(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 735 601**

(51) Int. CI.:

C12N 1/20 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/EP2013/077590**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096311**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13821096 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2935565**

(54) Título: **Leptospira con masa antigénica incrementada**

(30) Prioridad:

21.12.2012 EP 12199264

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

SMITS, CHRISTIAN THEODOOR GERARDUS;
KETS, EDWIN y
ADRIAANSE, HENRIETTE

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Leptospira con masa antigénica incrementada

La presente invención generalmente se refiere a los campos de la bacteriología, y a las vacunas bacterianas. En particular la invención se refiere a un método para incrementar la masa antigénica de Leptospira, a un método para producir una vacuna contra Leptosporosis, y a los usos de un compuesto o una composición que son relativamente ricos en un ácido graso C18 poliinsaturado.

La bacteria espiroqueta del género *Leptospira* pertenece a la familia de Leptospiraceae, y al filo Spirochaetes. Las Leptospiras son bacterias Gram negativas, aeróbicas, móviles, con una forma alargada, fina, y forma espiral. Las Leptospiras patógenas se encuentran por todo el mundo en muchos tipos de animales así como en seres humanos; mamíferos, tales como roedores, animales de vida silvestre, de granja, y perros son los reservorios naturales. Las bacterias causan una enfermedad llamada Leptospirosis, o: enfermedad de Weil. Esta se desarrolla cuando las Leptospiras -después de la infección y el transporte por la corriente sanguínea- invaden todos los órganos internos, y pueden mostrar un amplio rango de síntomas leves a graves, incluso mortalidad, y es de una naturaleza grave o crónica. Esta variabilidad es la razón de que la enfermedad con frecuencia esté mal diagnosticada. Los síntomas principales son: fiebre, náuseas, e ictericia, resultantes de vasculitis que conduce a fallo renal, de hígado o de pulmón o enfermedad cardiovascular. Las Leptospiras normalmente sobreviven en el tracto renal o genital de un hospedador, y de esta manera causa propagación horizontal que también puede dar lugar a zoonosis, por lo que los seres humanos llegan a estar infectados a partir del contacto con la orina animal o con agua superficial contaminada. Para una revisión, véase: P. Levett, 2001 (*Clin. Micr. Rev.,* vol. 14, pág. 296). Las Leptospiras son bastantes estables en la naturaleza, y pueden sobrevivir durante meses bajo condiciones acuosas y a temperaturas ambiente.

La clasificación de las Leptospiras puede ser confusa con diferentes los sistemas que se están usando: durante muchos años la clasificación se basó en una diferenciación serológica, por lo que todas las Leptospira patógenas están indicadas como serovares de la especie *Leptospira interrogans (sensu lato).* En este sistema, los serovares se distinguen mediante ensayos serológicos del principal inmunógeno de la bacteria: el lipopolisacárido (LPS) sobre su membrana exterior. Actualmente se han descrito más de 200 serovares, los cuales están combinados dentro de unos 25 serogrupos.

Sin embargo, perpendicular a esta clasificación mediante serotipificación, existe un sistema de genotipificación basado en rasgos biológicos moleculares, dentro de las denominadas: genomoespecies. En la práctica, una genomoespecie de Leptospira puede comprender varios serovares, y *vice versa.* Para el presente caso se usará la clasificación serológica dentro de serovares.

Algunos serovares de Leptospira infectan solamente una especie hospedadora específica, pero la mayoría de los serovares tienen un amplio rango de hospedadores. Por ejemplo: el serovar de *L. interrogans (sensu lato)* Hardjo está asociado con la infección de bovinos y en puerco serovares Tarassovi, Pomona y Bratislava son los incrementados con más frecuencia. Sin embargo, los serovares tales como Canicola, Icterohaemorrhagiae, Bratislava y Grippotyphosa pueden infectar puercos, canes y seres humanos.

La detección de la infección leptospiral de un hospedador es posible en diversas maneras. El criterio de referencia es la detección serológica de anticuerpos específicos en el suero de un hospedador mediante el denominado: ensayo de aglutinación microscópica (MAT). En este ensayo se incuba una dilución en serie del suero de un paciente con Leptospiras vivas de un serovar específico. Cuando los anticuerpos específicos están presentes en el suero, estos aglutinarán las bacterias de ensayo, lo cual se puede leer, por ejemplo, mediante microscopio (campo oscuro). El ensayo es altamente específico, y el MAT es también decisivo para la seroclasificación de los aislados de Leptospira. Ensayos alternativos son ELISA (ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzima), o PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

El tratamiento de la Leptospirosis se puede hacer terapéuticamente mediante la administración de anticuerpos. Sin embargo, debido a que la enfermedad está frecuentemente mal diagnosticada, se prefiere profilaxis mediante vacunación. Varios tipos de vacunas contra Leptospira para uso animal o humano están bajo investigación, pero actualmente solamente las vacunas veterinarias están ampliamente disponibles de manera comercial. Las especies de animales que se vacunan de manera rutinaria son cerdos, ganado, y perros. Entonces, la vacunación sirve tanto para prevenir la enfermedad del hospedador, así como para reducir la propagación zoonótica.

Las vacunas de Leptospirosis actuales se basan en una suspensión de células bacterianas enteras inactivadas, una denominado bacterina, de una cepa de un serovar relevante. Estas vacunas inducen una inmunidad eficaz del tipo humoral, de ese modo la mayoría de los anticuerpos inmunoprotectores son capaces de aglutinar y, por lo tanto, neutralizar Leptospira. El antígeno inmunodominante de bacteria es el LPS, y específicamente: epítopos sobre restos de oligosacárido del LPS. La inmunidad inducida es principalmente específica a serovar, con alguna protección cruzada entre los serovares relacionados, por ejemplo, desde dentro del mismo serogrupo. Un ejemplo de una vacuna de Leptospirosis es: Leptavoid® H (MSD Animal Health), para bovinos, que comprende una bacterina de una cepa del serovar de *L. interrogans (sensu lato)* Hardjo.

Sin embargo, ya que la mayoría de las situaciones de campo muestran prevalencia de Leptospira de más de un serogrupo, por tanto, muchas vacunas de Leptospirosis comerciales son vacunas de combinación que proporcionan amplia protección. Un ejemplo es la vacuna canina: Nobivac® Lepto4 (Merck Animal Health), la cual comprende cepas de cada uno de los serogrupos de *L. interrogans (sensu lato)*: Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae y Pomona. Asimismo, Las vacunas de Leptospirosis con frecuencia se combinan con otros compuestos de vacuna bacteriana o viral.

Hoy en día las Leptospiras de manera rutinaria están siendo proliferadas en cultivos *in vitro*, para fines de investigación o diagnósticos, pero principalmente para la producción de vacunas. Los métodos y procedimientos para la proliferación *in vitro* de Leptospiras se han conocido durante 50 años, y así son los ingredientes que son críticos para su medio de cultivo relativamente simple. En la década de 1960 se estableció que las Leptospiras (para proliferación *in vitro*) requieren ácidos grasos de larga longitud para su nutrición y composición celular. Asimismo que estos ácidos grasos de larga longitud se usan como la única fuente de energía y carbono, ya que no hay (detectable) consumo de proteínas o carbohidratos a partir del medio de cultivo. Por tanto, estos ácidos graos necesitaban ser proporcionados por el medio de cultivo ya que las Leptospiras no puede sintetizar ácidos grasos de larga longitud de nuevo, ni alargar los ácidos grasos de cadena corta. Estas percepciones ayudaron a desarrollar un medio de cultivo de Leptospira sintético semidefinido (Johnson & Gary 1963; Stalheim & Wilson 1964), en el cual el uso previo de hasta el 10 % v/v de todo el suero (conejo), se reemplazó mediante una combinación de una fracción de albúmina y una fuente definida de ácido graso. Esto se desarrolló más en el medio sintético que está aún en uso hoy en día como el medio de cultivo estándar para la proliferación *in vitro* de Leptospira a pequeña o gran escala: el medio EMJH, desarrollado por Ellinghausen and McCullough (1965, *Am. J. of Vet. Res.*, vol. 26, pág. 45), y modificado por Johnson and Harris (1967, *J. of Bacteriol.*, vol. 94, pág. 27).

El medio EMJH contiene junto a vitaminas esenciales, sales y minerales, también 0,125 % v/v de polisorbato 80, y 1 % p/v de albúmina bovina de suero (BSA) (Faine, S., 1994, pág. 312, En: "Leptospira and Leptospirosis", ed. S. Faine, Boca Raton, FL, EE.UU, CRC Press).

Polisorbato 80, el cual es mejor conocido por uno de sus nombres comerciales de producto: Tween® 80 (ICI Americas, Inc.), es: polioxietileno (20) sorbitan monooleato (CAS N.º 9005-65-6). El polisorbato 80 es un tensioactivo no iónico que se usa mucho como emulsionante y como solubilizante en productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios (E 433). En el medio EMJH, sin embargo, sirve como la fuente de la bacteria de ácidos grasos de larga cadena, ya que es convenientemente soluble en agua y tiene una toxicidad relativamente baja para la bacteria. El componente principal a aproximadamente 70 % v/v de polisorbato 80 es ácido oléico (C18:1), pero algunos otros ácidos grasos también están presentes, Principalmente: ácido palmítico (C16:0), y ácido palmitoleico (C 16:1), aunque esto es dependiente del lote y del fabricante.

A este respecto: la designación de los ácidos grasos tales como ácido oleico: "C18:1", es según la anotación C: D, la cual es una nota de taquigrafía estándar bien conocida que describe un ácido graso por sus principales características: el número de átomos de carbono en la cadena de acilo (para ácido oleico:18), y el número de dobles enlaces (insaturados) (para ácido oleico:1).

Ya que Leptospira *in vitro* no consume proteína, la principal función del componente de albúmina de EMJH se considera que es la destoxificación de los ácidos grasos en el medio de cultivo que se proporcionan por el polisorbato 80, agrupándolos en un complejo reversiblemente, mientras que se mantienen biológicamente disponibles.

La albúmina de suero, después de proporcionar presión osmótica, es una proteína de transporte importante en la sangre para diversos compuestos, tales como proteínas, lípidos, vitaminas, moléculas pequeñas, etc.

Los lípidos unidos a la albúmina de suero contienen di- y triglicéridos, y ésteres de colesterol y fosfolípidos, pero la mayoría de ellos (>90 %) están en la forma de ácidos grasos libres; con "libre" se quiere decir: no esterificado, o no covalentemente unido. De estos tres ácidos grasos libres unidos a la albúmina, más del 90 % son ácidos grasos de tamaño medio y de larga cadena en el intervalo de C14 - C20, Principalmente: ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1); ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), y ácido araquidónico (C20:4).

Las albúminas se unen reversiblemente a estos ácidos grasos sobre varios sitios de unión con diferente afinidad. Cuánto, y el tipo de ácido graso que se une a una muestra de albúmina de un donante, tiene una amplia variación fisiológica, y es dependiente de los rasgos químicos del ácido graso, tal como la longitud de la cadena y el nivel de insaturación, pero también de los rasgos biológicos del donante de albúmina, tales como: la especie, cría, y sexo, así como su estado nutricional y de actividad.

Para BSA comerciales la cantidad y el tipo de ácidos grasos unidos son dependientes del protocolo de producción usado por un fabricante, y varían para cada lote.

Las preparaciones de albúmina clásicas se obtuvieron por una separación en fracciones en etanol frío (Cohn y col.,

1946, *J. of the Amer. Chem. Soc.*, vol. 68, pág. 459) para producir el denominado: producto de albúmina de fracción V de Cohn. Desde entonces, ha llegado a estar disponible comercialmente una amplia diversidad de tipos de albúmina de suero y calidades para su uso, por ejemplo, en bioquímica y cultivo de tejido. Una revisión exhaustiva de la variabilidad de la albúmina de suero fue realizada por Janatova (1974, *J. of Medicine*, vol. 5, pág. 149).

Aunque bajo condiciones experimentales más de 10 moléculas de ácido graso podrían estar unida por molécula de albúmina (Spector & Hoak, 1969, *Anal. Biochem.*, vol. 32, pág. 297), la albúmina fisiológicamente llevará entre aproximadamente 0,3 y 3 moles de ácido graso por mol de albúmina (Hennig & Watkins, 1989, *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 49, pág. 301).

Las albúminas de suero comerciales con bajas cantidades de ácidos grasos, es decir, por debajo de 0,1 mol de ácido graso/mol de albúmina, también están disponibles; tales productos de albúmina se han sometido a deslipidación deliberadamente usando una de diversas técnicas disponibles, tal como la extracción con un disolvente orgánico y/o la adsorción a carbón vegetal. Sin embargo, para obtener niveles de carga de lípido muy bajos se requiere métodos de extracción agresivos a valor de pH muy bajo, lo que puede dar como resultado desnaturalización de la albúmina.

Grandes cantidades de albúminas de suero para su uso en procesos biológicos a escala industrial, eficazmente están comercialmente disponibles a partir de bovinos, como subproductos de la industria cárnica.

De los diferentes tipos de BSA disponibles para su uso en proliferación celular *in vitro*, algunos son recomendados para su uso con un tipo celular específico. Un ejemplo es BovoLep® BSA (Bovogen, Australia), el cual está recomendado para promover el crecimiento de Leptospira en cultivo; esto es una BSA estándar que se enriqueció con un número de ácidos grasos vegetales.

El medio de cultivo EMJH completo entonces proporciona todos los ácidos grasos que se sabe que son críticos para la proliferación de Leptospira en cultivo: ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) y ácido oleico (C18:1) (Johnson & Gary, 1963, *supra*).

El medio EMJH permite la proliferación de la mayoría de los serovares relevantes de *L. interrogans (sensu lato).* Las condiciones típicas para la proliferación a escala industrial de Leptospira son a 28-30 ºC, con control de pO_2 y pH, en un tanque fermentado estándar con agitador. No obstante, las Leptospiras proliferan relativamente de manera lenta: se han publicado tiempos de generación entre 12 y 24 horas, dependiendo de la virulencia, y el nivel de adaptación a las condiciones de proliferación *in vitro*. Como resultado: para conseguir una alta biomasa el proceso de proliferación tarda relativamente mucho, normalmente de 4-7 días, dependiendo de la densidad de inoculación, y toma varios precultivos para preparar inóculo suficiente. Esto representa una carga pesada sobre la capacidad del fermentador de un productor. Asimismo, este tiempo de cultivo prolongado representa un gran riesgo de desarrollar una contaminación, por ejemplo, por bacteria, levadura, u hongo que tienen tiempos de multiplicación más cortos.

Como consecuencia, hay una necesidad de métodos mejorados para la producción de antígenos de Leptospira en cultivos *in vitro*.

La bibliografía en el campo describe algunos esfuerzos para mejorar la proliferación de Leptospira en cultivos *in vitro*. Algunas adaptaciones del medio EMJH han reintroducido suero, o han añadido un polisorbato adicional, y/o un hidrolisato. Sin embargo tales medios de EMJH enriquecidos generalmente no se usan en proliferación *in vitro* de Leptospira a gran escala, pero se usan en diagnósticos, normalmente como medios semisólidos, para detectar y proliferar incluso a bajas cantidades de las cepas de Leptospira más demandadas de especímenes clínicos.

Normalmente las Leptospiras se proliferan *in vitro* para preparar una vacuna de Leptospirosis inactivada. Después de la fase de proliferación, el proceso posterior generalmente comienza mediante la inactivación del producto de cultivo final, para producir la bacterina. Esto puede hacerse de varias maneras, comúnmente mediante inactivación química, tal como con formalina, tiomersal, betapropiolactona (BPL), o beta-etanolamina (BEA). Una etapa próxima con frecuencia es concentrar y purificar el cultivo inactivado, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración. La preparación del antígeno resultante, a continuación, se formula en una vacuna.

Es práctica común formular vacunas de Leptospirosis inactivadas basadas en biomasa, de ese modo la dosis animal se realiza para contener un cierto número de células, normalmente aproximadamente 10^9 células/dosis, de un serovar particular. Sin embargo este recuento celular no se puede realizar sobre el producto final formulado, ya que la inactivación (química) daña las células bacterianas. Por tanto, el número celular se determina a partir del cultivo final, antes de su inactivación, mediante recuento de todas las células intactas (vivas y muertas). Con este número, se calcula cuánta dosis/ml se puede asignar al producto final después de la formulación. Como control de calidad para la liberación del producto al mercado, se verifica la eficacia inmunológica (también conocida como la potencia) de la vacuna final. El ensayo de potencia del lote actualmente requerido por las autoridades reguladores es un ensayo *in vivo* que emplea vacunación y exposición en hámsteres (por ejemplo, "European Pharmacopeia monograph 0447", para una vacuna de Leptospirosis canina).

Se conoce un ensayo de potencia *in vitro* para vacuna de Leptospirosis (Ruby y col., 1992, *Biologicals*, vol. 20, pág.

259). Este se basa en la cuantificación de la masa antigénica de la vacuna final mediante ensayo serológico, usando anticuerpos específicos a serovar y patrones. Aunque la correlación entre la masa antigénica de la bacterina de Leptospira y la potencia es bien conocida, la formulación de las vacunas de Leptospirosis aún se basa en biomasa/dosis.

Una consecuencia de la preparación de vacunas de bacterina de Leptospira basada en biomasa, es que tal dosis de vacuna comprende una cantidad de proteína y otros componentes bacterianos que apenas contribuyen a la inmunización -tal como hace LPS-, pero por lo contrario puede conducir a reacciones de vacunación locales y/o sistémicas adversas. Este problema se empeora en el caso de vacunas que combinan varios antígenos Leptospirales. En un intento de mejorar la seguridad de las vacunas de Leptospirosis, generalmente se aplican etapas de purificación adicionales en el proceso posterior. Un temor de reacciones de vacunación adversas también es la principal razón de que la vacuna de Leptospirosis basada en bacterina para su uso en seres humanos no esté generalmente disponible hasta la fecha.

Para superar las posibles reacciones de vacunación, algunos grupos han tratado de reducir la carga de componentes de vacuna no protectores y derivados del medio de una vacuna de Leptospirosis (combinada), aplicando medios adaptados para los que son bajos en proteína o incluso libres de proteína. Sin embargo, estos medios aún deben proporcionar los ácidos grasos de cadena larga esenciales que se requieren para soportar la proliferación de Leptospira. Esto requiere una solución para tratar con la toxicidad inherente de estos ácidos grasos, ya que ahora estos no se podrían destoxificar más mediante un volumen de proteína tal como se proporciona por suero o BSA. Un planteamiento era la destoxificación del propio polisorbato, por ejemplo, mediante intercambio de iones, o mediante extracción con polivinilpirrolidona, o carbón vegetal (Bey & Johnson, 1978, *Inf. & Imm.,* vol. 19, pág. 562). Un planteamiento alternativo se describe en el documento WO 2006/113,601, en donde la toxicidad de los ácidos grasos está limitada complementando un medio de cultivo libre de proteína con polisorbato en cantidades pequeñas repetidas, un denominado proceso de cultivo discontinuo, basado en un incremento de la biomasa a una tasa de crecimiento submáxima, controlada. Hasta hoy en día las vacunas de Leptospirosis no comerciales basadas en Leptospira cultivada libre de proteína están comercialmente disponibles, y las vacunas convencionales aún dependen de la purificación posterior.

No obstante, ninguno de estos estudios de la técnica anterior informaron de ningún efecto de las alteraciones al medio de cultivo, o a las condiciones para la proliferación, sobre la masa antigénica y/o la inmunogenicidad de las Leptospiras producidas. Por tanto, todos estos en esencia son métodos alternativos para la producción de biomasa de Leptospira.

Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar mejoras a la producción de masa antigénica de Leptospira y proporcionar vacunas mejoradas resultantes de la misma.

Sorprendentemente, se encontró que se puede lograr este objetivo, y las desventajas de la técnica anterior se pueden superar, complementando un cultivo de Leptospira con un ácido graso insaturado de larga cadena específico: un ácido graso C18 poliinsaturado. Esto conduce a un incremento rápido y fuente de la masa antigénica que excede cualquier incremento en biomasa hasta 3 veces.

Este descubrimiento abre el camino de un número de utilidades ventajosas, tales como a generación de Leptospiras con masa antigénica incrementada, las cuales se pueden usar para la producción de vacunas mejoradas contra Leptospirosis. Debido a que se encontró que el incremento en cantidad de antígeno excede el incremento en biomasa, por tanto, hay un incremento neto de la cantidad de antígeno por cantidad fija de células bacterianas, cuando se compara un cultivo de Leptospira complementado o uno no complementado.

Las Leptospiras que tienen dicha masa antigénica incrementada, ahora se pueden usar para preparar vacunas que tienen el mismo contenido de antígeno que en las vacunas de la técnica anterior, pero con una cantidad reducida de otros componentes bacterianos o derivados de cultivo. Esto es favorable para el proceso posterior, y para el nivel de efectos secundarios de la vacunación. Como alternativa: las vacunas con una masa antigénica incrementada ahora se pueden aplicar, al mismo nivel de componentes no específicos que antes. Junto con ser favorable para la seguridad de la diana vacunada, será aparente para un experto que todas estas mejoras también son altamente relevantes en términos económicos.

