = 460 nm, parámetro de sensibilidad de PMT 'medio', 6 lecturas por pocillo). La tasa de reacción se determinó a partir de la pendiente de la curva de progreso resultante.

EJEMPLOS**Ejemplo 1 Reducción de la actividad de lipasa por tratamiento térmico**

Se preparó un conjunto de *Leptospira* destruida por mertiolato que contenía las siguientes especies *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo* y *Leptospira pomona* para formar una bacterina. Seis muestras de la bacterina se guardaron durante la noche (aproximadamente 12 horas) a 4 °C, 37 °C, 45 °C, 56 °C, 65 °C y 80 °C. La muestra guardada a 4 °C sirvió de control no tratado. Las muestras guardadas durante 12 horas

a 37 °C, 45 °C, 56 °C, 65 °C y 80 °C fueron muestras tratadas térmicamente. Después del almacenamiento, la tasa a la que un sustrato de prueba se hidrolizó en presencia de cada bacterina se midió según el procedimiento del Procedimiento 2. La tasa de hidrólisis para una muestra dividida entre la tasa de hidrólisis de la muestra guardada a 4 °C multiplicado por 100 es el porcentaje de la actividad de lipasa original de cada bacterina que queda después del almacenamiento. La siguiente tabla muestra la temperatura de almacenamiento y el porcentaje de actividad de lipasa original que queda después del almacenamiento.

Temperatura de almacenamiento (12 horas)	4 °C	37 °C	45 °C	56 °C	65 °C	80 °C
Porcentaje de actividad de lipasa original	100%	55,4%	32,5%	15,7%	10,8%	8,4%

Ejemplo 2 Preparación de formulaciones de vacuna experimentales

Se cultivaron cultivos de *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo* y *Leptospira pomona*. La turbidez de cada cultivo se midió en unidades nefelométricas (UN). Las bacterias se destruyeron con mertiolato para formar bacterinas. Cada bacterina se trató térmicamente a 65 °C durante 8 horas para reducir la actividad de lipasa. Las bacterinas se combinaron y luego se mezclaron con AMPHIGEN®, adyuvantes, conservantes y tampón diluyente de manera que cada 5 ml de dosis de la vacuna contuvieran los componentes expuestos en la siguiente tabla.

15 Concentraciones de antígenos

Componente	Concentración de componente/dosis
<i>L. canicola</i>	1200 UN/5 ml de dosis
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	1200 UN/5 ml de dosis
<i>L. grippotyphosa</i>	1200 UN/5 ml de dosis
<i>L. hardjo</i>	2400 UN/5 ml de dosis
<i>L. pomona</i>	1200 UN/5 ml de dosis

La formulación se homogeneizó usando un homogeneizador Silverson y se microfluidizó usando un microfluidizador de Microfluidics. Tras tanto la homogenización como la microfluidización, el pH de la formulación se ajustó a un pH de 7,0 a 7,3.