Además, los cultivos de Leptospira complementados con ácido graso C18 poliinsaturado ahora alcanzan un nivel de técnica anterior de masa antigénica varios días antes que previamente. Por tanto, tales cultivos ahora se pueden producir más rápidamente, más económicos, y con menor oportunidades de contaminaciones, ya que los tiempos de cultivo ahora se reducen considerablemente. Como alternativa: si los cultivos de Leptospira complementados con ácido graso C18 poliinsaturado se dejan proliferar a una biomasa máxima como antes, ahora se pueden recoger cantidades muy incrementadas de antígeno.

La presente invención posibilita la mejora de los medios de cultivo existentes para la proliferación de Leptospira y la producción de antígeno y el diseño racional de medios (semi-)sintéticos óptimos.

Para complementar un cultivo de Leptospira con un ácido graso C18 poliinsaturado, se pueden usar compuestos y/o

composiciones que son o bien puros o relativamente ricos en ácido graso C18 poliinsaturado; un ejemplo económico son los aceites vegetales.

Además, debido a que en Leptospira los procesos para la producción de biomasa, y para la generación de antígeno LPS parece estar separados a una gran extensión, ahora es concebible un diseño de proceso no acoplado en donde en una fase inicial se produce una alta cantidad de biomasa de Leptospira, y en una fase posterior, separada, las Leptospiras se inducen para producir antígeno LPS complementándolas con un ácido graso C18 poliinsaturado. La separación de estas dos etapas, a continuación, permite que ambos procesos se optimicen por separado para sus diferentes parámetros relevantes, tales como la duración de la incubación, la temperatura de incubación, etc. Esto también proporciona varias ventajas logísticas y de planificación, por ejemplo, permitiendo almacenamiento intermedio, recolección y/o purificación.

Todo esto era totalmente inesperado, ya que los ácidos grasos C18 poliinsaturados a penas se habían mencionado en la técnica anterior en relación con las condiciones de proliferación de Leptospira: Stern y col. (1969, *Eur. J. of Biochem*., vol. 8, pág. 101) describió que las Leptospira incorporan ácido linoleico (C18:2) del medio de cultivo en sus lípidos de membrana celular. Johnson y col. (1970, *Inf. & Imm.,* vol. 2, pág. 286) publicaron que el ácido linoleico era uno de una lista de ácidos grasos que estaban presentes en BSA que se usaba para la proliferación de cultivos de Leptospira, pero no proporcionaban cantidades específicas. Casi ninguna publicación menciona un ácido linolénico (C18:3) en relación con el cultivo de Leptospira, y nunca como beneficioso. Como consecuencia, ningún artículo de la técnica anterior describe que un ácido graso C18 poliinsaturado sea de ninguna relevancia para Leptospira, excepto para su toxicidad potencial. Nunca se mencionó o sugirió que el ácido linoleico o el linolénico fuesen de especial relevancia para la generación de antígeno de Leptospira, especialmente de antígeno LPS.

Por el contrario, el consenso en la técnica anterior en este campo es que los ácidos grasos relevantes para Leptospira son los ácidos palmíticos, esteáricos y oleicos, y que estos son todos proporcionados en abundancia en medio de cultivo estándar por polisorbato 80. Esta manera de Leptospira con una cantidad "adecuada" de antígeno LPS se ha producido durante muchos años, y no se han descrito o sugerido intentos para mejorar la cantidad de antígeno LPS por unidad de biomasa de Leptospira. También había un incentivo para hacerlo, ya que las vacunas de Leptospirosis se formulan de manera rutinaria basándose en la biomasa, por tanto, maximizar el número de células de Leptospira en un cultivo siempre ha sido el principal foco en este campo, no su masa antigénica.

No se sabe por qué las Leptospiras requieren ácidos grasos C18 poliinsaturados para la producción de su antígeno LPS, ni de qué manera se usa un ácido graso C18 poliinsaturado por Leptospira para generar (parte de) la molécula de LPS.

Aunque los inventores no quieren estar ligado a teoría ninguna o modelo que podría explicar estas observaciones, los inventores actualmente especulan que en Leptospira los procesos biológicos dirigidos a la proliferación bacteriana, y aquellos dirigidos a la generación de LPS pueden depender de sistemas enzimáticos parcialmente separados, que requiere de diferentes nutrientes. Esto a parte del hecho de que la complementación con un ácido graso C18 poliinsaturado también puede inducir algún incremento de biomasa.

Los inventores además especulan que los medios de cultivo de Leptospira estándar actualmente en uso, tales como EMJH, solamente contienen una cantidad de ácidos grasos C18 poliinsaturados que es subóptima para la generación eficaz de antígeno de Leptospira; esto es independiente del hecho de que dichos medios proporcionan una abundancia de los ácidos grasos que son requeridos para la formación de biomasa de Leptospira. Como consecuencia, en estos medios de cultivo de Leptospira de la técnica anterior se agota el ácido graso C18 poliinsaturado, después de lo cual la producción de antígeno llega a detenerse durante largo tiempo antes de que se alcance el número celular máximo. Esto hace que solamente un parte de la capacidad de las Leptospiras para producir antígeno LPS se haya usado hasta ahora. Por tanto, en un aspecto la invención proporciona un método para incrementar la masa antigénica de un cultivo de Leptospira, comprendiendo el método la etapa de complementar dicho cultivo de Leptospira con un ácido graso C18 poliinsaturado.

La "masa antigénica" para la invención es la cantidad de antígeno LPS de un número fijado de células de Leptospira, la cual se puede determinar en un ensayo serológico, tal como un ELISA. En el presente documento se expresa como masa antigénica específica: la cantidad de epítopos antigénicos protectores inmunodominantes sobre el LPS de un número fijado de células de Leptospira, y presentados como el número de unidades serológicas de antígeno LPS Leptospiral por $1x10^9$ células de Leptospira.

Las células de Leptospira se contaron según los procedimientos comunes, antes de la inactivación, y se contaron todas las células enteras, vivas o muertas; esto es lo que se entiende como "biomasa" para la invención.

Como consecuencia, para la invención la masa antigénica de un cultivo de Leptospira incrementa cuando incrementa la cantidad de antígeno por célula de Leptospira, como un resultado de aplicar un método según la invención.

Esto es opuesto al efecto en los métodos de la técnica anterior de producción de antígenos de Leptospira mediante proliferación de Leptospira; estos se centraban en el incremento de la biomasa de Leptospira, pero no mejoraban la

cantidad de antígeno por célula. Como consecuencia, cuando se incrementa la biomasa y la cantidad de antígenos no, eso causa un descenso en la relación de cantidad de antígeno/unidad de biomasa.

La masa antigénica es un término bien conocido en el campo, y normalmente se determina usando un ensayo serológico, tal como un ELISA, usando anticuerpos que son específicos para el antígeno medido, en el presente documento: LPS de Leptospira. A continuación, se expresa la cantidad de antígeno detectado en una muestra en un número de unidades arbitrarias, por lo que estas unidades se definen por referencia a la cantidad de antígeno en una muestra patrón, lo cual se fija, por ejemplo, para contener 1.000 unidades. Como consecuencia, el valor absoluto de la puntuación de una cantidad de antígeno es arbitraria, ya que es dependiente del ensayo específico aplicado y los anticuerpos y la muestra de referencia que se usaron. Sin embargo, lo que importa es la diferencia relativa entre las puntuaciones de las muestras ensayadas bajo las mismas condiciones, y frente a la misma muestra de referencia. Esto se puede expresar, por ejemplo, como la diferencia en la cantidad de antígeno medida (por ejemplo, 250 frente a 500 unidades de antígeno/ml), o se puede expresar convenientemente como un porcentaje. Dicho porcentaje de diferencia entre dos muestras también se aplicará cuando las dos mismas muestras se analizan con un anticuerpo diferente o frente a una muestra de referencia diferente (pero apropiada).

El ensayo preferido para determinar la cantidad de antígeno para su uso en la invención es un ELISA, el cual usa anticuerpos que son específicos para el antígeno LPS de un serogrupo o serovar de Leptospira particular. Dichos anticuerpos pueden aglutinar Leptospira en un MAT. Preferentemente los anticuerpos son anticuerpos monoclonales, y la muestra es de titulación suficientemente alta para permitir que se use en dilución.

Los protocolos y materiales para la realización de un ensayo de masa antigénica para Leptospira han sido muy bien conocidos por un experto durante un largo tiempo, están en general disponibles, y están descritos e ilustrados en el presente documento en detalle. Por ejemplo, centros de fuente biológica públicos tales como el ATCC ((Manassas, VA, EEUU), o el CNCM (Institut Pasteur, París, Francia) pueden proporcionar bacterias Leptospira de la mayoría de serovares, y proporcionar líneas celulares de hibridoma de ratón que expresan serovar específico y que aglutinan anticuerpos monoclonales, o sus monoclonales, véase: Schoone y col. (1989, *J. of Gen. Microbiol.*, vol. 135, pág. 73).

Como alternativa dichos materiales se pueden producir de manera rutinaria en el laboratorio usando técnicas estándar: las bacterias se pueden obtener de seres humanos o animales infectados (aplicando medidas de bioseguridad apropiadas), y estas se pueden caracterizar usando técnicas comunes; el antígeno se puede producir mediante proliferación de Leptospira usando técnicas rutinarias; también se pueden obtener anticuerpos específicos a serovar mediante la inmunización de los animales experimentales, y los métodos para producir anticuerpos monoclonales son bien conocidos. El experto puede determinar fácilmente la especificidad y la titulación de estos anticuerpos, por ejemplo, llevando a cabo el MAT bien conocido.

Asimismo, varias instituciones gubernamentales y organizaciones internacionales proporcionan muestras de referencia de bacterias Leptospira, antígenos, anticuerpos específicos, por ejemplo, para el desarrollo del ensayo. Por ejemplo, el "Royal Tropical Institute" (Amsterdam, Holanda), el cual es un centro de referencia para Leptospira para la OMS, FAO, y OIE. Asimismo, el USDA (Ames, IA, EEUU) proporciona bacterinas de referencia estándar de los principales serovares de Leptospira, y apoya los grupos interesados con los protocolos y materiales para configurar y llevar a cabo ELISA de la cantidad de antígeno (potencia).

De otro modo, el desarrollo y/o la realización rutinaria de los ensayos de la cantidad de antígeno de Leptospira se pueden subcontratar a una de muchas instituciones de servicio de diagnóstico (comercial).

Para la invención, "incrementar la masa antigénica" se ha conseguido mediante un método según la invención, si se encuentra una masa antigénica mayor para un cultivo de Leptospira complementado con ácido graso C18 poliinsaturado, cuando se compara con la masa antigénica del mismo cultivo de Leptospira o similar que no se complementó con un ácido graso C18 poliinsaturado, en condiciones por lo demás idénticas. Un incremento en masa antigénica del 20 % ya se puede detectar con significancia estadística usando técnicas rutinarias, bien conocidas por el experto.

Por tanto, en una realización preferida de un método según la invención, el incremento en la masa antigénica de un cultivo de Leptospira es de al menos el 20 %, en comparación con la masa antigénica de un cultivo de Leptospira similar que no se complementó con un ácido graso C18 poliinsaturado.

Más preferentemente el incremento en la masa antigénica es de al menos el 25, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 63, 77, 90, 100, 121, 150, 175, 184, o de al menos el 200 %, en ese orden de preferencia.

Para la invención, "un cultivo de Leptospira similar" se refiere a que un cultivo de Leptospira que en términos biológicos es altamente comparable al cultivo de Leptospira con el que se compara. Por ejemplo, esto se podría referir al uso de un cultivo de Leptospira del mismo aislado, cepa o serogrupo para realizar esta comparación.

Ejemplos de un incremento de masa antigénica por unidad de biomasa (en comparación con cultivos no complementados similares) para diferentes serogrupos de Leptospira que fueron observados por los inventores en

relación con cultivos similares pero no complementados, siguiendo la aplicación de un método según la invención, eran: para Icterohaemorrhagiae un incremento del:164 %, para Sejroe (serovar Hardjo):184 %, para Grippotyphosa:63 %, para Tarassovi:141 %, para Pomona:73 %, para Canicola:118 %, y para Australis

(serovar Bratislava):62 %. Los detalles se proporcionan en los Ejemplos y las Figuras. Las diferencias en el efecto pueden ser específicas al serogrupo de Leptospira, o pueden estar relacionadas con las características del material de cepa específico que se usó de ese serovar. No obstante, todos estos incrementos son altamente relevantes económicamente.

Está bien dentro de las capacidades rutinarias del experto optimizar el incremento en masa antigénica resultante de la complementación con un ácido graso C18 poliinsaturado como en un método según la invención, por ejemplo, mediante la adaptación de las condiciones del cultivo, de la complementación, o de las Leptospiras usadas.

Esta perspectiva ahora permite la optimización adicional de cultivos de Leptospira de los diferentes serogrupos, mediante la complementación con un ácido graso C18 poliinsaturado particular, para obtener un incremento relativamente máximo en la relación masa antigénica/biomasa de ese serogrupo de Leptospira, serovar, tipo o cepa.

Por tanto, en realizaciones preferidas del método según la invención:

- para un cultivo del serogrupo de Leptospira Icterohaemorrhagiae, el ácido graso C18 poliinsaturado es un ácido linolénico (C18:3), y preferentemente un ácido alfa-linolénico (alfa C18:3),
- para un cultivo del serogrupo de Leptospira Canicola, el ácido graso C18 poliinsaturado es un ácido linolénico (C18:3),
- para un cultivo del serogrupo de Leptospira Pomona, el ácido graso C18 poliinsaturado es un ácido gamma-linolénico (gamma C18:3), y/o
- para un cultivo del serogrupo de Leptospira Sejroe (serovar Hardjo), el ácido graso C18 poliinsaturado es ácido linoleico (C18:2),

por lo que también se puede proporcionar el ácido graso al cultivo de Leptospira en forma de un derivado, de ese ácido graso, o en forma de un compuesto o una composición relativamente ricos en el ácico graso, tal como se define en el presente documento.

En principio cualquier ácido graso C18 poliinsaturado tal como se ha definido anteriormente se puede usar en un método según la invención, y proporcionar generalmente el mismo efecto. Más aún: los inventores han encontrado que también se pueden proporcionar diferentes tipos de ácido graso C18 poliinsaturado a un cultivo en una complementación combinada, por lo que sus efectos sobre el incremento de la masa antigénica serán acumulativos.

Esto se ilustra en el presente documento, por ejemplo, para Leptospira del serogrupo Icterohaemorrhagiae, en donde la complementación con la combinación de 50 µg/ml de cada uno de ácido linoleico y ácido alfa-linolénico, se produjo un incremento en la masa antigénica que estaba muy cerca de la media aritmética de los incrementos relativos separados en masa antigénica a partir de la complementación de cultivos (en el mismo experimento) con 100 µg/ml de o bien ácido linoleico o ácido alfa-linolénico.

La complementación combinada de ácidos grasos C18 poliinsaturados para el método según la invención, puede ser complementado con una mezcla de ácidos grasos (o de sus derivados, o compuestos o composiciones relativamente ricos en dichos ácidos grasos), o como complementaciones separadas, o bien simultáneas, consecutivas, o más separadas en el tiempo.

Por tanto, en una realización, el ácido graso C18 poliinsaturado se complementa a un cultivo de Leptospira usando una composición que contiene naturalmente más de un ácido graso C18 poliinsaturado. Ejemplos son los aceites vegetales (semilla), por ejemplo, aceite de Colza o de semilla de lino, los cuales son relativamente ricos en tanto C18:2 como alfa C18:3 o aceite de semilla de cáñamo, el cual es relativamente rico en C18:2, alfa C18:3 y gamma C18:3.

"Leptospira" se refiere generalmente a bacterias del género taxonómico de las bacterias espiroquetas con ese nombre. Esto incluye también Leptospiras que se subclasifican a partir de la misma de alguna manera, por ejemplo, como una subespecie, cepa, aislado, genotipo, serotipo, serovar, serogrupo, variante, o subtipo y similares. Dichas Leptospiras comparten los rasgos de caracterización de sus miembros de familia taxonómica tales como las características genómicas, físicas, al microscopio de electrones, y bioquímicas, así como características biológicas tales como de comportamiento fisiológico, inmunológico, o patógeno. Junto con la clasificación serológica, otras determinaciones se pueden basar en ensayos de secuenciación de nucleótidos o PCR, tal como se conocen en el campo.

Será aparente a un experto que mientras el género bacteriano que es el sujeto de la presente invención actualmente se llama *Leptospira*, esto es una clasificación taxonómica que podría estar sujeta a cambio cuando nuevas perspectivas conducen a reclasificación dentro de un nuevo o diferente grupo taxonómico. Sin embargo, ya que esto no cambia el microorganismo implicado o sus rasgos de caracterización, solamente su nombre científico o clasificación, dichos organismos reclasificados permanecen dentro del alcance de la invención.

Leptospiras preferidas para su uso en un método según la invención son Leptospiras que son patógenas a una o más especies animales o a seres humanos; más preferido es al menos un serogrupo seleccionado de *L. interrogans (sensu lato)* Canicola, Icterohaemorrhagiae, Australis, Grippotyphosa, Pomona, Tarassovi, Sejroe y Autumnalis.

Incluso más preferido es al menos un serovar seleccionado de *L. interrogans (sensu lato)* Canicola, Portlandvere, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Bratislava, Australis, Grippotyphosa, Dadas, Pomona, Tarassovi, Gatuni, Hardjo, Saxkoebing y Autumnalis.

Un "cultivo" para la invención es: una composición que comprende bacterias Leptospira. Las bacterias en un cultivo de Leptospira para la invención pueden estar en diferentes densidades o condiciones: intactas o no, vivas o muertas, rotas (parcialmente) o inactivadas, etc. Las bacterias pueden estar en cualquier fase del ciclo celular tal como proliferación, reposo, o latente. El cultivo puede ser un cultivo proliferante, en donde las Leptospiras están recientemente inoculadas, en fase temprana, media, exponencial tardía, o logarítmica. O el cultivo puede ser un cultivo estático o estacionario, en donde las Leptospiras están en la fase logarítmica, o en un cultivo recogido, o almacenado.

La composición que comprende las bacterias Leptospira puede ser líquida, sólida o semisólida, estar congelada o liofilizada. La composición puede ser un medio de cultivo, o un medio de almacenamiento, y puede comprender un estabilizador, u otro aditivo o vehículo farmacéuticamente aceptable. Entre otros, dicho cultivo comprende una suspensión celular.

En una realización preferida, el cultivo para su uso en un método según la invención está en forma líquida, ya que esto facilita la absorción por las Leptospiras de un ácido graso C18 poliinsaturado.

Para la invención el término "que comprende" (así como variaciones tales como "comprenden", "comprende", y "comprendido"), tal como se usa en el presente documento, se refiere(n) a todos los elementos, y en cualquier posible combinación concebible para la invención, que están cubiertas por o incluidas en la sección texto, párrafo, reivindicación, etc., en la que se usa este término, incluso si dichos elementos o combinaciones no se enumeran de manera explicita; y no se refiere a la exclusión de ninguno de dicho(s) elemento(s) o combinaciones. Como consecuencia, cualquiera de dicha sección de texto, párrafo, reivindicación, etc., también se puede referir a una o más realización(es) en donde el término "que comprende" (o sus variaciones) se reemplaza por términos tales como "consiste en", "que consiste en", o "consistir esencialmente en".

Par la invención "complementar" tiene el mismo significado común de: añadir para suministrar una deficiencia, o para reforzar o extender algo (de: "American heritage dictionary", ed. Houghton Miflin Co., Boston, EEUU).

La manera en la que se aplica la complementación de un ácido graso C18 poliinsaturado en un método según la invención, en principio no está limitado, siempre que el efecto de dicho método se pueda conseguir: un incremento relativo de la masa antigénica. Por consiguiente, para un método según la invención, la complementación de un ácido graso C18 poliinsaturado se puede hacer añadiendo a un cultivo existente de Leptospira, o bien una vez, repetidamente, o continuamente. Como alternativa, la complementación de un cultivo de Leptospira en un método según la invención, se puede hacer proporcionando una cierta concentración de un ácido graso C18 poliinsaturado en el momento de establecer el cultivo de Leptospira para la invención. Por ejemplo, proporcionando una cierta concentración de un ácido graso C18 poliinsaturado en un medio de cultivo en el que un cultivo de Leptospira es para ser inoculado y proliferado, o en un medio de lavado, almacenamiento o incubación en el que un cultivo de Leptospira es para ser conservado o tratado.

Asimismo, la complementación con un ácido graso C18 poliinsaturado puede ser a diferentes momentos en el ciclo de vida de las Leptospiras, tales como en la fase temprana, media, o tardía de un cultivo activamente proliferante, o en una muestra almacenada; y a diferentes densidades de las células bacterianas.

El ácido graso C18 poliinsaturado puede estar en diferentes formas, y puede ser complementado de diferentes maneras. Las opciones para la variación y optimización de estas condiciones están descritas e ilustradas en el presente documento, y están bien dentro de las capacidades rutinarias del experto.

En una realización preferida la complementación para un método según la invención se hace añadiendo un ácido graso C18 poliinsaturado a un cultivo de Leptospira proliferante y añadiendo gradualmente con el tiempo.

Para la invención "un ácido graso C18 poliinsaturado" se refiere al compuesto químico que es el ácido graso, o a un derivado del mismo, pero también a un ácido graso C18 poliinsaturado en una mezcla o complejo, o a un compuesto o una composición que son relativamente ricos en un ácido graso C18 poliinsaturado. Un compuesto o una composición son "relativamente ricos" en un ácido graso C18 poliinsaturado, si comprende un ácido graso C18 poliinsaturado en una cantidad de al menos aproximadamente el 5 % de su cantidad total de ácidos grasos. Preferentemente al menos aproximadamente el 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 % de su cantidad total de ácidos grasos, en ese orden de preferencia.

La determinación del contenido de ácido graso, así como la diferenciación dentro de las cantidades relativas de ácidos grasos individuales, se pueden hacer de manera rutinaria por un experto, por ejemplo mediante extracción y cromatografía de gases. Ejemplos de compuestos y composiciones que son relativamente ricos en un ácido graso C18 poliinsaturado, para su uso en un método según la invención, se describen a continuación.

El término "ácido graso C18 poliinsaturado" se usa en su significado común, en relación con el ácido graso con una cadena de hidrocarburo que contiene 18 átomos de carbono, y dicha cadena de hidrocarburo contiene más de un doble enlace (insaturado).

En la técnica se conocen ácidos grasos C18 poliinsaturados conjugados, los cuales se producen *(ergo* no se consumen) por bacterias tales como Lactobacilos, en el rumen de los rumiantes.

En una realización preferida, el ácido graso C18 poliinsaturado para su uso en la invención es no conjugado.

En una realización más preferida, el ácido graso C18 poliinsaturado para su uso en la invención es un polieno interrumpido con metileno, no está ramificado, y/o no está unido a un anillo de ciclo-alqueno.

En una realización incluso más preferida, el ácido graso C18 poliinsaturado para su uso en la invención es un ácido graso C18 poliinsaturado omega 3 o un omega 6.

En una realización adicional aún más preferida, el ácido graso C18 poliinsaturado para su uso en la invención es uno o más seleccionado del grupo que consiste en C18:2, C18:3 y C18:4.

En la realización más preferida, el ácido graso C18 poliinsaturado para su uso en la invención es uno o más seleccionado del grupo que consiste en: ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido gamma-linolénico, o ácido estearidónico.

El "ácido linoleico" es un ácido graso C18:2, n-6, delta 9, 12, con nombre científico 9, 12-octadecadienóico, y CAS N.º: 60-33-3. Preferentemente ambos de sus enlaces dobles están en forma cis.

El ácido linolénico es un ácido graso C18:3, con dos formas isoméricas: ácido alfa-linolénico y ácido gamma-linolénico.

El "ácido alfa-linolénico" es un ácido graso C18:3, n-3, delta 9, 12, 15, con nombre científico 9, 12, 15-octadecatrienóico, y CAS N.º: 463-40-1. Preferentemente todos sus enlaces dobles están en forma cis.

El "ácido gamma-linoleico" es un ácido graso C18:3, n-6, delta 6, 9, 12, con nombre científico 6, 9, 12-octadecatrienóico, y CAS N.º: 506-26-3. Preferentemente todos sus enlaces dobles están en forma cis.

El "ácido estearidónico" es un ácido graso C18:4, n-3, delta 6, 9, 12, 15, con nombre científico 6, 9, 12, 15-octadecatetranóico, y CAS N.º: 20290-75-9. El ácido estearidónico también se conoce como ácido moróctico. Preferentemente todos sus enlaces dobles están en forma cis.

El ácido graso C18 poliinsaturado puede ser de origen natural o sintético, y puede estar en estado aislado o en un grado de pureza. Asimismo, el ácido graso C18 poliinsaturado puede estar unido, acoplado o esterificado a otros grupos químicos. Todas estas formas son admisibles siempre que el ácido graso C18 poliinsaturado esté biológicamente disponible al cultivo de Leptospira, y se pueda obtener el efecto de un método según la invención. Preferentemente el ácido graso C18 poliinsaturado está en una forma que no es demasiado tóxica para el cultivo de Leptospira, y que se puede usar en el contexto de las condiciones de cultivo acuosas.

Un experto puede determinar fácilmente si un ácido graso C18 poliinsaturado, un derivado, o un compuesto o composición que contiene un ácido graso C18 poliinsaturado, se puede usar en un método según la invención, o es demasiado tóxico o inconveniente, por los detalles y ejemplos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, ensayando dicho ácido graso, derivado, compuesto o composición en una fermentación a escala pequeña representativa de Leptospira, y determinando la cantidad de antígeno LPS de Leptospira de un cierto número de células, y comparar eso con la cantidad de antígeno de células de un cultivo de Leptospira similar que no se complementó con el ácido graso C18 poliinsaturado que contenía el compuesto o la composición.

Ejemplos de ácidos grasos C18 poliinsaturados, derivados, compuestos o composiciones para su uso en la invención son: un ácido graso C18 poliinsaturado como disponible en diversas purezas de todos los suministradores principales de los compuestos bioquímicos. Asimismo el ácido graso C18 poliinsaturado puede estar unido o formando complejo con una molécula vehículo, tal como una proteína o un complejo de proteína (por ejemplo, suero o albúmina, una enzima (acil-CoA), o esterificado con un glicerol o colesterol, o como una lipoproteína, un fosfolípido (unido a un fosfato), o un glicolípido o lipopolisacárido (unido a un resto de carbohidrato). Asimismo el ácido graso C18 poliinsaturado puede estar presente como un componente de ácido libre menor en una composición de otros ácidos grasos. Como alternativa el ácido graso C18 poliinsaturado puede estar presente en un compuesto o una composición relativamente ricos en ácido graso C18 poliinsaturado, tal como aceite vegetal (semilla).

Ya que el ácido graso es normalmente escasamente soluble en un medio acuoso, el ácido graso C18 poliinsaturado, o un derivado, o un compuesto o una composición relativamente ricos en un ácido graso C18 poliinsaturado, se pueden realizar convertir en una preparación que facilita su complementación a un cultivo de Leptospira, para hacerlo o conservarlo biodisponible. Por ejemplo, el ácido graso C18 poliinsaturado se puede dispersar físicamente, o emulsionar químicamente, o mezclar con un disolvente. Se puede combinar con un vehículo tal como una celulosa, ciclodextrina, o colesterol, o usando BSA o suero tal como se ha descrito anteriormente; como alternativa un ácido graso C18 poliinsaturado puede ser transferido por un adsorbente particulado tal como, por ejemplo, Celite® o Amberlite® (Spector & Hoak, *supra*).

Una manera ventajosa de complementar un cultivo de Leptospira con un ácido graso C18 poliinsaturado en un método según la invención, es complementando el cultivo con BSA que se creó para comprender una alta cantidad de un ácido graso C18 poliinsaturado.

Por tanto, en una realización preferida de un método según la invención, el ácido graso C18 poliinsaturado se complementa en la forma de un complejo con BSA.

Un ácido graso C18 poliinsaturado se puede cargar sobre BSA mediante incubación conjunta sencilla, hasta que el BSA se satura con el ácido graso C18 poliinsaturado. La unión de ácido graso a BSA es dependiente de temperatura y pH, tal como se sabe en la técnica, y se describe, por ejemplo, en: Spector & Hoak (*supra*), y Ashbrook y col. (1975, *J. of Biol. Chem.,* vol. 250, pág. 2333). El nivel de carga de un ácido graso C18 poliinsaturado sobre la BSA se puede analizar convenientemente mediante cromatografía de gases tal como se describe a continuación. Cuánto de un ácido graso C18 poliinsaturado puede ser absorbido por la BSA, depende del tipo y de la calidad de la BSA, así como de la cantidad de ácido graso que ya estaba unida. Si se desea la carga máxima de un ácido graso C18 poliinsaturado, BSA primero se puede someter a deslipidación mediante extracción y, a continuación, recargar exclusivamente con un ácido graso C18 poliinsaturado. Una BSA que se cargó con ácido graso C18 poliinsaturado (adicional) se puede usar en cultivos de Leptospira, en lugar de, o además de, la BSA o suero que ya se usó en el medio de cultivo.

Los inventores han encontrado que la complementación eficaz para un método según la invención era posible usando una BSA que se creó para contener al menos aproximadamente el 10 % p/p de sus ácidos grasos como un ácido graso C18 poliinsaturado.

Por tanto, una composición preferida para complementar un ácido graso C18 poliinsaturado para un método según la invención, es una preparación de BSA que comprende al menos aproximadamente el 10 % p/p de su ácido graso libre como un ácido graso C18 poliinsaturado; preferentemente que comprende al menos el 12, 15, 18, 20, 21, 23, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95, o 99 % p/p de su ácido graso libre como un ácido graso C18 poliinsaturado, en este orden de preferencia.

El experto apreciará que cuando un cultivo de Leptospira es complementado con un ácido graso C18 poliinsaturado según el método de la invención, usando una preparación de BSA, esto puede incrementar la carga de proteína del cultivo, y por consiguiente de la vacuna producida a partir del mismo. Esto podría tener un efecto sobre el nivel de los efectos laterales de la vacunación. Por tanto, dicho cultivo puede requerir una etapa de purificación para deshacerse de las proteínas en exceso. Sin embargo, ya que de todas formas dicha purificación está siendo aplicada con frecuencia, por tanto, la complementación de un ácido graso C18 poliinsaturado en un complejo con BSA o suero es una manera altamente eficaz de incrementar la masa antigénica de un cultivo de Leptospira.

El ácido graso C18 poliinsaturado (preparación) se puede complementar a un cultivo de Leptospira según el método de la invención, de diferentes maneras, por ejemplo, como un pulso, o más gradualmente con el tiempo. Una complementación pulso, por ejemplo, podría ser para complementar todo el ácido graso C18 poliinsaturado en aproximadamente 1 hora, y esto sería lo más apropiado en caso del que el cultivo sea estático. Para cultivos de Leptospira proliferantes, las complementaciones más apropiadas son una complementación gradual, la cual significaría añadir todo el ácido graso C18 poliinsaturado en un periodo de tiempo de entre aproximadamente 1 hora a aproximadamente 6 horas. Una complementación de alimentación discontinua para un cultivo proliferante, significaría que tiene una alimentación de una corriente de ácido graso C18 poliinsaturado (preparación) durante la mayoría de la duración del cultivo.

En una realización preferida de un método según la invención, un cultivo proliferante de Leptospira se complementa gradualmente o en modo discontinuo.

La cantidad de un ácido graso C18 poliinsaturado que es a complementar a un cultivo de Leptospira para alcanzar un incremento relativo en masa antigénica, como en un método según la invención, en principio está solamente limitado por lo que es viable desde la perspectiva práctica, económica y biológica. Por ejemplo, las consideraciones prácticas son que un tanque fermentador con un cultivo proliferante no se debería abrir múltiples veces para añadir un complemento, ya que eso puede comprometer un funcionamiento seguro y su esterilidad. Por otro lado, cuando el cultivo que es a complementar no es activamente proliferante, tal como un cultivo final, o un cultivo de almacenamiento, hay mucho menos riesgo de una contaminación durante la proliferación del cultivo. Las consideraciones económicas

son, por ejemplo, los costes del material de la complementación de una gran cantidad de un ácido graso C18 poliinsaturado, o un producto de combinación del ácido graso C18 poliinsaturado especial. Las consideraciones biológicas son que los ácidos grasos libres pueden ser tóxicos a células vivas, aunque eso importa menos para un cultivo estático. Por tanto, cuando grandes cantidades de un ácido graso C18 poliinsaturado son para ser complementadas a un cultivo proliferante en un corto periodo de tiempo, se debe tener cuidado de mitigar o prevenir la toxicidad del ácido graso a las Leptospiras, por ejemplo, proporcionando el ácido graso C18 poliinsaturado en un complejo para reducir la toxicidad, tal como se ha descrito anteriormente. Como alternativa el ácido graso C18 poliinsaturado se puede complementar gradualmente con el tiempo.

Parámetros adicionales a considerar son las condiciones de cada caso específico: la cantidad, estado, y tipo de las Leptospiras, así como el medio de incubación, temperatura, pH, etc. Con los detalles y ejemplos en el presente documento, está dentro del alcance de un experto variar y optimizar la cantidad y la manera en la que se complementar un ácido graso C18 poliinsaturado a un cultivo de Leptospira en el contexto de un método según la invención.

Las Leptospiras en un cultivo parecen consumir un ácido graso C18 poliinsaturado tan pronto como pueden. Véase por ejemplo las Figuras 2, 3 y 13, 14 que ilustran que el ácido linoleico y el ácido linolénico se consumen muy rápidamente y se convierten en masa antigénica, al contrario que el ácido palmítico y el ácido oleico. Esto significa que la cantidad total de la masa antigénica generada en dicho cultivo es un resultado de la cantidad total acumulativa del ácido graso C18 poliinsaturado que estaba disponible para el cultivo durante la incubación. Para la invención, la indicación de la cantidad de un ácido graso C18 poliinsaturado que se complementa a un cultivo, por tanto, se refiere a la cantidad total de un ácido graso C18 poliinsaturado que se hace disponible durante la proliferación o incubación de un cultivo de Leptospira, como si todo el ácido graso C18 poliinsaturado estuviera disponible en un único momento. Se expresa como una concentración basada en el volumen total del cultivo. Esto es independiente de la forma o volumen de la mezcla en la que comprendía el ácido graso C18 poliinsaturado, e incluye adiciones realizadas por todos los componentes de los medios.

Como consecuencia, un experto apreciará que con frecuencia será posible medir realmente esta concentración total de ácido graso C18 poliinsaturado proporcionado al cultivo de Leptospira. Por un lado, debido a que es un número acumulativo a partir de las contribuciones de ácido graso C18 poliinsaturado realizadas con el tiempo y de diferentes componentes. Por otro lado, debido a que el cultivo de Leptospira ya habrá absorbido y procesado parte del mismo antes del momento de muestrear.

Por ejemplo, los inventores demostraron que un incremento significativo de la masa antigénica se podría obtener cuando se complementar un cultivo de Leptospira según el método de la invención con ácido linoleico, de modo que 25 µg de ácido linoleico se habían hecho disponible por ml de cultivo, en comparación con un cultivo que tenía disponible solamente aproximadamente 5 µg/ml.

Lo mismo se aplica para ácido linolénico, aunque el medio de cultivo EMJH estándar contiene cantidades insignificantes de C18:3. Como consecuencia, en principio la complementación de cualquier cantidad de C18:3 a un cultivo de Leptospira, ya será beneficioso a su relación de masa antigénica/biomasa. En la práctica se pueden añadir cantidades de un C18:3 comenzando a partir de aproximadamente 5 µg/ml.

A cantidades mayores del ácido graso C18 poliinsaturado disponible, se incrementó más las masas antigénicas. Al mayor nivel de disponibilidad ensayado, por encima de 300 µg/ml de un ácido graso C18 poliinsaturado en un cultivo de Leptospira, era notable alguna toxicidad para algunos serovares. Sin embargo este efecto se vio cuando se usaba una preparación de ácido graso C18 poliinsaturado puro para la complementación, y se puede superar mediante destoxificación apropiada del ácido graso C18 poliinsaturado en un complejo, tal como se ha descrito anteriormente.

Por tanto, en una realización, la invención proporciona un método para incrementar la masa antigénica de un cultivo de Leptospira, el método que comprende la etapa de incubación de dicho cultivo de Leptospira bajo condiciones en las que al menos 15 µg/ml de ácido linoleico, y/o al menos 5 µg/ml de un ácido linolénico se hicieron disponibles a dicho cultivo.

Tal como se describe a continuación, la complementación de diferentes ácidos grasos C18 poliinsaturados -tal como se ha definido anteriormente- también se puede combinar, dando un efecto acumulativo en un cultivo de Leptospira. Como consecuencia, la cantidad total de ácido graso C18 poliinsaturado que se hace disponible a un cultivo de Leptospira, por consiguiente, se puede basar en la suma de las cantidades de los diferentes ácidos grasos C18 poliinsaturados que se combinan. Por tanto, en una realización preferida de un método según la invención, el método que comprende la etapa de incubación de un cultivo de Leptospira bajo condiciones en las que al menos 15 µg/ml de ácido graso C18 poliinsaturado/ml se hicieron disponibles a dicho cultivo. Más preferentemente al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o al menos 100 µg de ácido graso C18 poliinsaturado/ml se hicieron disponibles a dicho cultivo, en ese orden de preferencia.

En una realización más preferida del método según la invención, el método comprende la etapa de incubación de un cultivo de Leptospira bajo condiciones en las que entre aproximadamente 15 y 1.000 µg/ml de ácido graso C18 poliinsaturado/ml se hicieron disponibles a dicho cultivo. Más preferentemente entre aproximadamente 20 y

aproximadamente 500 µg/ml, entre aproximadamente 20 y 300 µg/ml, o entre aproximadamente 25 y 250 µg de ácido graso C18 poliinsaturado/ml ser hicieron disponibles a dicho cultivo, en ese orden de preferencia.

En una realización la invención proporciona un método para incrementar la masa antigénica de un cultivo de Leptospira, comprendiendo el método la etapa de complementación de dicho cultivo de Leptospira con un ácido graso C18 poliinsaturado bajo condiciones en las que al menos 15 µg/ml de ácido graso C18 poliinsaturado/ml se hicieron disponibles a dicho cultivo; en donde las Leptospiras al menos un serogrupo seleccionado de *L. interrogans (sensu lato)* Canicola, Icterohaemorrhagiae, Australis, Grippotyphosa, Pomona, Tarassovi, Sejroe y Autumnalis; y en donde el incremento de la masa antigénica de dicho cultivo de Leptospira es de al menos el 20 %, en comparación con la masa antigénica de un cultivo de Leptospira similar que no se complementó con un ácido graso C18 poliinsaturado.

Además se describe un cultivo de Leptospira obtenible mediante un método según la invención, en donde dicho cultivo de Leptospira tiene una masa antigénica incrementada.

Dicho cultivo de Leptospira tal como se describe difiere de un cultivo de Leptospira de la técnica anterior, en el sentido de que el cultivo de Leptospira tiene una masa antigénica que es significativamente incrementada resultante de la complementación con un ácido graso C18 poliinsaturado como en un método según la invención. Esta masa antigénica incrementada es fácilmente detectable y cuantificable tal como se describe: un incremento en la masa antigénica del 20 % o más es significativo y detectable, tal como se ha descrito anteriormente.

El incremento en la masa antigénica es relativo a la masa antigénica de un cultivo de Leptospira similar bajo la misma condición, pero que no se ha complementado con un ácido graso C18 poliinsaturado como en un método según la invención, tal como se ha descrito anteriormente.

Por tanto, un cultivo de Leptospira tal como se describe se caracteriza por que la masa antigénica de dicho cultivo de Leptospira se incrementa en al menos el 20 % en comparación con la masa antigénica de un cultivo de Leptospira similar que no se complementó con un ácido graso C18 poliinsaturado.

Más preferentemente un cultivo de Leptospira tal como se describe se caracteriza por que la masa antigénica de dicho cultivo de Leptospira se incrementa en al menos el 22, 24, 25, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 63, 77, 90, 100, 121, 150, 175, 184, o en al menos el 200 %, en ese orden de preferencia, y en comparación con la masa antigénica de un cultivo de Leptospira similar que no se complementó con un ácido graso C18 poliinsaturado.

Un cultivo de Leptospira tal como se describe es obtenible mediante un método según la invención tal como se describe, por ejemplo, complementando Leptospira en un cultivo proliferante o estacionario, o una recolección de cultivo, con un ácido graso C18 poliinsaturado, un derivado, un compuesto o una composición que son "relativamente ricos" en un ácido graso C18 poliinsaturado. Esto tiene varias utilidades ventajosas, entre las cuales en vacunas contra Leptospirosis.

En el presente documento además se describe un cultivo de Leptospira o una preparación de dicho cultivo, para su uso en una vacuna contra Leptospirosis.

Preferentemente, un cultivo de Leptospira para su uso en una vacuna contra Leptospirosis tal como se describe en el presente documento está en forma de un cultivo de Leptospira tal como se describe en el presente documento.

"Una preparación" de un cultivo de Leptospira tal como se describe en el presente documento puede ser un fragmento de dicho cultivo, por ejemplo, un extracto, sometido a sonicación, o filtrado, o una subunidad de un cultivo de Leptospira tal como se describe en el presente documento, tal como una parte de la envoltura externa que contiene LPS, un LPS purificado, o una parte de dicho LPS.