20 **Ejemplo 3 Prueba de potencia en hámsteres y vacas**

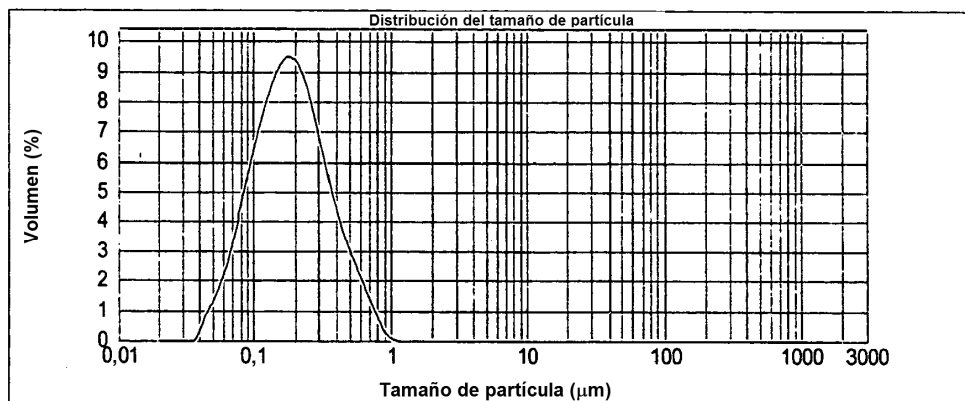
La vacuna del Ejemplo 2 se administró a hámsteres y vacas para probar la potencia usando modelos de laboratorio y de animales huésped estándar. Los hámsteres de prueba se provocaron entonces con una dosis de *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa* o *Leptospira pomona* para probar la potencia de las vacunas. Los números de supervivientes se midieron como una demostración de eficacia. Se midieron títulos de aglutinación microscópica bovina contra *Leptospira hardjo* para demostrar la potencia de esa fracción de la vacuna en vacas. La siguiente tabla muestra que las vacunas preparadas a partir de bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente pueden producir una respuesta antigénica que pasa los criterios de eficacia.

Acondicionamiento térmico de <i>Leptospira</i>	SUPERVIVIENTES DE HÁMSTER				SEROLOGÍA BOVINA
	Canicola	Ictero	Grippo	Pomona	Hardjo
65 °C (8 horas)	10/10	10/10	10/10	10/10	Pasa
Sin tratamiento	10/10	10/10	10/10	10/10	Pasa

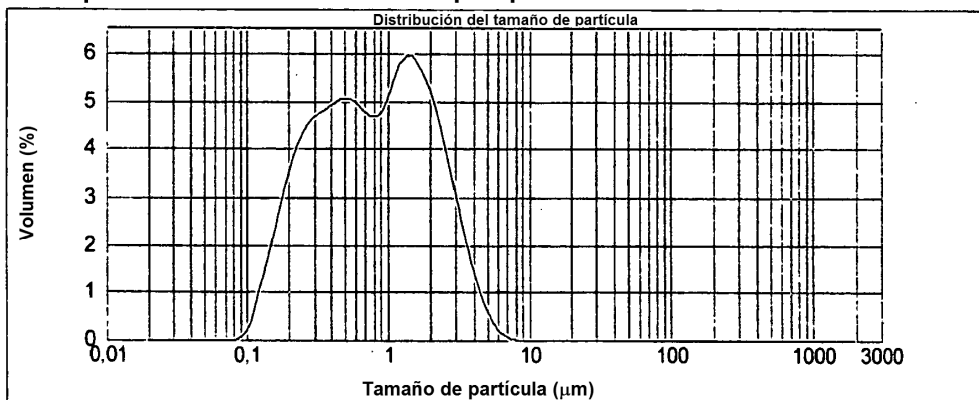
Ejemplo 4 Prueba fisicoquímica de vacunas

Se preparó una vacuna a partir de bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente según el procedimiento del Ejemplo 2. Una vacuna similar se preparó a partir de bacterinas de *Leptospira* no tratadas térmicamente según el procedimiento del Ejemplo 2. Ambas formulaciones de vacuna se guardaron a 4 °C durante 60 días. El análisis del tamaño de partícula se hizo para cada vacuna cuando se prepararon recientemente en el día 0 y de nuevo a los 60 días usando un difractor láser.