Además se describe una vacuna contra Leptospirosis que comprende un cultivo de Leptospira tal como se describe en el presente documento, o una preparación de dicho cultivo.

Una "vacuna" tal como se describe en el presente documento es una composición farmacéutica que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de (una preparación de) un cultivo de Leptospira tal como se describe en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La vacuna induce una respuesta inmune eficaz frente a Leptospirosis. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se pretende que ayude en la administración eficaz de un compuesto farmacéuticamente activo, sin causar efectos adversos (graves) a la salud de la diana a la que se administra. Un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, puede ser agua estéril o una solución de sal fisiológica estéril. En una forma más compleja el vehículo puede, por ejemplo, ser un tampón, el cual puede comprender aditivos adicionales, tales como estabilizadores o conservantes.

El componente leptospiral de una vacuna contra Leptospirosis tal como se describe en el presente documento inducirán en el ser humano o animal diana una respuesta inmune que ayudará a prevenir, mejorar, o reducir una infección con Leptospira, o de la intensidad de síntomas clínicos de Leptospirosis, causados mediante la infectando de Leptospira. Esto puede ser el resultado de una colonización o de una tasa de infección reducida por las Leptospiras,

que conduce a una reducción en el número o la gravedad de lesiones y efectos que se causan por las Leptospiras, o por la respuesta de la diana a las mismas. Además, esto reducirá la excreción (orina) de Leptospira, y de ese modo la propagación en el ambiente, lo cual reduce la posibilidad de infecciones zoonóticas.

Lo que constituye que una cantidad inmunológicamente eficaz de una vacuna contra Leptospirosis tal como se describe en el presente documento es dependiente del efecto deseado y de las características específicas de la vacuna que se está usando, y la diana a la que se aplica. Para vacunas de Leptospirosis basadas en bacterina, las cuales funcionan esencialmente por una respuesta inmune humoral, la correlación es bien conocida entre una cierta masa antigénica, y la fuerza inmunoprotectora de la vacuna en una diana.

Por tanto, la determinación de una cantidad eficaz es bien conocida dentro de las habilidades del profesional, por ejemplo, haciendo un seguimiento de la respuesta inmunológica después de la vacunación, o después de una exposición a infección, por ejemplo, haciendo un seguimiento de los síntomas clínicos de la enfermedad de la diana, parámetros serológicos, o mediante reaislamiento del patógeno, y comparando estos a respuestas vistas en animales no vacunados.

En una realización preferida la vacuna tal como se describe en el presente documento comprende además un estabilizador, por ejemplo, para proteger los componentes de ser propensos a degradación, y/o aumentar la vida útil de la vacuna. Generalmente tales estabilizadores son moléculas grandes de alto peso molecular, tales como lípidos, carbohidratos o proteínas; por ejemplo, leche en polvo, gelatina, albúmina de suero, sorbitol, trehalosa, espermidina, Dextrano o polivinilpirrolidona, y tampones, tales como fosfatos de metal alcalino.

Preferentemente, el estabilizador está libre de compuestos de origen animal, o incluso: químicamente definido, tal como se desvela en el documento WO 2006/094, 974.

Asimismo, se pueden añadir conservantes, tales como timerosal, compuestos fenólicos, y/o gentamicina.

Las técnicas generales y los procedimientos en la vacunología son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en normas gubernamentales tales como la Farmacopea, y en manuales bien conocidos tales como: "Veterinary vaccinology" (P. Pastoret y col. ed., 1997, Elsevier, Ámsterdam, ISBN:0444819681), y: "Remington: the science and practice of pharmacy" (2000, Lippincot, EE.UU, ISBN:683306472).

Los sujetos diana para la vacuna tal como se describe en el presente documento pueden ser seres humanos o una amplia variedad de animales que son susceptibles de infección con Leptospira. Las dianas preferidas son una o más seleccionadas de: ser humano, canino, porcino, bovino, equino, caprino, ovino y cervino. En principio la diana puede estar sana o enferma, y puede ser positiva o negativa para la presencia de Leptospira, o para anticuerpos frente a Leptospira. Asimismo la diana puede ser de cualquier edad en la que sea susceptible de la vacunación. Sin embargo, es evidentemente favorable vacunar dianas no infectadas, sanas, y vacunar tan pronto como sea posible para prevenir cualquier infección de campo.

Una vacuna tal como se describe en el presente documento puede servir como una vacunación iniciadora eficaz, la cual después será seguida y amplificada por una vacunación de refuerzo.

Una vacuna tal como se describe en el presente documento pude igualmente usarse como tratamiento profiláctico y como terapéutico, ya que interfiere tanto con el establecimiento como con la progresión de una infección de Leptospira o sus síntomas clínicos de la enfermedad.

El esquema de la aplicación de una vacuna tal como se describe en el presente documento a la diana puede estar en dosis únicas o múltiples, las cuales se pueden administrar al mismo tiempo o secuencialmente, de una manera compatible con la dosis y la formulación, y en tal cantidad que sea inmunológicamente eficaz.

El protocolo para la administración de una vacuna tal como se describe en el presente documento idealmente está integrado dentro de los calendarios de vacunación existentes de otras vacunas que la diana puede requerir.

La vacuna tal como se describe en el presente documento preferentemente se aplica como una dosis anual única.

Una vacuna tal como se describe en el presente documento puede contener una cantidad de Leptospira de un cultivo tal como se describe en el presente documento o de la preparación del mismo, correspondiente a entre $1x10^6$ y $1x10^{10}$ células bacterianas por dosis; preferentemente entre $1x10^7$ y $5x10^9$ por dosis.

Las vacunas tal como se describen en el presente documento se pueden administrar en un volumen que es coherente con la diana, y puede, por ejemplo, estar entre aproximadamente 0,1 a 10 ml en volumen. Preferentemente una dosis está entre 0,25 y 3 ml.

Una vacuna tal como se describe en el presente documento se puede administrar a una diana según los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, como una aplicación parenteral por cualquier ruta de inyección en o a través de

la piel: por ejemplo, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, submucosa o subcutánea. Rutas alternativas de aplicación que son viables son mediante aplicación tópica, mediante inhalación, o por la ruta alimentaria.

La ruta de aplicación preferida es mediante inyección intramuscular o subcutánea. No hace falta decir que la ruta óptima de aplicación dependerá de la formulación de vacuna específica que se usa, y de las características particulares de la diana.

Está bien dentro del alcance de un experto optimizar más una vacuna tal como se describe en el presente documento. Generalmente esto implica el ajuste fino de la eficacia de la vacuna, de manera que proporciona suficiente protección inmune. Eso se puede hacer adaptando la dosis de vacuna, o usando la vacuna en otra forma o formulación, o adaptando los otros constituyentes de la vacuna (por ejemplo, el estabilizador o el adyuvante), o mediante la aplicación por una diferente ruta.

La vacuna además puede comprender otros compuestos, tales como un adyuvante, un antígeno adicional, una citoquina, etc. Como alternativa, una vacuna tal como se describe en el presente documento se combina con un componente farmacéutico, por ejemplo, un antibiótico, una hormona, o un fármaco antiinflamatorio.

En una realización preferida, una vacuna tal como se describe en el presente documento se caracteriza por que comprende un adyuvante.

Un "adyuvante" es un ingrediente de vacuna bien conocido, el cual en general es una sustancia que estimula la respuesta inmune de la diana de una manera no específica. En la técnica se conocen muchos adyuvantes diferentes. Ejemplos de adyuvantes son adyuvante completo e incompleto de Freund, vitamina E, composiciones de aluminio, polímeros bloque no iónicos y poliaminas tales como sulfato de dextrano, Carbopol® y pirano.

Además, péptidos tales como dipéptidos de muramilo, dimetilglicina, tuftsina, se usan con frecuencia como adyuvante, y se pueden usar ventajosamente aceite mineral, por ejemplo, Bayol™ o Markol™, Montanide™ o aceite de parafina ligero, aceites vegetales o productos de combinación tales como ISA™ de Seppic™, o DiluvacForte™. Una emulsión puede ser agua en aceite (w/o), aceite en agua (o/w), agua en aceite en agua (w/o/w), doble emulsión de aceite (DOE), etc.

Adyuvantes preferidos para una vacuna tal como se describe en el presente documento son hidróxido de aluminio, o Saponina, tales como: Quil A®, o Q-vac®. Saponina y componentes de vacuna se pueden combinar en un ISCOM® (documento EP 109,942, documento EP 180,564, documento EP 242,380).

No hace falta decir que otras maneras de añadir adyuvante, añadir compuestos vehículo o diluyentes, emulsionar o estabilizar una vacuna están también dentro del alcance de la invención.

Una vacuna tal como se describe en el presente documento se puede combinar ventajosamente con otro antígeno dentro de una vacuna de combinación.

Por tanto, en una realización más preferida una vacuna tal como se describe en el presente documento se caracteriza por que comprende un componente inmunoactivo adicional.

Un "componente inmunoactivo adicional" puede ser un antígeno, una sustancia inmuno potenciadora, y/o una vacuna, cualquiera de las cuales puede comprender un adyuvante. El componente inmunoactivo adicional cuando en la forma de un antígeno puede consistir en cualquier componente antigénico de importancia humana o veterinaria. Preferentemente el componente inmunoactivo se basa en, o deriva de, un microorganismo adicional que es patógeno a la diana. Por ejemplo, puede comprender una molécula biológica o sintética tal como una proteína, un carbohidrato, un lipopolisacárido, un ácido nucleico que codifica cualquier antígeno proteico. Asimismo una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico, o un microorganismo vehículo recombinante vivo que contiene un ácido nucleico, puede ser una manera de administrar el ácido nucleico o el componente inmunoactivo adicional. Como alternativa puede comprender un microorganismo fraccionado o muerto tal como un parásito, bacteria o virus.

El(los) componente(s) inmunoactivo(s) adicional(es) también puede(n) ser una sustancia inmuno potenciadora, por ejemplo, una quimioquina, un ácido nucleico inmunoestimulador, por ejemplo, un motivo CpG. Como alternativa, la vacuna tal como se describe en el presente documento puede añadirse propiamente a una vacuna.

Una utilidad ventajosa de una vacuna de combinación para la invención es que no solamente induce una respuesta inmune frente a Leptospira, sino también frente a otros patógenos de una diana, mientras que solamente se requiere un tratamiento único de la diana para la vacunación, reduciendo de ese modo la incomodidad a la diana, así como los costes de tiempo y trabajo.

Ejemplos de dichos componentes inmunoactivos adicionales son en principio todos patógenos virales, bacterianos y parásitos dispuestos para la vacunación de una diana que es también una diana para una vacuna contra Leptospirosis

tal como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, para porcinos: circovirus porcinos, virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, virus de la pseudorabia, parvo virus porcino, fiebre porcina clásica, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Lawsonia intracellularis*, *E. coli*, *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp., especies de Clostridia., *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella* spp., *Haemophilus* spp., *Erysipelothrix* spp., *Bordetella* spp., etc.

Para bovinos: *Neospora* spp., *Dictyocaulus* spp., *Cryptosporidium* spp., *Ostertagia* spp., rotavirus bovino, virus de la diarrea viral bovina, coronavirus bovino, virus de rinotraqueitis infecciosa bovina (virus del herpes bovino), paramixovirus bovino, virus de parainfluenza bovina, virus sincitial respiratorio bovino, virus de la rabia, virus de la lengua azul, *Pasteurella haemolytica, E. coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Mycobacterium* spp., *Brucella* spp., especies de Clostridia., *Mannheimia* spp., *Haemophilus* spp., *Fusobacterium* spp., etc.

Para ovinos o caprinos: *Toxoplasma gondii*, virus de la peste de los pequeños rumiantes, virus de la lengua azul, virus de Schmallenberg, *Mycobacterium* spp., *Brucella* spp., especies de Clostridia., *Coxiella* spp., *E. coli*, *Chlamydia* spp., especies de Clostridia., *Pasteurella* spp., *Mannheimia* spp., etc.

Para caninos o felinos: *Ehrlichia canis,* complejo de *Leishmania donovani, Neospora caninum,* parvovirus canino, virus del moquillo canino, adenovirus tipos 1 o 2 canino, virus de la hepatitis canina, coronavirus canino, virus de parainfluenza canino, virus de la rabia, calicivirus felino, herpevirus felino, virus de panleucopenia felina, *Clostridium* spp., *Hepatozoon* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella bronchiseptica*, *Chlamydia* spp., y especies de *Babesia* o *Theileria*.

Para seres humanos: *Plasmodium*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, virus de varicela zóster, VIH, virus del papiloma humano, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubéola, virus de la rabia, poliovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, especie de virus de la hepatitis, virus de la gripe, *Haemophilus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bordetella* spp., *Neisseria* spp., y *Clostridium* spp.

Una vacuna de combinación para la invención puede combinar ventajosamente Leptospira de más de un serogrupo de *L. interrogans,* Por ejemplo, para una diana canina: los serogrupos de L. *interrogans (sensu lato)* Canicola y Icterohaemorrhagiae; o: los serogrupos de L. *interrogans (sensu lato)* Canicola, Icterohaemorrhagiae, Australis, y Grippotyphosa. A partir de estos, uno o más pueden ser (derivados de) un cultivo de Leptospira tal como se describe en el presente documento; preferentemente todos son cultivos de Leptospira (derivados de) tal como se describe en el presente documento.

Una combinación de vacuna tal como se describe en el presente documento (junto con un componente inmunoactivo adicional), una o más Leptopira que corresponde a más de un serogrupo de *L. interrogans.* Por ejemplo, para una diana porcina la vacuna de combinación puede comprender: los serogrupos de L. *interrogans (sensu lato)* Canicola, Icterohaemorrhagiae, Australis, Grippotyphosa, Pomona y Tarassovi, así como *Erysipelothrix rhusiopathiae* y parvovirus porcino.

En esta combinación, uno o más de las Leptospiras pueden ser un cultivo de Leptospira tal como se describe en el presente documento; preferentemente todos son cultivos de Leptopira tal como se describe en el presente documento.

Para razones prácticas y de control del proceso, es beneficioso producir cada uno de los antígenos de Leptospira en dicha vacuna de combinación en cultivos separados tal como se describe en el presente documento.

Esto debido a que cada uno luego se puede producir con sus condiciones óptimas específicas. A continuación, se prepararán los antígenos de vacuna separados, y solamente, entonces, los diferentes antígenos de Leptospira se combinarán.

Además se describe el uso de un cultivo de Leptospira tal como se describe en el presente documento, o de una preparación de dicho cultivo de Leptospira, para la fabricación de una vacuna contra Leptospirosis.

La "fabricación" de una vacuna para la invención se lleva a cabo por medios bien conocidos por los expertos. Dicha fabricación en general comprenderá las etapas de mezcla y formulación de un cultivo de Leptospira tal como se describe en el presente documento, o de una preparación del mismo, con excipientes farmacéuticamente aceptables, seguido de distribución en los recipientes de tamaño apropiado. Se necesitará hacer un seguimiento de las diversas fases del proceso de fabricación mediante ensayos adecuados, por ejemplo, mediante ensayos inmunológicos para la calidad y la cantidad de los antígenos; mediante ensayos microbiológicos para la esterilidad y ausencia de agentes extraños; y por último mediante experimentos *in vitro* o *in vivo* para determinar la eficacia y seguridad de la vacuna. Todos estos son bien conocidos por un experto.

Una vacuna tal como se describe en el presente documento se puede fabricar dentro de una forma que es adecuada para la administración a dianas humanas o animales que encajan con la ruta de aplicación deseada, y con el efecto deseado.

Las formas bien conocidas de vacunas son, por ejemplo: un líquido, un gel, una pomada, un polvo, un comprimido o una cápsula, dependiendo del método deseado de aplicación a la diana. Preferentemente, una vacuna tal como se describe en el presente documento se formula como un líquido inyectable, tal como: una suspensión, solución, dispersión o emulsión. Comúnmente dichas vacunas se preparan estériles.

En una realización una vacuna tal como se describe en el presente documento se basa en un cultivo de Leptospira tal como se describe en el presente documento que estaba inactivado. Dicha bacterina basada en vacuna inactivada ahora se puede fabricar para la invención usando técnicas bien conocidas. Por tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para producir una vacuna contra Leptospirosis, comprendiendo dicho método las etapas de:

a. proliferar un cultivo de Leptospira en un sistema *in vitro*,
b. complementar dicho cultivo de Leptospira con un ácido graso C18 poliinsaturado,
c. inactivar y recoger dicho cultivo de Leptospira complementado, y
d. mezclar el cultivo de Leptospira inactivado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El método se lleva a cabo según los procedimientos bien conocidos para la proliferación, inactivación y formulación de vacunas de Leptospirosis. La recolección también se lleva a cabo como en la técnica anterior, excepto que ahora hay más opciones para elegir el momento para la recolección que en la técnica anterior: cuando se requiere un nivel de la técnica anterior de masa antigénica, la recolección ahora se puede realizar antes que previamente.

Como alternativa, cuando se desea una masa antigénica máxima, el cultivo primero se deja proliferar a su biomasa máxima, tal como se hizo antes, solamente que ahora se produce significativamente más cantidad de antígeno cuando el cultivo se complementa con un ácido graso C18 poliinsaturado tal como en un método según la invención.

El término "proliferar" tiene el significado común de posibilitar e inducir que la bacteria Leptospira atraviese un número de ciclos de la división celular. Proliferar para la invención incorpora el significado de términos similares que indican un incremento en los números celulares y el tamaño celular, tal como "crecer", "cultivar", o "amplificar". La fase de proliferación es precedida por la inoculación, y esta a su vez puede ser precedida por la selección de cepa, preacondicionamiento, y/o preproliferación.

Un "sistema *in vitro*" es una manera bien conocida de proliferación deliberada de bacteria Leptospira fuera de un organismo humano o animal, bajo condiciones artificiales controladas. Esto emplea normalmente un quimioestato o fermentador, y un medio de cultivo (semi-)definido. De manera rutinaria, se hará un seguimiento de varios parámetros críticos de la fermentación y se ajustarán cuando sea apropiado, y esto incluso se puede automatizar. Técnicas, materiales y equipo para un sistema de proliferación celular bacteriano *in vitro* a cualquier escala son bien conocidos y están fácilmente disponibles de muchos suministradores comerciales a la industria de la ciencia de la vida.

En una realización preferida de un método de producción de una vacuna según la invención, se introduce una etapa intermedia, la cual permite que el proceso se desarrolle de manera no continua. La etapa intermedia se introduce entre las etapas de proliferación y complementación, y se refiere a una recolección, almacenamiento y/o purificación del cultivo de Leptospira que se proliferó en la primera etapa.

Por tanto, en una realización preferida, un método de producción de una vacuna contra Leptospirosis según la invención comprende entre la primera y la segunda etapa, una etapa adicional que comprende recolección, almacenamiento y/o purificación, de un cultivo de Leptospira.

Esta etapa intermedia permite la realización separada y la optimización de las fases de proliferación y complementación de un método según la invención. La etapa intermedia se lleva a cabo de una manera que mantiene la viabilidad o la integridad bioquímica del cultivo de Leptospira, de una manera que permite su uso eficaz en las etapas adicionales del método. Por ejemplo, la recolección se puede hacer, por ejemplo, mediante centrifugación o diafiltración. Como resultado de la recolección, las Leptospiras pueden estar en una forma más concentrada. El almacenamiento se puede llevar a cabo a una temperatura entre aproximadamente 2 y aproximadamente 30 ºC en un ambiente acuoso. La purificación puede comprender un refresco o un reemplazo del medio de proliferación, por ejemplo, para proporcionar condiciones óptimas para las posteriores etapas. Cada una de estas manipulaciones se pueden realizar por separado, combinado, o posteriormente, y en cualquier orden lógico.

En un método según la invención, un cultivo de Leptospira se complementa con un ácido graso C18 poliinsaturado. Sin embargo, un ácido graso C18 poliinsaturado como químico ulltrapuro puede ser demasiado caro para el uso a gran escala en la producción de un producto de bajo margen tal como se aplica a algunas vacunas veterinarias. Por tanto, el ácido graso C18 poliinsaturado para su uso en estos métodos se pueden complementar en diferentes formas o purezas, tal como en un derivado o un compuesto o una composición que son relativamente ricos en un ácido graso C18 poliinsaturado, tal como se definió anteriormente.

Por tanto, en un aspecto adicional la invención se refiere al uso de un compuesto o una composición que son

relativamente ricos en un ácido graso C18 poliinsaturado para un método según la invención.

El experto es más que capaz de ensayar y seleccionar compuestos y composiciones que son relativamente ricos en un ácido graso C18 poliinsaturado, y optimizar su uso en un método según la invención.

Una fuente muy económica de un ácido graso C18 poliinsaturado para su uso en un método según la invención es un aceite vegetal, debido a que algunos de estos aceites son bien conocidos para contener niveles muy altos de un ácido graso C18 poliinsaturado, son valorados económicamente, y están disponibles en una calidad y pureza que es aceptable para su uso en métodos según la invención.

Por tanto, en una realización preferida de un uso según la invención, el compuesto o la composición que son relativamente ricos en un ácido graso C18 poliinsaturado es un aceite vegetal.

Un "aceite vegetal" es un aceite que se deriva de una parte de una planta, lo más frecuente de los frutos y las semillas, tales como: bayas, guisantes, judías, granos y nueces; como alternativa de: hoja, tallo, flor, capullo floral, raíz, o remolacha. El aceite vegetal se puede aislar de su material fuente vegetal mediante presión, extracción, etc.; los métodos para obtener y purificar los aceites han sido conocidos desde tiempos antiguos.

Ejemplos de aceites vegetales que son relativamente ricos en ácido linoleico están enumerados en la Tabla 1. Los valores dados están en % p/p del contenido de ácido graso total, y son promedios aproximados, los cuales pueden variar y depender de la variedad vegetal y del proceso de extracción usado. Referencia: "U.S. Department of Agriculture, National Nutrient Database for Standard Reference", publicado el 24 de septiembre de 2011.

Tabla 1: Contenido aproximado (en % p/p del ácido graso total) de ácido linoleico en aceites vegetales

Aceite de cártamo (1)(2)	78 %		Aceite de nuez	51 %
Aceite de semilla de uva	73 %		Aceite de sésamo	45 %
Aceite de semilla de amapola	70 %		Aceite de salvado de arroz	39 %
Aceite de girasol (1)(2)	68 %		Aceite de pistacho	33 %
Aceite de cáñamo (1)	60 %		Aceite de cacahuete	32 %
Aceite de maíz	59 %		Aceite de almendras	23 %
Aceite de germen de trigo	55 %		Aceite de semilla de colza (3)	21 %
Aceite de semilla de algodón	54 %		Aceite de linaza (4)	15 %
Aceite de soja	51 %		Aceite de oliva	10 %

(1) En estos nombres comunes de los aceites no se especifica la semilla, incluso aunque el aceite se obtenga de la semilla.
(2) Esto no contempla la variante de este aceite que es alto en ácido oleico.
(3) Una variante de aceite de semilla de colza es aceite Canola®, el cual tiene un contenido reducido de ácido erúcico.
(4) La linaza también es conocida como: semilla de lino.

Asimismo, algunos aceites vegetales (semilla) no alimenticios más exóticos son relativamente ricos en ácido linoleico; por ejemplo, aceites de las semillas de: Espino de fuego: 70 % p/p de los ácidos grasos totales; uva de Oregón:52 %; y zarzaparrilla:51 %, (S. Özgul-Yucel 2005, *J.A.O.C.S*, vol. 82, pág. 893).

Fuentes bien conocidas de ácido alfa-linolénico son aceites de semilla de: salvia de Chia, fruto del Kiwi, *Perilla*, Lino, Cáñamo, Arándano rojo, Niger, Caucho, Camelina, Purslane, Espino amarillo y colza.

Fuentes bien conocidas de ácido gamma-linolénico son aceites de semilla de: Onagra, Borraja, Grosellero negro, Cártamo, y Cáñamo.

Fuentes bien conocidas de ácido estearidónico son aceites de semilla de: Cáñamo, Grosellero negro, "Corn gronwell", y *Echium*.

Por tanto, para la invención, se prefiere un aceite vegetal que tenga al menos el 25 % p/p de los ácidos grasos totales como un ácido graso C18 poliinsaturado, más preferentemente un aceite vegetal que tenga al menos el 30, 40, 50, 60, 70, o incluso al menos el 75 % p/p de los ácidos grasos como un ácido graso C18 poliinsaturado, en ese orden de preferencia.

Un cultivo de Leptospira tal como se describe en el presente documento también se puede usar de manera ventajosa en métodos de diagnóstico. Ejemplos son el uso en un ensayo diagnóstico para la detección de anticuerpo específico a Leptospira o antígeno en una muestra de ensayo. Por ejemplo, una preparación a partir de un cultivo de Leptospira tal como se describe en el presente documento se pude cubrir sobre una placa o vehículo, o se puede usar como antígeno de captura.

Como alternativa, la preparación se puede usar como antígeno de referencia patrón con una alta masa antigénica.

A continuación se describirá en detalle la invención con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

1. Materiales y métodos generales

1.1. Proliferación de Leptospira

1.1.1 Cepas bacterianas, medio y preproliferación

Se inoculó una siembra de trabajo de una cepa de *L. interrogans* en medio EMJH y se incubó a 29 ºC durante 3 a 5 días. Si era necesario se pudieron realizar hasta 5 pasos de precultivo consecutivos, por lo que los precultivos eran visualmente inesperados para suficiente proliferación (turbiedad) como criterio para transferir al próximo paso.

NB: Medidas de bioseguridad y de contención apropiadas se deben aplicar cuando se trabajo con Leptospiras vivas.

1.1.2 Fermentación principal

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un volumen de trabajo de 0,5, 2 o 20 l, los fermentadores controlados por ordenador (Sartorius), los cuales se rellenaron con 0,5, 1 o 10 l de medio EMJH filtrado estéril, respectivamente. El medio EMJH estándar contenía 1% p/v de BSA y 0,125 % p/v de polisorbato 80. El pH del medio era de 7,4 ± 0,1 al principio. El fermentador se inoculó con 5 % v/v de precultivo de serogrupo Icterohaemorrhagiae (paso 5), dando una densidad de inoculación de 2 - 4 $x10^7$ células/ml en el día 0. Los rendimientos finales de biomasa de Leptospira normalmente eran de aproximadamente 1 - $2x10^9$ células/ml en el día 5 o 6 de incubación cuando se paró la fermentación.

Durante todos los experimentos de fermentación la temperatura se controló a aproximadamente 29 °C. El medio se aireó con flujo de aire en espacio en cabeza, y la concentración de oxígeno disuelto (pO_2) se controló mediante variación automática de la tasa de agitación, para mantener una concentración de pO_2 fija. Se hizo un seguimiento de la temperatura, pH y la concentración de pO_2 en línea, pero el pH y la formación de espuma no se sometieron a control.

En experimentos comparativos se hicieron funcionar hasta 4 fermentadores en paralelo, los cuales se iniciaron simultáneamente con el mismo medio e inóculo de Leptospira. A continuación, un fermentador generalmente contenía solamente el medio EMJH estándar y servía como referencia, mientras que se realizaron otras diferentes complementaciones del ácido graso C18 poliinsaturado.

1.1.3 Complementación con ácido linoleico

La complementación se hizo o bien con ácido linoleico puro (Sigma Aldrich, > 99 % puro) como una reserva al 10 % v/v en etanol absoluto (JT Baker). Como alternativa, el ácido linoleico se complementó usando una BSA que se creó con un alto nivel de ácido linoleico (BSA con alto LA). La BSA con alto LA se usó o bien para reemplazar una BSA estándar en medio EMJH, o se usó además de BSA en el medio EMJH, en cuyo caso se añadió como solución madre al 25 % p/v en agua estéril. La BSA con alto LA o los complementos de ácido linoleico puro/etanol se suministraron a un fermentador durante el trascurso de 4 horas, a 0,1 - 0,2 ml/hora, hasta que el cultivo de fermentador hubiera recibido la cantidad total deseada de ácido linoleico. Se han ensayado diferentes niveles de ácido linoleico disponibles totales, de entre 5 y 425 µg/ml en el volumen total. Los cultivos de fermentador de Leptospira se complementaron a diferentes densidades celulares, es decir, en cultivo en fase temprana, media o final. La densidad celular de la fase media típica era de aproximadamente $5x10^8$ células/ml, la cual se alcanzó durante el día 2 de la incubación principal. Tras la complementación con ácido linoleico a partir de ácido linoleico puro en reserva de etanol, a veces se notó un pequeño descenso en el pH, lo cual se corrigió aplicando algo de NaOH.

1.1.4 Muestreo y análisis fuera de línea

Se tomaron muestras diarias de 5 ml de manera aséptica, directamente del fermentador, para los análisis del recuento celular total (cámara de recuento Petroff-Hausser); masa antigénica (mediante ELISA de cantidad de antígeno); células inactivadas; y para perfilar el tipo de ácido graso y las cantidades relativas (mediante cromatografía de gases) en el medio de cultivo.

Las muestras se inactivaron con 0,1 o 0,2 % v/v de BPL, a 29 ºC durante 16-24 horas. Se ensayaron Leptospira inactivada en un ELISA de antígeno dentro de 24 horas.

1.2. ELISA de antígeno

La masa antigénica de antígeno LPS de Leptospira se determinó en ELISA de antígeno, los cuales se basaban en un

conjunto de anticuerpos monoclonales (moabs) de ratón, de aglutinación, específicos a serogrupo o serovar, los cuales se han obtenido de la: OMS/FAO/OIE y "National Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Department of Biomedical Research, Royal Tropical Institute", Ámsterdam, Holanda. Los moabs usados se enumeran en la Tabla 2. Para referencia véase: R. A. Hartskeerl y col., ("International course on laboratory methods for the diagnosis of Leptospirosis", 4ª Edición, 1 de abril de 2004. Royal Tropical Institute, Ámsterdam).

Los ELISA se configuraron como ensayos de captura, por lo que se usó el mismo moab para recubrimiento y para detección.

Tabla 2: Moabs usados para el ELISA de antígeno de *L. interrogans (sensu lato).*

serogrupo	serovar	moab
Canicola	Portland-vere	F152C11
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	F12C3
Australis	Bratislava	F81C3
Grippotyphosa	Dadas	F71C9
Pomona	Pomona	F43C9
Tarassovi	Gatuni	F151C8
Sejroe	Hardjo	F22C6

1.2.1 Preparación de anticuerpos monoclonales para recubrimiento

Los moabs para su uso en el ELISA de antígeno se podrían derivar de ascitos o de cultivo celular. Ambos tipos se purificaron antes del uso mediante un método no cromatográfico estándar. En pocas palabras: la albúmina y otras proteínas no IgG se precipitaron con ácido caprílico. A continuación, la fracción de IgG se precipitó con sulfato de amonio. Con este método era posible aislar más del 80 % de la IgG con una pureza igual a IgG purificada mediante cromatografía de intercambio aniónico.

Como alternativa, los moabs se podrían purificar mediante cromatografía en columna de proteína G.

1.2.2 Preparación de anticuerpos monoclonales conjugados

Para ELISA de antígeno se prepararon conjugados de Peroxidasa de rábano picante-IgG de los moabs, usando procedimientos estándar. Básicamente, la reacción implicó una oxidación de periodato de los residuos de carbohidrato de la enzima HRP para formar grupos aldehído, los cuales se hicieron reaccionar posteriormente con grupos amino libres sobre las moléculas de IgG monoclonales.

1.2.3 Preparación de patrones de referencia de la cantidad de antígeno

Se preparó un patrón de referencia para cada cepa de Leptospira que se ensayó mediante ELISA de antígeno. El patrón es un lote de antígeno de Leptospira monovalente, de células inactivadas. Esto se preparó usando técnicas comunes, esencialmente mediante la proliferación de una cepa específica de Leptospira en medio EMJH tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, se concentró el patrón y/o se diluyó en solución salina tamponada con fosfato, para contener aproximadamente $1x10^9$ células/ml. Un número arbitrario de unidades de antígeno se añadieron a la muestra, por ejemplo, 1.000 unidades/ml. Cuando se necesitó reponer el patrón, una preparación posterior del mismo patrón, se comparó y se calculó su titulación al lado al patrón antiguo varias veces, antes de reemplazarlo.

1.3. Análisis de ácido graso

Las composiciones y cantidades de ácido graso se ensayaron a partir de las muestras de células Leptospira, componentes de medio de cultivo, y de muestras de medio de cultivo EMJH completo, según los procedimientos bien conocidos. La extracción de ácidos grasos se hizo tal como se publicó por Bligh & Dyer (1959, *Can. J. of Biochem. Physiol.*, vol. 37, pág, 911 y Morrison & Smith (1964, *J. of Lipid Res.*, vol. 5, pág. 600). En pocas palabras: se ensayó una muestra de 0,5 ml, que contenía o bien medio de cultivo completo puro, o una muestra diluida en agua: de células Leptospira (entre $1x10^9$ y $1x10^{10}$ por 0,5 ml; las células habían sido BPL inactivadas), o de 1 % p/v de una muestra de BSA. Estos 0,5 ml se extrajeron con 1 ml de metanol y 2 ml de cloroformo, mezclando durante 3 minutos. Se añadieron otros 0,5 ml de agua, mezclados durante 30 s, y la muestra se centrifugó durante 10 min a 1.000xg a 2-8 º. Los 2 ml de la fase de cloroformo (inferior) se transfirió a un vial de vidrio, y el cloroformo se extrajo por secado bajo una corriente de gas de N_2. Los lípidos secos se volvieron a disolver en 0,6 ml de BF3 en metanol, se calentaron durante 15 min a 95 °C, lo cual metiló los ácidos grasos. A continuación, se añadieron 0,3 ml de agua en 0,3 ml de hexano, esto se mezcló mediante agitación, después de lo cual la fase de hexano (superior) se transfirió a una cromatografía de gases estándar configurada para análisis del perfil, y las cantidades relativas de los ácidos grasos en el extracto. Como patrón interno se usó una muestra de ácido graso C21:0 (ácido heneicosílico) de conocida concentración. Generalmente las muestras se midieron por duplicado, y las muestras se prepararon y se midieron en recipientes de

vidrio.

2. Comparación de las condiciones de proliferación de la técnica anterior

Como ejemplo comparativo, se analizó la formación de la masa antigénica en un cultivo discontinuo de Leptospira bajo condiciones de la técnica anterior estándar (por lo tanto sin complementación). Se cultivaron Leptospira del serogrupo Icterohaemorrhagiae en medio EMJH estándar, que se había completado con polisorbato 80 (Croda), y una BSA comercial estándar (Millipore). Después de varias rondas de preproliferación se inoculó un cultivo de fermentador principal y se desarrolló durante 5 o 6 días. Para Leptospira del serogrupo Icterohaemorrhagiae, la masa antigénica obtenida en estas condiciones de proliferación, estaba normalmente entre 500 y 700 unidades de antígeno (del serogrupo Icterohaemorrhagiae) por $1x10^9$ células, como el promedio durante los días 3-5, cuando el cultivo era estacionario.

Cuando dicho lote de antígeno de Leptospira se ensayó en un ensayo de potencia *in vitro* en el laboratorio, falló en alcanzar el nivel de potencia mínima requerida.

Este problema no se resolvió usando en medio EMJH una BSA comercial que era especialmente recomendado para el cultivo de Leptospira: BovoLep® BSA (Bovogen, Australia). Esto se ensayo junto a BovoStar®, el cual es una BSA multiusos estándar del mismo fabricante, y junto con la BSA (Millipore) que se usó antes. Los resultados se presentan en la tabla 3. "nd" es: no disponible.

De forma interesante, BovoLep® no incrementó la biomasa de Leptospira, tal como se publica, pero no tenía un efecto significativo sobre su masa antigénica. Esto tipifica el planteamiento clásico para la proliferación de Leptospira hasta el día de hoy: un foco sobre los niveles de biomasa.

Tabla 3: Los resultados de uso de diferentes ingredientes de BSA en medio EMJH:

condiciones del fermentador	concentración total de C18:2 µg/ml	Números celulares a los 3 días	U d Ag/10^9 células/ml, a los 3 días
BSA, Millipore	5	$1,6x10^9$	525
BSA, BovoStar®	nd	$1,6x10^9$	533
BSA, BovoLep®	nd	$1,8x10^9$	498

3. Efecto del ácido graso C18 poliinsaturado

3.1. Ácido linoleico

Solamente cuando más ácido linoleico (C18:2) se hizo disponible a cultivos de Leptopira, se incrementó la masa antigénica.

El medio EMJH estándar tal como se ha ensayado y descrito anteriormente se encontró que proporcionaba aproximadamente 5 µg/ml de ácido linoleico (véase la Tabla 3). Esto se deriva principalmente de 0,125 % de polisorbato 80, ya que el 1 % de BSA estándar proporcionó menos de 1 µg/ml de ácido linoleico, cerca del límite de detección del análisis cromatográfico de gases.

A este respecto, Polisorbato 80, tal como se define por la Farmacopea, se deja que contenga ácido linoleico hasta un máximo de 18 % de sus ácidos grasos. Sin embargo, en la práctica se encontró que lleva mucho menos, normalmente menos del 1,5 %. A partir de un tipo común de polisorbato 80 (tipo: Vegetable Grade, de: Croda, Francia) los inventores compararon el contenido de ácido linoleico de 48 lotes durante varios años, y encontraron que la cantidad promedio del ácido linoleico era de aproximadamente 0,3 % de los ácidos grasos totales. Asumiendo que el polisorbato 80 consiste esencialmente en ácidos grasos, entonces el 0,125 % v/v de polisorbato 80 que se usa en el medio EMJH, proporciona aproximadamente 4 µg/ml de ácido linoleico al cultivo.

Se creó una BSA que comprendía una cantidad incrementada de ácido linoleico. El uso de esta BSA con alta LA al 1 % p/v en medio EMJH proporcionó aproximadamente 21 µg/ml de ácido linoleico a un cultivo de Leptospira; con la contribución del polisorbato dicho medio de cultivo proporcionó 25 µg/ml de ácido linoleico a un cultivo de fermentador de Leptopira. Este incremento en la cantidad de ácido linoleico disponible, fuertemente incrementó la generación de antígeno de Leptospira, a una masa antigénica de 1.636 U de Ag/$1x10^9$ células (promedio de los días 3-5).

De esta manera los inventores han demostrado la utilidad de su descubrimiento: la masa antigénica de un cultivo de Leptospira se podía incrementar en 124 %, cuando un cultivo de Leptospira se complementó con 25 en lugar de con 5 µg/ml de ácido linoleico.

Las Figuras 1 y 2 representan los resultados de análisis de muestras diarias de un cultivo de Leptospira proliferante con complementación de ácido linoleico, usando BSA con alto LA en el medio EMJH. En la Figura 1 la biomasa (eje

vertical izquierdo) mostró un incremento regular durante todos los seis días de proliferación. La cantidad de antígeno (eje vertical derecho) alcanzó niveles mucho mayores que se podían obtener del uso de BSA estándar en el medio de cultivo. No obstante, la masa antigénica no incrementó mucho después del día tres. La Figura 2 muestra la razón, en el perfil de ácido graso del medio de este cultivo, que claramente demuestra la relevancia del ácido linoleico en este contexto; los resultados están en % p/p de los ácidos grasos totales. Por favor, anotar que los niveles de C16:0 (ácido palmítico), C18:0 (ácido esteárico), y C18:1 (ácido oleico) se refieren al eje vertical izquierdo, mientras que el nivel de C18:2 (ácido linoleico) se refiere al eje vertical derecho.

La Figura 2 muestra esencialmente cantidades iguales de los ácidos grasos C16:0, C18:0 y C18:1 en el medio de cultivo durante el transcurso del cultivo, por lo que C18:1, de polisorbato 80, forma el volumen de la cantidad total de ácido graso. Sin embargo, el nivel de C18:2 muestra una fuerte caída durante los tres primeros días, y está por debajo del límite de detección (≤ 0,3 %) en los días 3 - 5. El agotamiento del ácido linoleico coincide con la reducción del incremento en la generación de antígeno, ta como se muestra en la Figura 1.

3.2. ácido linolénico

Ninguna de las isoformas del ácido linolénico (C18:3): alfa o gamma, se podría detectar por encima del límite de detección de la cromatografía de gases (aproximadamente 0,6 µg/ml de ácido graso), en lotes de BSA o de polisorbato 80. Como consecuencia, el medio de cultivo EMJH completo estándar no contiene ninguna cantidad significativa de C18:3. Como resultado, en los experimentos en donde se ensayó la complementación de un ácido linolénico a un cultivo de Leptospira, esencialmente todo el ácido linolénico que se hizo disponible al cultivo, derivó del ácido linolénico que se había complementado al cultivo mediante adición separada.

4. Complementación adicional de ácido linoleico a un cultivo de Leptospira

Si se complementaba más ácido linoleico (C18:2), la masa antigénica se podía incrementar más.

En un cultivo similar tal como se ha descrito anteriormente, el ácido linoleico se complementó a fase exponencial media, en el día 2, con ácido linoleico puro, diluido en etanol. Se añadió una cantidad de ácido linoleico que proporcionó 100 µg/ml de ácido linoleico en el cultivo. Tal como el perfil del ácido graso de la Figura 3 muestra, después del rápido incremento inicial, y el claro pico resultante de la complementación en el día 2, los niveles de ácido linoleico disminuyeron a un ritmo constante tras la continuación del cultivo. Los niveles de los ácidos grasos C16:0 y C18:1 se ensayaron como referencias internas, pero estos eran muy iguales tal como se esperaba.