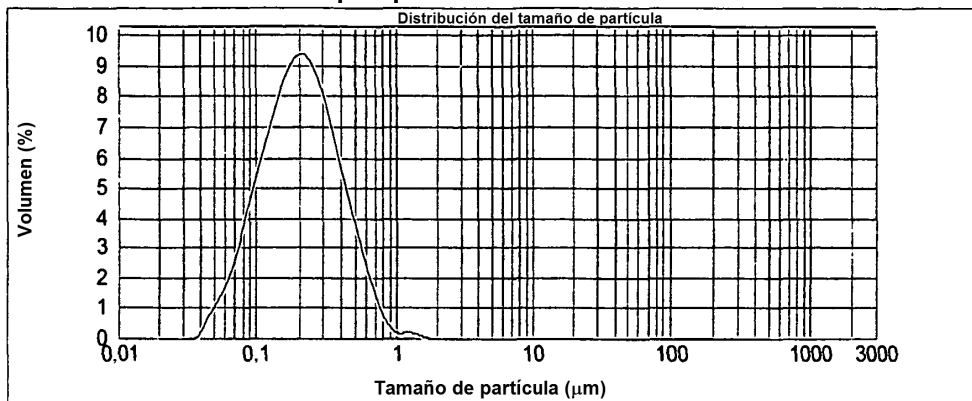
Los diagramas mostrados a continuación muestran distribuciones del tamaño de partícula para cada vacuna en el día 0 antes y después del almacenamiento durante 60 días.



Análisis del tamaño de partícula de vacuna recién preparada que contiene bacterinas de *Leptospira* no tratadas con calor día 0

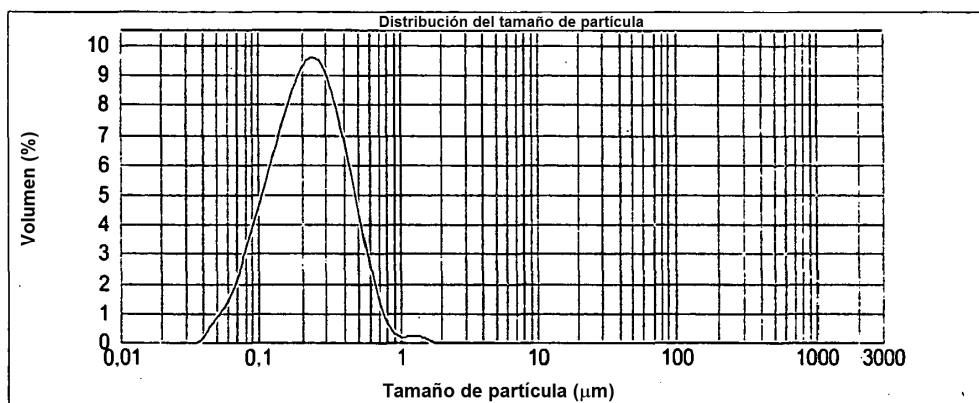


Análisis del tamaño de partícula de vacuna que contiene bacterinas de *Leptospira* no tratadas con calor en el día 60



Análisis del tamaño de partícula de vacuna recién preparada que contiene bacterinas de *Leptospira* tratadas con calor día 0

10



Análisis del tamaño de partícula de vacuna que contiene bacterinas de *Leptospira* tratadas con calor en el día 60

La vacuna preparada a partir de bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente muestra retención del tamaño de partícula, que indica estabilidad de la emulsión. La vacuna preparada a partir de bacterinas de *Leptospira* no tratadas térmicamente muestra un aumento en el tamaño de partícula que indica rotura de la emulsión.

5 Ejemplo 5 Ensayo viricida

10 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 2, las vacunas se prepararon a partir de bacterinas de *Leptospira* no tratadas térmicamente y bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente. Después de 5 a 6 meses de envejecimiento, las vacunas se probaron para actividad viricida contra el virus BHV-1, virus PI3 y virus VRSB. La prueba de actividad viricida se realizó rehidratando controles de ensayo viricidas monovalentes (CEV), con el diluyente adyuvantado que iba a probarse. Se rehidrataron dos controles de ensayo viricidas monovalentes a cada volumen de dosis. Los dos CEV monovalentes rehidratados se reunieron y se incubaron a 20-25 °C durante dos horas antes de la valoración e inoculación en células para determinar por TCID₅₀ (50% de dosis infectiva de cultivo de tejido) el título vírico vivo. Es poco satisfactorio tener una pérdida de título vírico superior a 0,7 TCID₅₀/ml.