La masa antigénica producida en este experimento para Leptospira del serogrupo Icterohaemorrhagiae era de 1767 U de Ag. /1x10^9 células (promedio de los días 3-5).

5. Cultivos comparativos con diferentes condiciones de complementación

En experimentos más elaborados, de la misma configuración que en los Ejemplos previos, los cultivos de fermentador comparativos de Leptospira del serogrupo Icterohaemorrhagiae se desarrollaron uno al lado del otro, en donde se compararon las diferentes condiciones de complementación de ácido linoleico (C18:2). Para resaltar el efecto de la complementación del ácido linoleico, se usó una BSA estándar en el medio EMJH. En algunos fermentadores el ácido linoleico se complementó en la fase exponencial media, o bien en forma pura en etanol, o como un complejo con BSA, mediante la adición de una solución de una BSA con alto LA.

Las cantidades de ácido linoleico complementado eran de 50, 75 y 150 µg/ml. La Tabla 4 enumera también la cantidad total de ácido linoleico hecho disponible a los cultivos.

Para todos los fermentadores, se tomaron muestras diarias de células y medio y se analizaron. Los resultados se presentan en las Figuras 4 y 5 y en la Tabla 4 de a continuación. Los valores de masa antigénica se basan en promedios para los días 3 - 5 de los cultivos. Asimismo el incremento relativo en la masa antigénica para las diferentes complementaciones se expresa como un porcentaje relativo al cultivo no complementado con BSA estándar. El término "no complementado" se refiere a un cultivo que emplea BSA estándar en EMJH.

Tabla 4: Efecto sobre la masa antigénica de Leptospira de diferentes complementaciones con ácido linoleico

		Masa de Ag., promedio de los días 3 - 5	
condiciones del fermentador	concentración total de C18:2 µg/ml	U de Ag./10^9 células/ml	masa de Ag. relativa (%)
no complementado, estánd. BSA	5	729	100
C18:2 puro compl., 75	80	1450	199
C18:2 puro compl., 150	155	1550	213
BSA con alto LA compl., 50	55	1612	221

Tal como está claro a partir de la Tabla 4 y a partir de las correspondientes gráficas en las Figuras 4 (biomasa) y 5 (cantidad de antígeno), hay un rápido y significativo incremento en la masa antigénica de Leptospira cuando el cultivo se complementa con ácido linoleico, lo cual no se observa en un cultivo no complementado. Se da algún incremento en la biomasa tras la complementación de ácido linoleico, pero el incremento en la masa antigénica excede eso significativamente. El incremento en la masa antigénica de algún modo es mayor cuando el cultivo se complementa con 150 µg/ml, en comparación con la complementación con 75 µg/ml. Sin embargo, no había mucha diferencia entre cuando el ácido linoleico se complementó en forma pura, o como complejo con BSA. Posiblemente esto es una compensación entre el incremento de masa antigénica frente a alguna toxicidad.

Efectos adicionales favorable se pueden deducir de la Figura 5: una masa antigénica incrementada ahora se puede conseguir mucho más rápidamente a través de la complementación con ácido linoleico. Por ejemplo, la Figura 5 muestra que con la complementación del ácido linoleico, una masa antigénica alta se puede conseguir en horas desde la complementación.

Asimismo, cuando se comparan los niveles de masa antigénica máxima que se obtuvieron por último, es evidente que cuando los cultivos complementados se desarrollan durante el mismo tiempo que antes, entonces se pueden obtener cantidades considerablemente incrementadas de masa antigénica.

6. Confirmación del efecto de la complementación del ácido linoleico en Leptospira de diferentes serogrupos

En un próximo estudio se confirmó que el incremento en masa antigénica tras la complementación con ácido linoleico (C18:2) es un fenómeno general en Leptospira. En varios experimentos los cultivos de cepas de Leptospira de varios serogrupos se proliferaron en fermentadores en configuraciones similares que las anteriores y con una complementación similar: en medio EMJH con o bien BSA estándar o con BSA con alto LA; algunos cultivos se complementaro más con 100 µg/ml de ácido linoleico, a partir de ácido linoleico puro en etanol. Los resultados de los análisis de la cantidad de biomasa y antígeno se presentan en las Figuras 6 - 7 (Sejroe) y 8 - 9 (Grippotyphosa), y se resumen en la Tabla 5.

Para Leptospiras del serogrupo Sejroe (serovar Hardjo), la complementación con 100 µg/ml de ácido linoleico de medio de cultivo con BSA con alto LA dio como resultado un incremento de la masa antigénica con un impresionante 184 %. Se observó algún incremento en la biomasa después de la complementación, pero el incremento en la cantidad de antígeno era mucho mayor. El fermentador se hizo funcionar durante 6 días, y se hizo el promedio de las puntuaciones para estos experimentos durante los días 5 y 6 del cultivo.

Para el serogrupo Grippotyphosa se hizo el promedio de las puntuaciones durante los días 4 y 5 del cultivo. Un incremento del 63 % se observó en la masa antigénica, resultante de la complementación con ácido linoleico.

De forma similar, para el serogrupo Australis (serovar Bratislava), se observó un incremento en la masa antigénica del 45 %; en la presente el medio con BSA con bajo LA se usó para la complementación.

Tabla 5: Confirmación del efecto sobre la masa antigénica mediante la complementación con ácido linoleico para Leptospira de diferentes serogrupos

			Masa antigénica, día 2 promedio	
Serogrupo	condiciones del fermentador	concentración total de C18:2 µg/ml	U de Ag./10^9 células/ml	Ag. relativo Masa (%)
Sejroe	no complementado	5	--	--
	BSA con alto LA	25	287	100
	C18:2 puro compl., 100	125	814	284
Grippotyphosa	no complementado	5	--	--
	BSA con alto LA	25	5074	100
	C18:2 puro compl., 100	125	8286	163
Australis	no complementado	5	8862	100
	BSA con alto LA	25	--	--
	C18:2 puro compl., 100	105	12822	145

6.1. Complementación del serogrupo de Leptospira Tarassovi

En una complementación similar a la que se describe en el anterior Ejemplo 6, se ensayó el efecto de la

complementación con diferentes cantidades de ácido graso C18:2 sobre la biomasa y la masa antigénica de un cultivo de serogrupo de Leptospira Tarassovi en medio EMJH con BSA estándar. Los resultados se presentan en las Figuras 11 y 12.

Mientras que la complementación con 300 µg/ml de C18:2 resultó ser tóxica a este cultivo, la complementación con 100 o 200 µg/ml de C18:2 no produjo fuertes incrementos en la masa antigénica por unidad de biomasa: del 67 % respectivamente 99 %, en comparación con el cultivo de referencia no complementado.

7. Niveles de complementación máximos

En un estudio se investigó el máximo nivel de complementación de ácido linoleico (C18:2): se cultivaron Leptospiras del serogrupo Icterohaemorrhagiae en EMJH con BSA con alto LA y complementado con 100, 200 o 400 µg/ml adicionales de ácido linoleico, a partir de ácido linoleico puro en etanol. A partir de los resultados será aparente que la adición de 400 µg/ml indujo toxicidad para las bacterias, ya que los números celulares disminuyeron rápidamente después de la complementación. Por tanto, este experimento se repetirá dando un nivel igualmente alto de complementación de ácido linoleico, pero entonces a partir de ácido linoleico en un complejo con BSA que se ha saturado con ácido linoleico. El efecto estimulador del grupo complementado con 100 µg/ml era tal como se observó antes, mientras que el grupo de 200 µg/ml dio un poco menos incremento de la masa antigénica en comparación con la del grupo de 100 µg/ml.

Como consecuencia, bajo estas condiciones la complementación con ácido linoleico puro parece ser óptima cuando entre 25 y 250 µg/ml de ácido linoleico se hace disponible a un cultivo de Leptospira.

8. Momento de complementación

En experimentos adicionales de determinó la relevancia del momento de complementación de un cultivo de Leptospira. Usando Leptospira del serogrupo Icterohaemorrhagiae, los momentos de complementación ensayados eran las fases temprana, media y última. El medio EMJH con BSA estándar se complementó con 100 µg/ml de ácido linoleico puro en etanol. La cantidad total de ácido linoleico hecha disponible a estos cultivos era, por tanto, de 105 µg/ml.

Los resultados se presentan en la Tabla 6 y la Figura 10. Tal como demuestra la Figura 10, un incremento intenso en la masa antigénica se puede inducir en todas las fases del cultivo de Leptospira, con una escalada muy rápida ya en 2, 4 y 8 horas después de la complementación. Con esta escala de tiempo, el incremento en gran parte resulta de un proceso bioquímico, y menos de la proliferación.

El hecho de que la cantidad de antígeno producido parece ser menor cuando la complementación se hace después, deriva del leve efecto positivo que la complementación del ácido linoleico tiene sobre la biomasa. Esto se estabiliza cuando se expresa la masa antigénica por cantidad de célula patrón, véase la Tabla 6.

Tabla 6: Efecto de la complementación del ácido linoleico en diferentes fases de proliferación de un cultivo de Leptospira.

		Masa de Ag., promedio de los días 4 - 5	
condiciones del fermentador	concentración total de C18:2 µg/ml	U de Ag./10^9 células/ml	masa de Ag. relativa (%)
no complementado, BSA con bajo LA	5	789	100
1x10^8 células/ml, 100	105	1783	226
5x10^8 células/ml, 100	105	1564	198
9x10^8 células/ml, 100	105	1656	210

Los ensayos de complementación en momentos adicionales: después de la recolección, después del lavado y después de la concentración, están en desarrollo. La incubación de los cultivos en la fase final puede requerir refresco de medio; no obstante la complementación de un cultivo en la fase final se estima que es la más favorable, debido a que en esa fase las células están en altos números, y aún son capaces de la formación de masa antigénica. Además en esta fase es menos relevante si alguna toxicidad del ácido linoleico complementado interferiría con la capacidad de las células de proliferar ya que eso no es requerido más.

9. Determinación de la inmunopotencia mejorada de vacunas preparadas a partir de cultivos de Leptospira complementados

Se han producido cultivos de Leptospira que se complementaron con ácido linoleico, tal como se ha descrito anteriormente. Estos se formularán dentro de vacunas de Leptospirosis con adyuvante inactivado como es bien conocido en la técnica, y se ensayaron en experimentos *in vivo* tal como se prescribe en las monografías de la Farmacopea. Se hará un seguimiento de los efectos de la serorespuesta, protección a la exposición, y nivel de

reacciones adversas de la vacunación.

Debido a que para las vacunas de Leptospirosis la correlación entre la masa antigénica y capacidad inmunoprotectora es bien conocida, se puede predecir con certeza que las vacunas de bacterina que tienen una mayor masa antigénica que antes, también inducirán mayores niveles de inmunoprotección.

De forma similar, debido a que la carga proteica de las vacunas de bacterina de Leptospira está claramente implicada como el efecto causante de los efectos secundarios de la vacunación, también se puede predecir que las vacunas de bacterina de Leptospira que tienen menos proteína, pero igual masa antigénica que antes, inducirán menos efectos secundarios, pero una inmunización igual, o probablemente mejorada.

10. Complementación de cultivos de Leptospira con ácido linolénico

La complementación de los cultivos de Leptospira con un ácido linolénico (C18; 3) o bien alfa o gamma, se hizo esencialmente tal como se ha descrito anteriormente con ácido linolénico (C18:2). Los resultados también eran en gran parte comparables, excepto para casos en donde una Leptospira particular mostró una particular preferencia para una forma de ácido graso C18 poliinsaturado sobre los otros.

La masa antigénica por unidad de biomasa, también se calculó de una manera similar, durante los días en donde el cultivo de Leptospira era estacionario; normalmente esto era en los días 3-4-5 después de la inoculación, ocasionalmente y para algunos serogrupos que era en los días 4-5-6 después de la inoculación. Como antes, la puntuación de masa antigénica promedio por ELISA se calculó por $1x10^9$ células (preinactivación). El incremento relativo en la masa antigénica se calculó en relación con el cultivo de referencia, el cual no recibió complementación. La masa antigénica promedio/$1x10^9$ células del cultivo de referencia se fijó en el incremento del 0 %.

En todos los experimentos con complementación de los cultivos de Leptospira con C18:3, el EMJH se ha preparado usando un BSA estándar (Millipore), y polisorbato 80 (Croda). Tal como se describe, dicho medio EMJH de sí mismo contenía cantidades insignificantes de C18:3.

Tanto C18:3 alfa como gamma se compraron como compuestos químicos puros (> 98 %). Poco antes del uso para la complementación, se diluyeron en etanol puro a 10 % o 20 % v/v, dependiendo de la cantidad de C18:3 que era para ser añadido a un cultivo. Esta dilución en etanol se añadió a un cultivo de Leptospira mediante la adición en 5 dosis, divididas durante un período de 4 horas.

10.1. Consumo de ácido linolénico en cultivos de Leptospira

En línea con lo que se describe para C18:2 en el Ejemplo 4 y las Figuras 1 - 3, se estudió el consumo de C18:3, con y sin complementación. Los resultados para un cultivo del serogrupo de Leptospira Icterohaemorrhagia en medio EMJH se presentan en las Figuras 13 y 14. La expansión de biomasa estándar de estos cultivos era similar a la presentada en la Figura 1.

La Figura 13 presenta el perfil de cantidades relativas de los ácidos grasos principales en un cultivo no complementado: C16:0 y C18:1, estos se presentan en relación con el eje vertical lateral izquierdo, y permanece relativamente constante, incluso cuando se expande el cultivo. Las cantidades de C18:2 y C18:3 se presentan en relación con el eje vertical lateral derecho: en el día 3, los niveles de C18:2 ya se han agotado, y los niveles de C18:3 alfa están decayendo a ritmo constante, y se agotan a partir del día 5 en adelante.

La Figura 14 presenta un perfil similar, pero de un cultivo que se complementó con 200 µg/ml de alfa C18:3 en el día 3 después de la inoculación. En esta figura todas las cantidades relativas de ácido graso se presentan basadas en el eje vertical lateral izquierdo. Tal como se puede ver, la complementación de alfa C18:3 da como resultado un nivel claramente detectable de C18:3 por el momento de muestreo día 3,3. En días posteriores, esta cantidad se consume a un ritmo constante, y se agota de nuevo el día 5. El correspondiente incremento en la masa antigénica se muestra en las Figuras 16, 18 y 20.

10.2. Efecto de la complementación de diferentes cantidades de C18:3

Comparable con lo que se describe para C18:2 en el Ejemplo 5 y las Figuras 4 y 5, un cultivo del serogrupo de Leptospira Icterohaemorrhagiae en medio EMJH se complementó con diferentes cantidades de C18:3, o bien ácido alfa-linolénico (alfa C18:3) o ácido gamma-linolénico (gamma C18:3). Los resultados se presentan en las Figuras 15 - 20.

Tal como está claro en todos estos resultados: la complementación con ácido linolénico induce en un cultivo de Leptospira un incremento en masa antigénica que excede fuertemente un incremento en biomasa, produciendo un incremento neto en masa antigénica por unidad de biomasa.

Las Figuras 15 y 16 muestran los efectos sobre la biomasa y sobre la masa antigénica de la complementación con

100, 200, 300, o 400 µg/ml alfa C18:3. Claramente la complementación de 300 o 400 µg/ml tenían efectos tóxicos sobre el cultivo. Para las otras cantidades, 100 µg/ml de alfa C18:3 dieron un incremento un poco mejor en masa antigénica:122 %, por encima de 200 µg/ml de alfa C18:3:81 %.

Las Figuras 17 y 18 muestran los efectos sobre la biomasa y sobre la masa antigénica de la complementación con 200, 300, o 400 µg/ml de alfa C18:3. Aparentemente el gamma C18:3 se toleró mejor mediante el cultivo de Icterohaemorrhagiae que el alfa C18:3, ya que solamente la cantidad de 400 µg/ml mostró toxicidad.

La complementación con 200 µg/ml de gamma C18:3 dio un incremento un poco menor en masa antigénica que la complementación con 300 µg/ml de gamma C18:3:114 % frente a 153 %.

Las Figuras 19 y 20 muestran una comparación de efectos de una cantidad igual de alfa o gamma C18:3, sobre biomasa y masa antigénica de un cultivo del serogrupo de Leptospira Icterohaemorrhagiae en medio EMJH. Una complementación con 100 µg/ml de alfa C18:3 indujo un incremento mayor en relación con la masa antigénica que dio 100 µg/ml de gamma C18:3:122 % frente a 170 %.

Esto demuestra la preferencia del Leptospira del serogrupo Icterohaemorrhagiae para el isómero alfa de C18:3.

10.3. Efecto de la complementación de C18:3 de otros serogrupos de Leptospira

Comparable con lo que se describe para C18:2 en el Ejemplo 6 y las Figuras 6 - 9 y 11-12, el efecto sobre la masa antigénica mediante la complementación con un ácido linolénico también se ensayó sobre Leptospira de serogrupos distintos de Icterohaemorrhagiae. En particular, se ensayaron cultivos de los serogrupos Australis (serovar Bratislava), Tarassovi, Grippotyphosa, Pomona, o Canicola, mediante la complementación con 100 o 200 µg/ml de alfa C18:3, o con 100 µg/ml de gamma C18:3. Los resultados se presentan en las Figuras 21-32 y en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7: Efecto de la complementación de C18:3 sobre cultivos de Leptospira de diversos serogrupos

	Incremento relativo en masa antigénica (%)			
Serogrupo	100 µg/ml de alfa C18:3	200 µg/ml de alfa C18:3	100 µg/ml de gamma C18:3	Figuras
Australis (serovar Bratislava)	40	62	15	21 y 22
Tarassovi	59	141	51	23 y 24
Grippotyphosa	60	63	57	25 y 26
Pomona	0	0	73	27 y 28

Se indicó que ese Leptospira de los serogrupos Australis, Tarassovi y Grippotyphosa en general no tenía una fuerte preferencia por ningún isómero de C18:3. Sin embargo, el serogrupo Pomona tenía una fuerte preferencia, principalmente por gamma C18:3; su generación de masa antigénica era incluso menor que del cultivo de referencia cuando se complementó el alfa C18:3.

Leptospiras del serogrupo Canicola (cepa WS 280503) se ensayaron con varias cantidades de alfa o gamma C18:3, ya que Canicola parecía requerir (respectivamente: podría tolerar) mayores cantidades de ácido graso antes de que se muestre un incremento relativo en masa antigénica. Los resultados se presentan en las Figuras 29 - 32 y en la Tabla 8.

Tabla 8: Efecto de la complementación de C18:3 de cultivos del serogrupo de Leptospira Canicola

Serogrupo Canicola	Incremento relativo en masa antigénica (%)	Figuras
200 µg/ml de alfa C18:3	107	29 y 30
300 µg/ml de alfa C18:3	112	
400 µg/ml de alfa C18:3	118	
200 µg/ml de gamma C18:3	98	31 y 32
300 µg/ml de gamma C18:3	83	

10.4. Niveles de complementación máximos de C18:3

Comparable con lo que se describe para C18:2 en el Ejemplo 7, el efecto de la cantidad de C18:3 que se complementa parece limitado en la práctica por su citotoxicidad para Leptospira. Aunque el serogrupo Canicola parecía tolerar de algún modo mayores niveles de complementación de C18:3, la mayoría de otros serogrupos mostraron citotoxicidad de 200 µg/ml de C18:3 y por encima. No había clara diferencia observada para la citotoxicidad a partir del isómero alfa o gamma de C18:3.

10.5. Momento para la complementación de C18:3

Comparable con lo que se describe para C18:2 en el Ejemplo 8 y la Figura 10, el efecto de complementación de un cultivo del serogrupo de Leptospira Icterohaemorrhagiae en medio EMJH, se ensayó con alfa o gamma C18:3 a diferentes momentos del cultivo. Los resultados se presentan en las Figuras 33 - 36.

Las Figuras 33 y 34 muestran los resultados de complementación con alfa C18:3 a 1, 5 u $8x10^8$ células/ml. Los incrementos relativos en masa antigénica observados eran:163. 164 y 140 %, respectivamente.

Las Figuras 35 y 36 muestran los resultados de complementación con gamma C18:3 a 2, 5 u $8x10^8$ células/ml. Los incrementos relativos en masa antigénica observados eran:71, 81 y 162 %, respectivamente.

Como consecuencia, el efecto del momento adecuado de la complementación con C18:3, en función de la concentración celular en el momento de la complementación, no parece muy crítico. Aunque la complementación con alfa C18:3 dio el mayor incremento en masa antigénica cuando se aplica a concentración celular baja-media, mientras que el gamma C18:3 dio el mayor incremento cuando se aplica a alta concentración celular.

10.6. Complementación combinada de diferentes ácidos grasos C18 poliinsaturados

Sorprendentemente se observó que los ácidos grasos C18 poliinsaturados también se pueden combinar en la complementación, y entonces causan un efecto acumulativo. Esto se ensayó con un cultivo del serogrupo de Leptospira Icterohaemorrhagiae en medio EMJH, que se complementó con o bien 100 µg/ml de C18:2, con 100 µg/ml de alfa C18:3, o con la combinación de 50 µg/ml de C18:2 y 50 µg/ml de alfa C18:3. La combinación de ácidos grasos se proporcionó al cultivo añadiendo los dos ácidos grasos como diluciones al 10 % en etanol por separado, prácticamente simultáneas, en 5 adiciones durante el transcurso de 4 horas.

Los incrementos en masa antigénica relativa obtenidos eran:77 %, 144 % y 118 % respectivamente. Los resultados se muestran en las Figuras 37 y 38.

Notablemente el incremento en la masa antigénica obtenida mediante complementación con una combinación de C18:2 y C18:3 produjo un nivel de incremento relativo de masa antigénica (118 %), eso está muy cerca de la media algorítmica (111 %) de los incrementos relativos de las complementaciones separadas.

Leyenda de las Figuras

Figura 1:
Los resultados de la biomasa y de ELISA de antígeno con el tiempo, sobre un cultivo de Leptospira del serogrupo Icterohaemorrhagiae en medio EMJH que contiene BSA con alto LA que no se complementó más.

Figura 2:
Los resultados de los análisis del perfil de ácido graso en el medio de cultivo del cultivo representado en la Figura 1.

Figura 3:
El perfil del ácido graso del medio de cultivo de un cultivo de Leptospira del serogrupo Icterohaemorrhagiae en EMJH con BSA con alto LA, por lo que el cultivo se complementó con 100 µg/ml de ácido linoleico a una densidad celular de $5x10^8$ células/ml en el día 2

Figuras 4 y 5:
Respectivamente los resultados de la medida de la cantidad de biomasa y de antígeno de diferentes cultivos de Leptospira del serogrupo Icterohaemorrhagiae, proliferados en medio EMJH con BSA estándar; los cultivos o bien son no complementados como cultivo de referencia, o complementados con ácido linoleico: uno con 75 µg/ml de ácido linoleico, a partir de ácido linoleico puro en etanol; uno con 150 µg/ml, también a partir de ácido linoleico puro en etanol, y uno con 50 µg/ml de ácido linoleico, como ácido linoleico formando complejo con BSA.

Figuras 6 y 7:
Respectivamente los resultados de la medida de la cantidad de biomasa y de antígeno de diferentes cultivos de Leptospira del serogrupo Sejroe (serovar Hardjo), proliferados en medio EMJH con BSA con alto LA; los cultivos o bien son no complementados como cultivo de referencia, o complementados con 100 µg/ml de ácido linoleico a partir de ácido linoleico puro en etanol.

Figuras 8 y 9:
Respectivamente los resultados de la medida de la cantidad de biomasa y de antígeno de diferentes cultivos de Leptospira del serogrupo Grippotyphosa, proliferados en medio EMJH con BSA con alto LA; los cultivos o bien son no complementados como cultivo de referencia, o complementados con 100 µg/ml de ácido linoleico a partir de ácido linoleico puro en etanol.

Figura 10:
Efecto sobre el incremento en la masa antigénica cuando un cultivo de Leptospira se complementa en diferentes fases de proliferación. Se cultivaron Leptospiras del serogrupo Icterohaemorrhagiae en medio EMJH estándar y se complementó con 100 µg/ml de ácido linoleico, en la fase temprana, media o tardía. El muestreo inicial a 2, 4 y 8 horas después de la complementación.

Figuras 11 y 12:
Efectos de la complementación con diferentes cantidades de ácido linoleico, sobre biomasa y masa antigénica de un cultivo del serogrupo de Leptospira Tarassovi, en medio EMJH estándar.

Figuras 13 y 14:
Perfil de las cantidades de ácido graso relativas en un cultivo del serogrupo de Leptospira Icterohaemorrhagiae en medio EMJH, con el tiempo.

Figura 13: cultivo no complementado; NB: los niveles de C18:2 y C18:3 se presenta en relación al eje vertical lateral derecho.

Figura 14: cultivo complementado con 200 µg/ml de alfa C18:3.

Figuras 15 - 20:
Los efectos de la complementación con diferentes cantidades de alfa o gamma C18:3, sobre biomasa y masa antigénica de cultivos del serogrupo de Leptospira Icterohaemorrhagiae en medio EMJH.

Figuras 21 - 32:
Los efectos de la complementación con diferentes cantidades de alfa o gamma C18:3, sobre biomasa y masa antigénica de cultivos de Leptospira de diferentes serogrupos, en medio EMJH.

Figuras 21 y 22: cultivo del serogrupo de Leptospira Australis (serovar Bratislava),

Figuras 23 y 24: cultivo del serogrupo de Leptospira Tarassovi,

Figuras 25 y 26: cultivo del serogrupo de Leptospira Grippotyphosa,

Figuras 27 y 28: cultivo del serogrupo de Leptospira Pomona,

Figuras 29 a 32: cultivo del serogrupo de Leptospira Canicola.

Figuras 33 - 36:
Los efectos de la complementación de un cultivo del serogrupo de Leptospira Icterohaemorrhagiae en medio EMJH, con alfa o gamma C18:3 en diferentes momentos del cultivo.

Figuras 37 y 38:
Comparación del efecto de la complementación separada frente a combinada con diferentes ácidos grasos C18 poliinsaturados, sobre la biomasa y la masa antigénica de un cultivo del serogrupo de Leptospira Icterohaemorrhagiae en medio EMJH.

REIVINDICACIONES

1. Método para incrementar la masa antigénica de un cultivo de Leptospira, comprendiendo el método la etapa de complementar dicho cultivo de Leptospira con un ácido graso C18 poliinsaturado.

2. Un método según la reivindicación 1, en donde el ácido graso C18 poliinsaturado es uno o más seleccionado del grupo que consiste en: ácido linoleico, ácido alfa-linolénico y ácido gamma-linolénico.

3. Un método según las reivindicaciones 1 o 2, comprendiendo el método la etapa de incubación de un cultivo de Leptospira bajo condiciones en las que se proporcionaron a dicho cultivo al menos 15 µg/ml de un ácido graso C18 poliinsaturado/ml.

4. Método para producir una vacuna contra Leptospirosis, comprendiendo dicho método las etapas de:

a. proliferar un cultivo de Leptospira en un sistema *in vitro*,
b. complementar dicho cultivo de Leptospira con un ácido graso C18 poliinsaturado,
c. inactivar y recoger dicho cultivo de Leptospira complementado, y
d. mezclar el cultivo de Leptospira inactivado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. Un método según la reivindicación 4, en donde entre las etapas a. y b. hay una etapa adicional que comprende recolección, almacenamiento y/o purificación, del cultivo de Leptospira.

6. Uso de un compuesto o una composición que son relativamente ricos en un ácido graso C18 poliinsaturado para un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 4 o 5, en donde un compuesto o una composición son "relativamente ricos" en un ácido graso C18 poliinsaturado, si comprenden un ácido graso C18 poliinsaturado en una cantidad de al menos aproximadamente el 5 % de su cantidad total de ácidos grasos.

7. Un uso según la reivindicación 6, en donde el compuesto o la composición que son "relativamente ricos" en un ácido graso C18 poliinsaturado es un aceite vegetal.

Figura 1

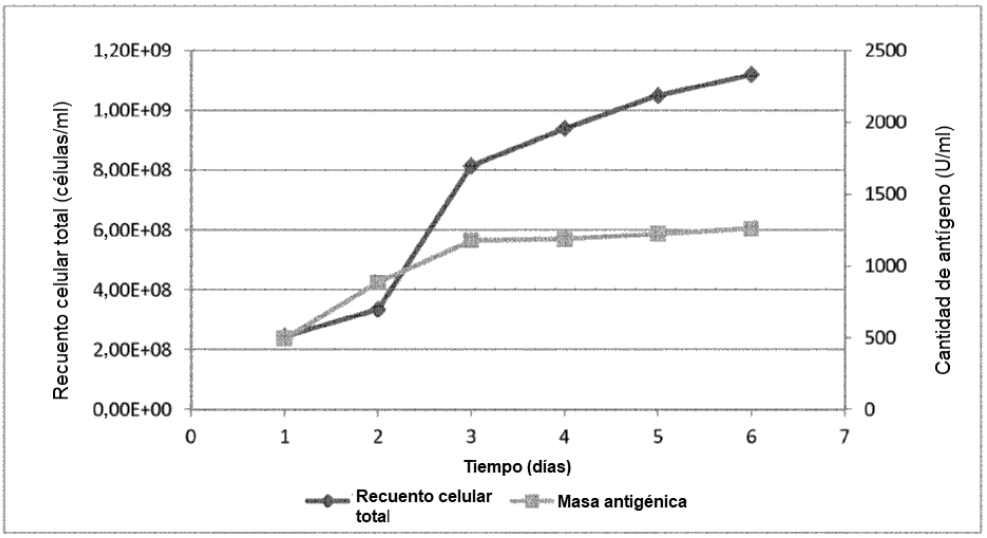

Figura 2

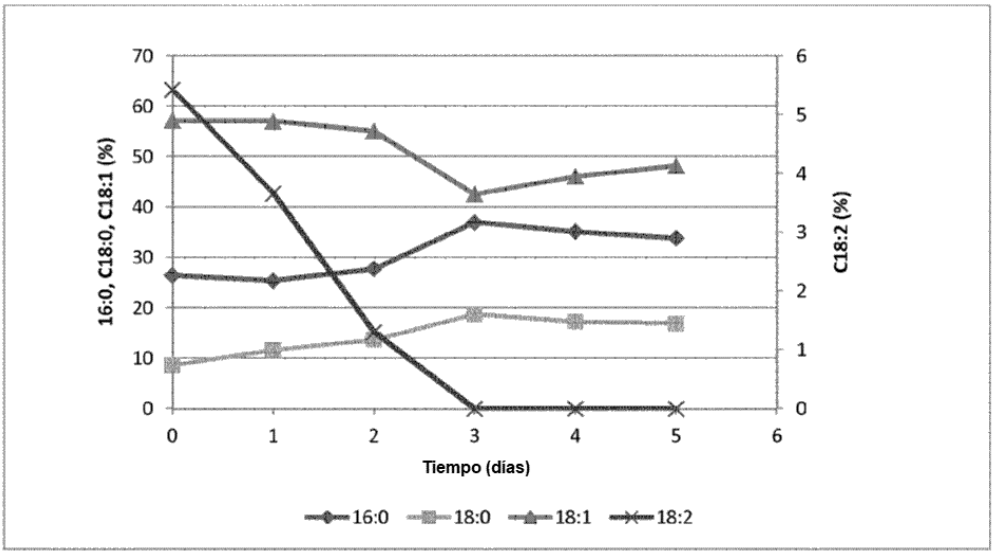

Figura 3

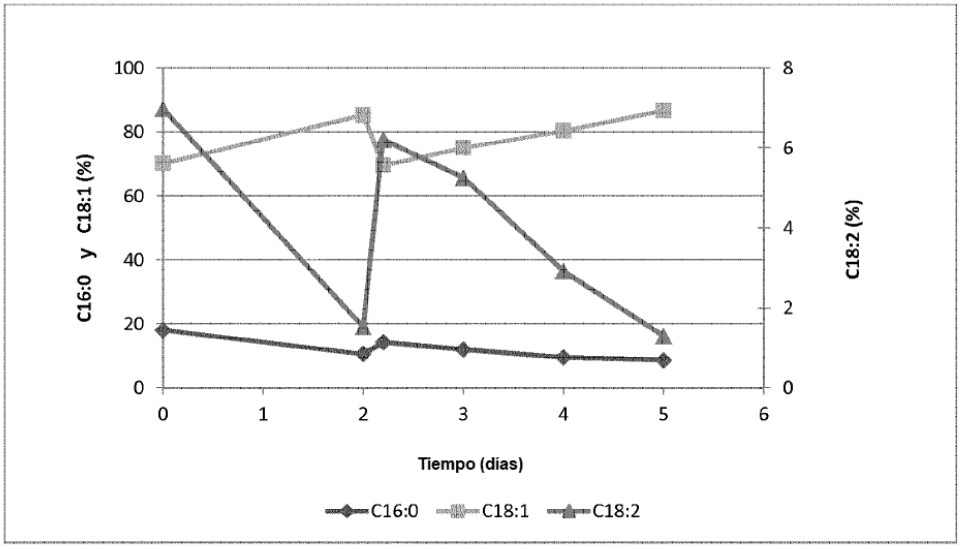
100
80
60
40
20
0
C16:0 y C18:1 (%)
8
6
4
2
0
C18:2 (%)
0
1
2
3
4
5
6
Tiempo (días)
C16:0
C18:1
C18:2