Los resultados de los ensayos viricidas que muestran pérdida del título vírico se enumeran en la siguiente tabla:

Acondicionamiento térmico de <i>Leptospira</i>	Pérdida del título vírico (TCID ₅₀)		
	BHV-1	PI3	VRSB
8 horas a 65 °C	0,1	0,0	0,4
Sin tratamiento	1,0	≥ 1,2	≥ 1,3

15 La vacuna preparada con bacterinas de *Leptospira* no tratadas térmicamente muestra altos niveles de actividad viricida. La vacuna preparada con bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente no fue viricida.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna en emulsión que comprende (a) una emulsión que comprende un aceite y uno o más emulsionantes, y (b) una bacterina de *Leptospira* tratada térmicamente que comprende una suspensión de bacterias *Leptospira* muertas que tienen una actividad de lipasa del 50% o inferior a la actividad de lipasa de la bacterina antes del tratamiento térmico, y que tiene actividad antigénica aceptable; en la que dicha bacterina de *Leptospira* tratada térmicamente está preparada mediante un procedimiento que comprende calentar la bacterina a una temperatura de 60 a 70 °C durante 5 a 10 horas.
2. Una vacuna en emulsión según la reivindicación 1, en la que dicha bacterina de *Leptospira* tratada térmicamente está preparada mediante un procedimiento que comprende calentar la bacterina a una temperatura de 65 °C durante 8 horas.
3. Una vacuna en emulsión según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que las bacterias *Leptospira* muertas son de una a cinco especies de *Leptospira* seleccionadas del grupo constituido por *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*.
4. Una vacuna en emulsión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además virus vivos.
5. Una vacuna en emulsión según la reivindicación 4, en la que los virus vivos son de uno a tres virus seleccionados del grupo constituido por *virus de la rinotraqueítis bovina* (RBI), *virus de la paragrape* 3 (PI3) y *virus respiratorio sincitial bovino* (VRSB).
6. Una vacuna en emulsión según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además virus muertos.
7. Una vacuna en emulsión según la reivindicación 6, en la que los virus muertos son de uno a dos virus seleccionados del grupo constituido por *diarrea vírica bovina tipo 1* (DVB) y *diarrea vírica bovina tipo 2* (DVB).
8. Una vacuna en emulsión según la reivindicación 1, que comprende además una preparación de lecitina, Quil A y colesterol.
9. Un procedimiento de preparación de la bacterina de *Leptospira* tratada térmicamente de la vacuna en emulsión de la reivindicación 1, que comprende las etapas de: (a) medir la actividad de lipasa de la bacterina; (b) calentar la bacterina a una temperatura de 60 a 70 °C durante 5 a 10 horas; (c) medir la actividad de lipasa de la bacterina después del tratamiento térmico; (d) comparar la actividad de lipasa de la bacterina antes de calentar con la actividad de lipasa de la bacterina después de calentar; y (e) seleccionar una bacterina tratada térmicamente en la que la actividad de lipasa después del tratamiento térmico sea del 50% o menos de la actividad de lipasa de la bacterina antes del tratamiento térmico.
10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que la bacterina se calienta a una temperatura de 65 °C durante 8 horas.
11. Un procedimiento de producción de la vacuna en emulsión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
12. Una vacuna en emulsión que comprende bacterinas de *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona* tratadas térmicamente obtenidas mediante calentamiento de las bacterinas a una temperatura de 65 °C durante 8 horas, y que comprende además AMPHIGEN®, adyuvantes, conservantes y tampón diluyente de manera que la concentración de las bacterinas sea 1200 UN/5 ml de dosis para todas las bacterinas de *Leptospira*, excepto *Leptospira hardjo*, que es 2400 UN/5 ml de dosis, vacuna en emulsión que se ha homogeneizado y microfluidizado, y luego se le ha ajustado el pH a pH 7,0-7,3.