Figura 4

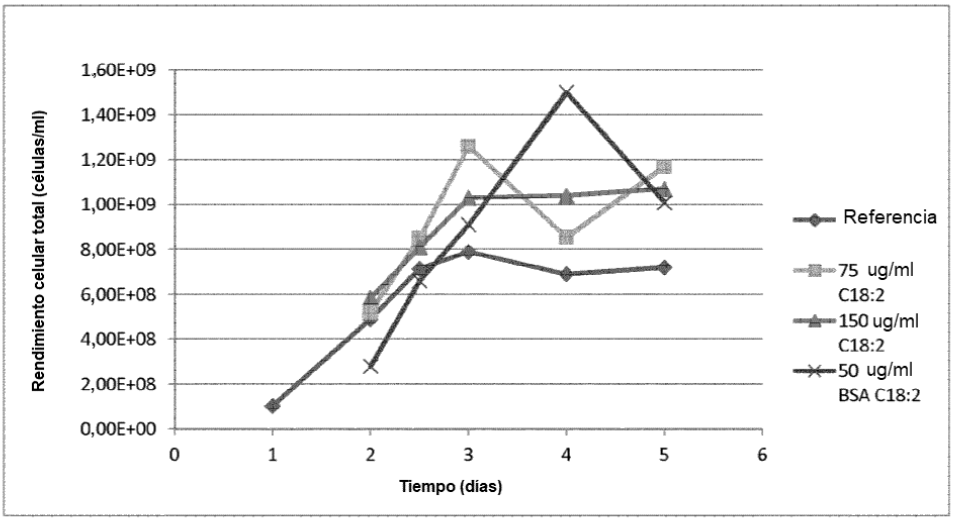

Figura 5

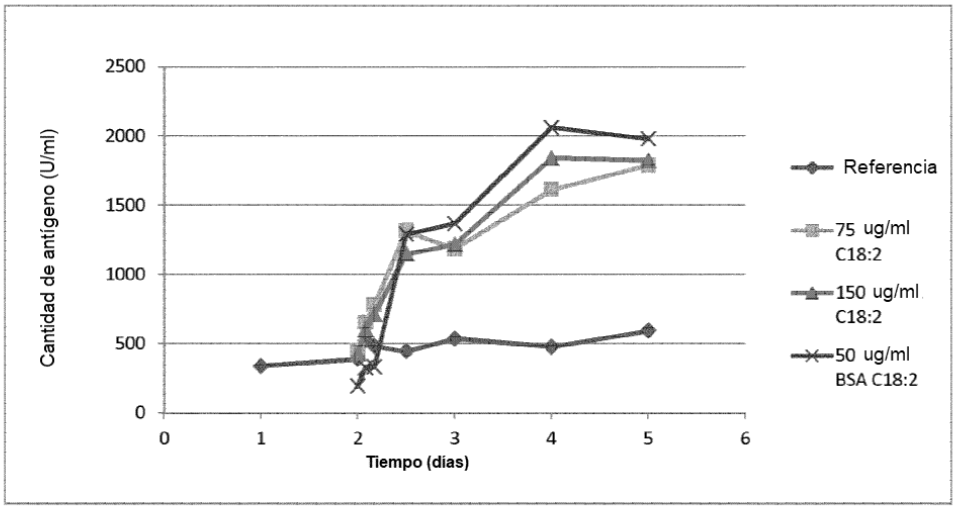

Figura 6

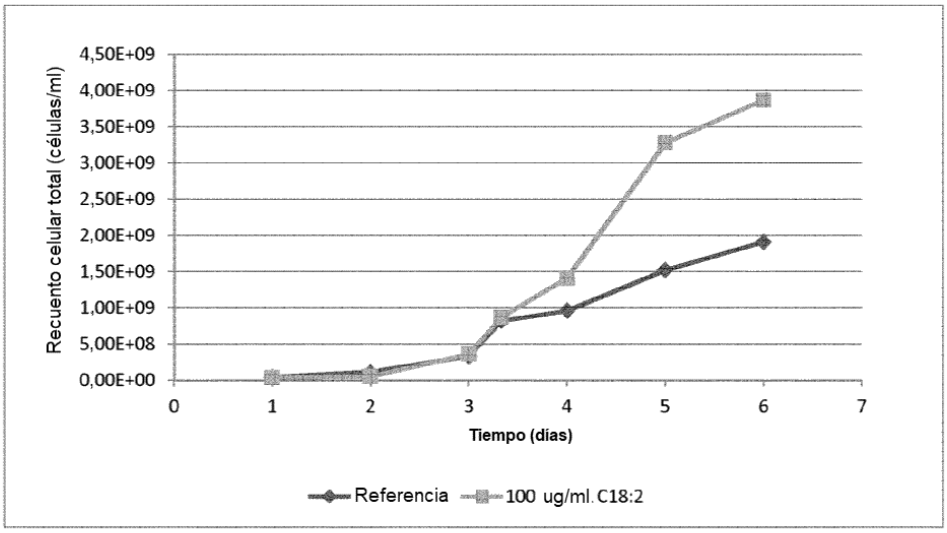

Figura 7

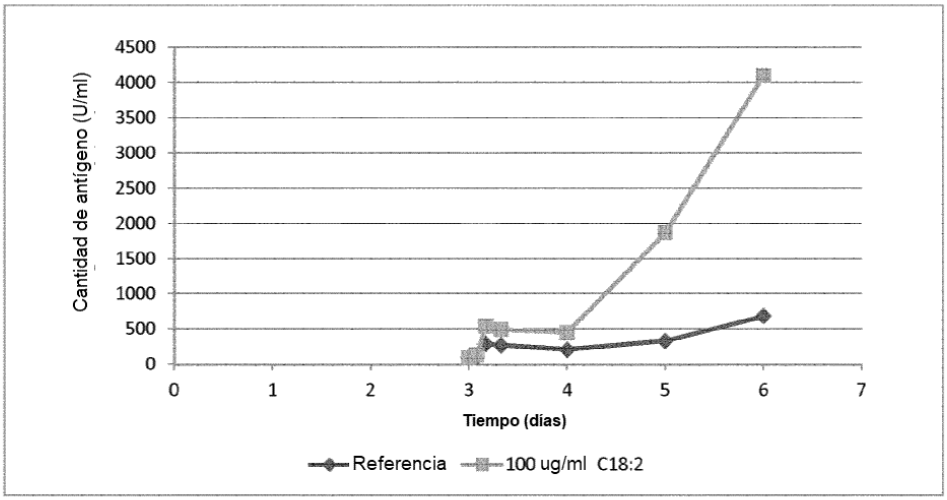

Figura 8

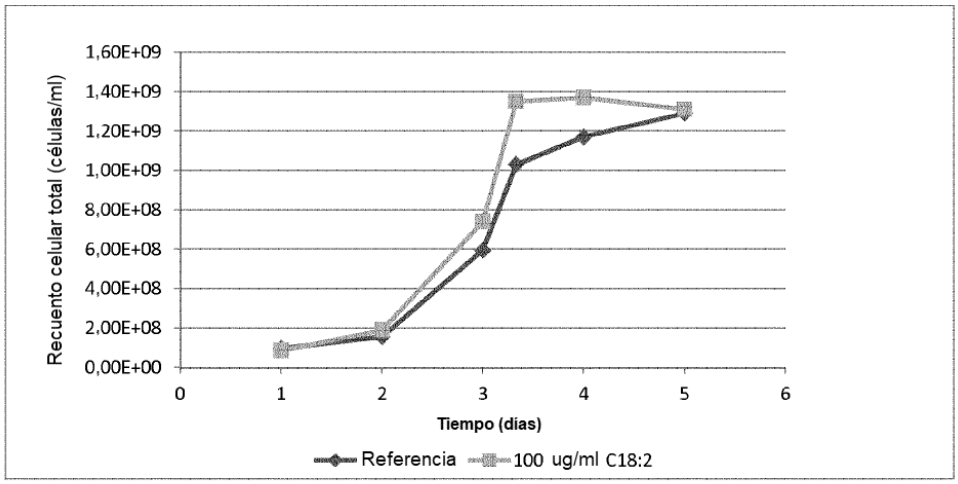

Figura 9

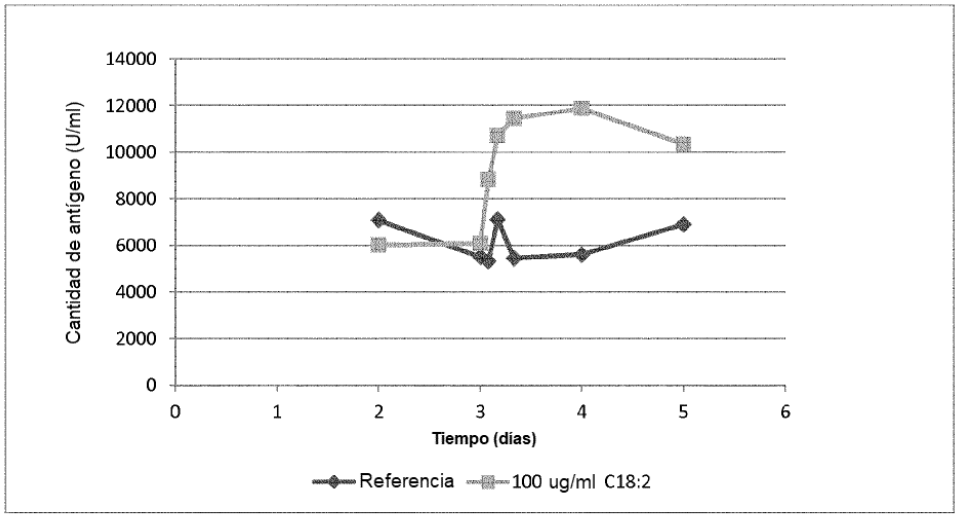

Figura 10

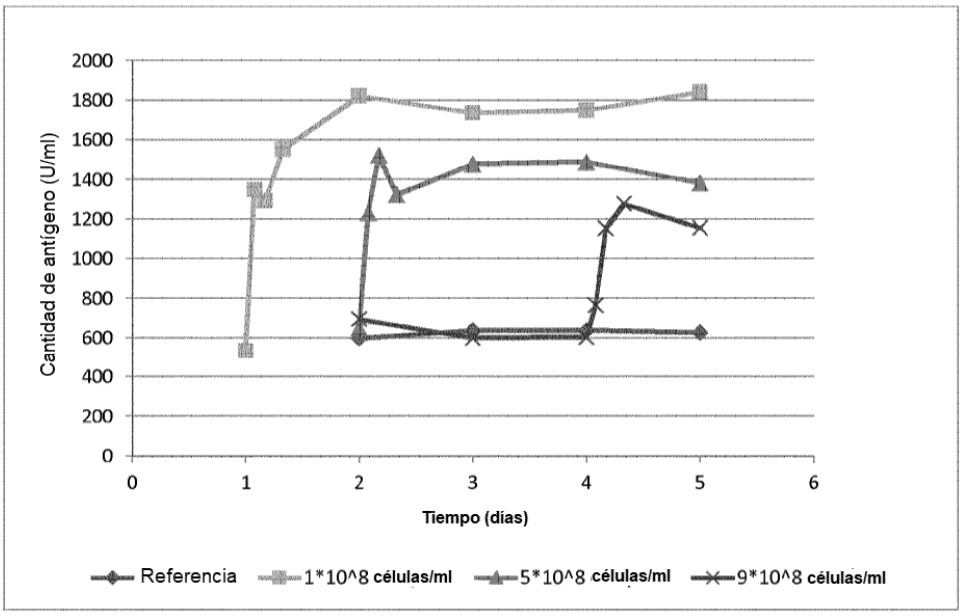
Cantidad de antígeno (U/ml)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
1
2
3
4
5
6
Tiempo (días)
Referencia
1*10^8 células/ml
5*10^8 células/ml
9*10^8 células/ml

Figura 11

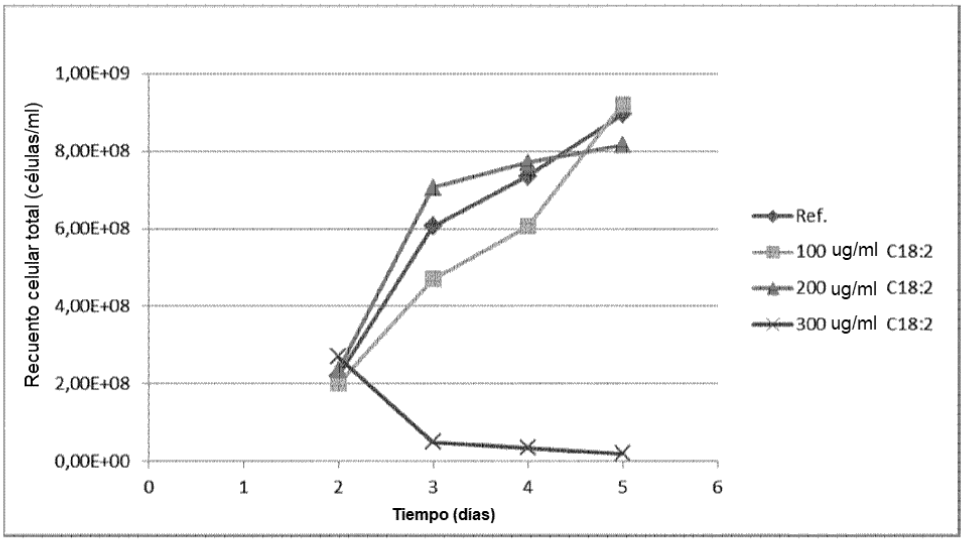

Figura 12

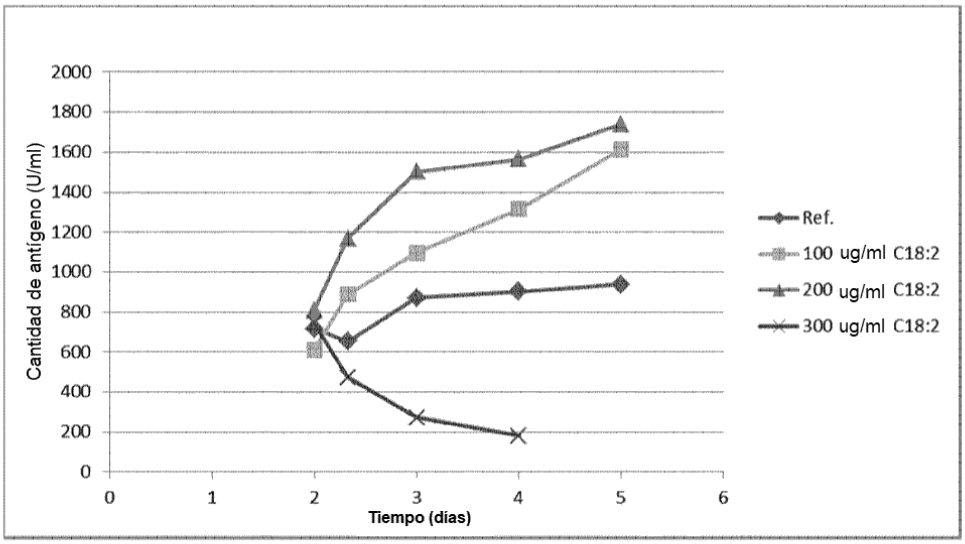

Figura 13

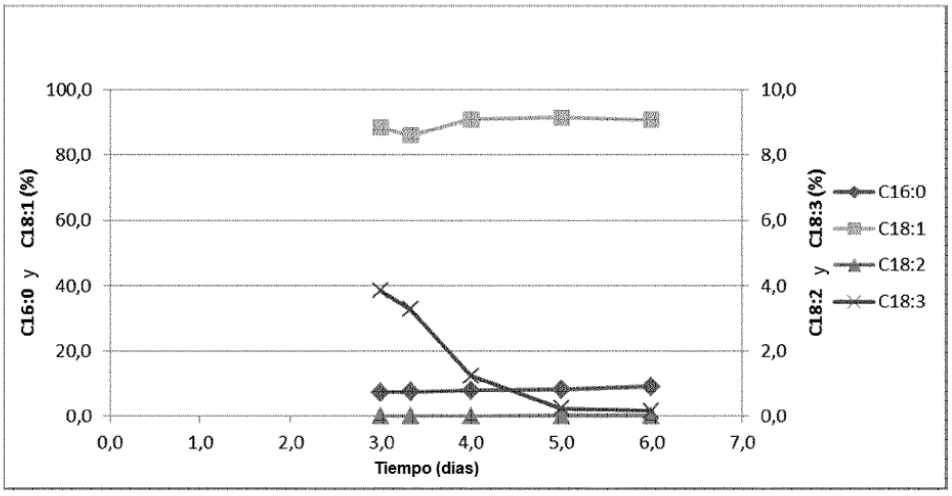

Figura 14

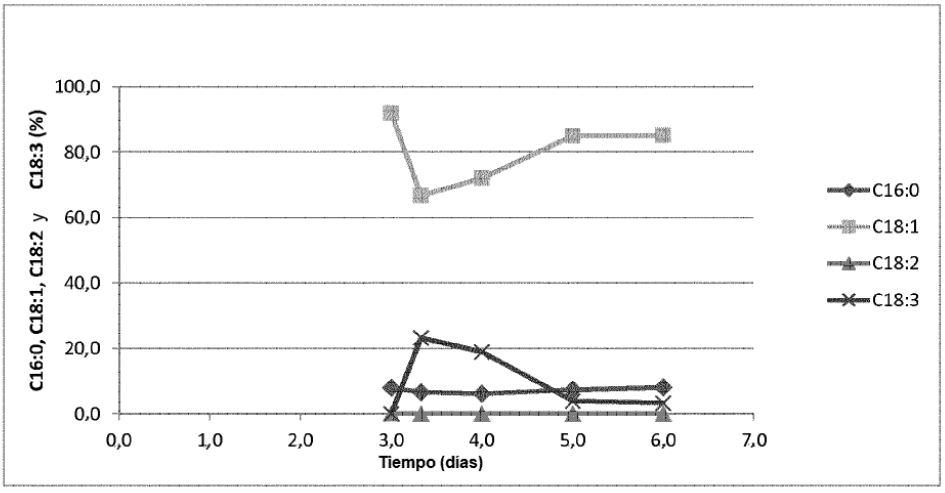

Figura 15

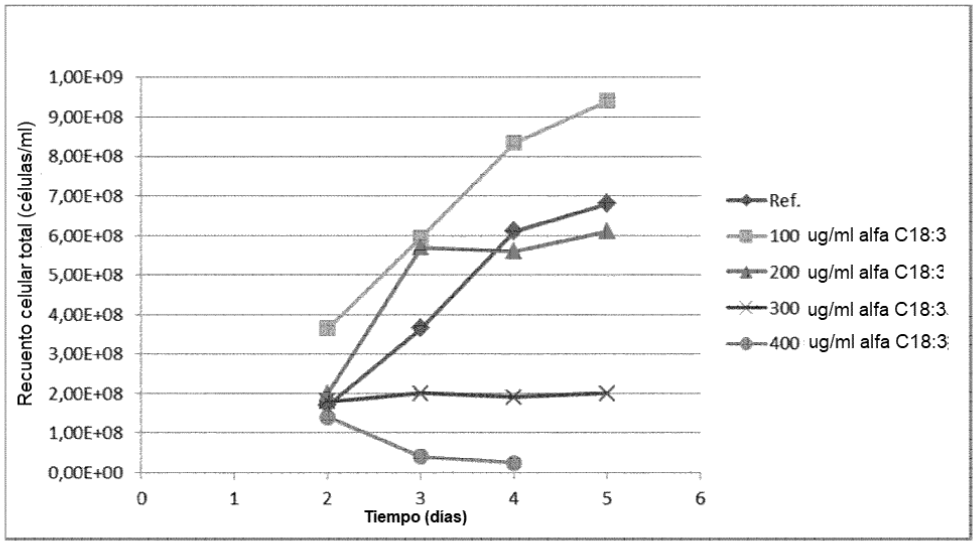

Figura 16

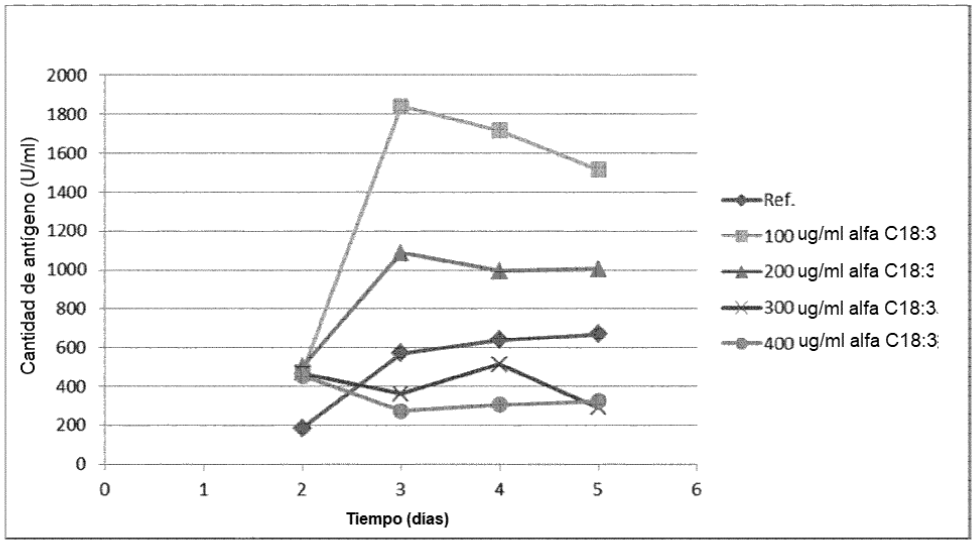

Figura 17

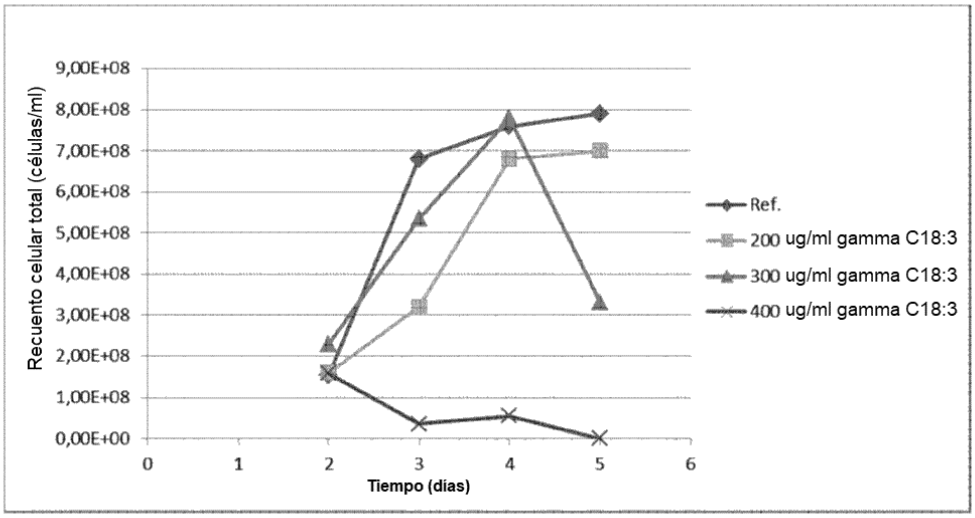

Figura 18

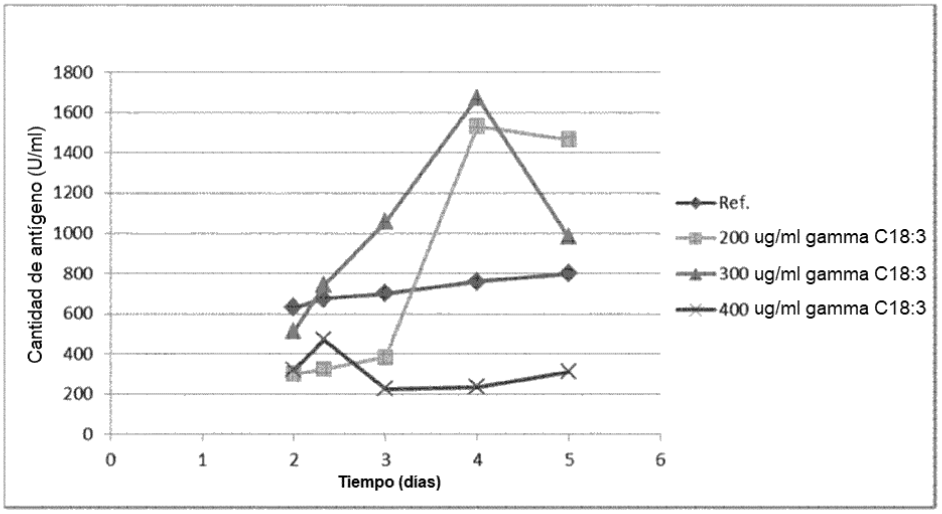

Figura 19

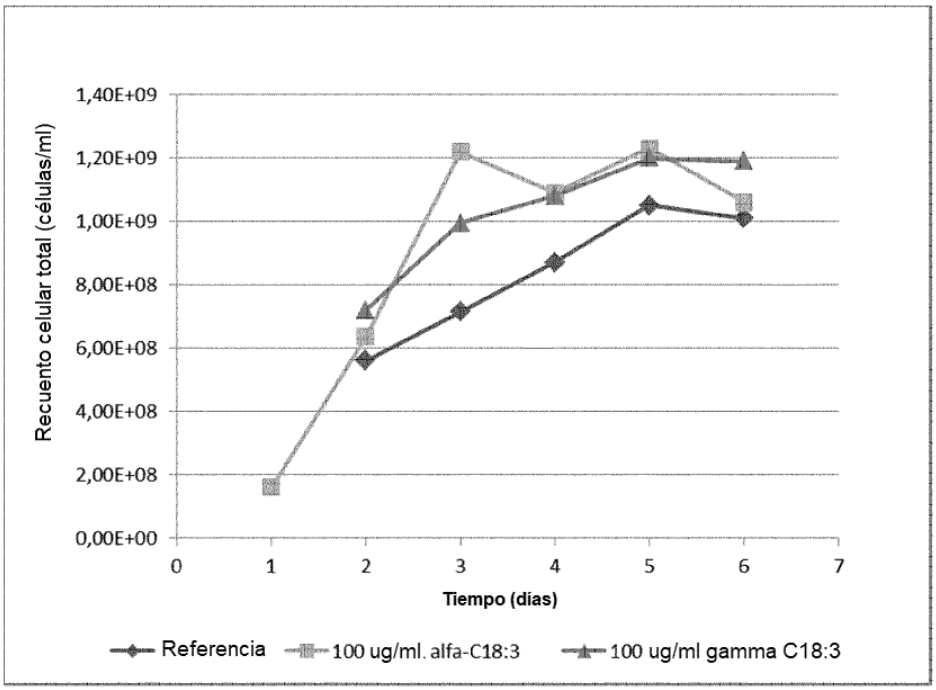

Figura 20

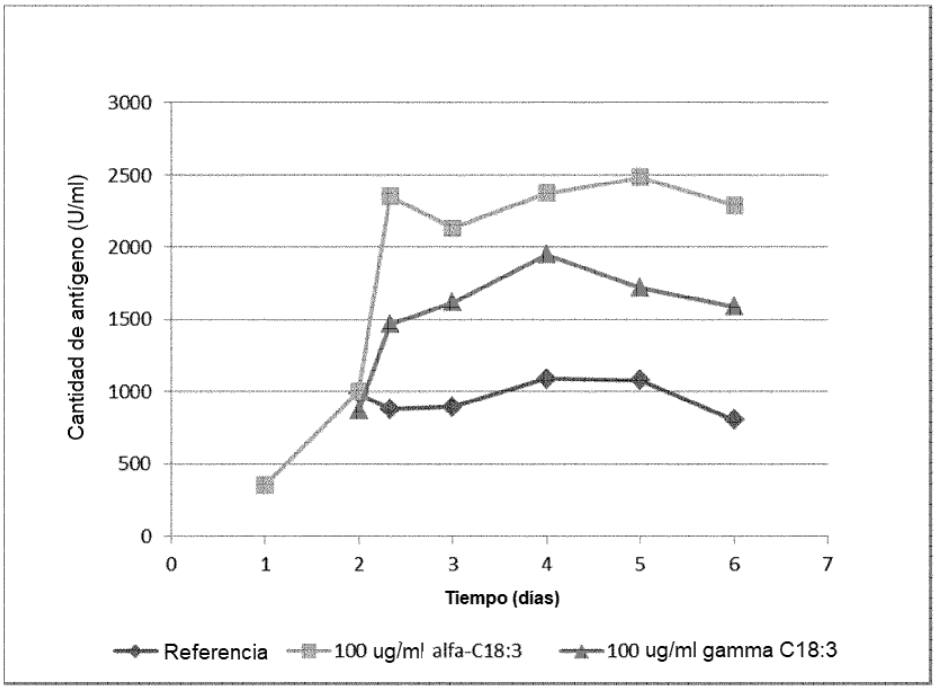

Figura 21

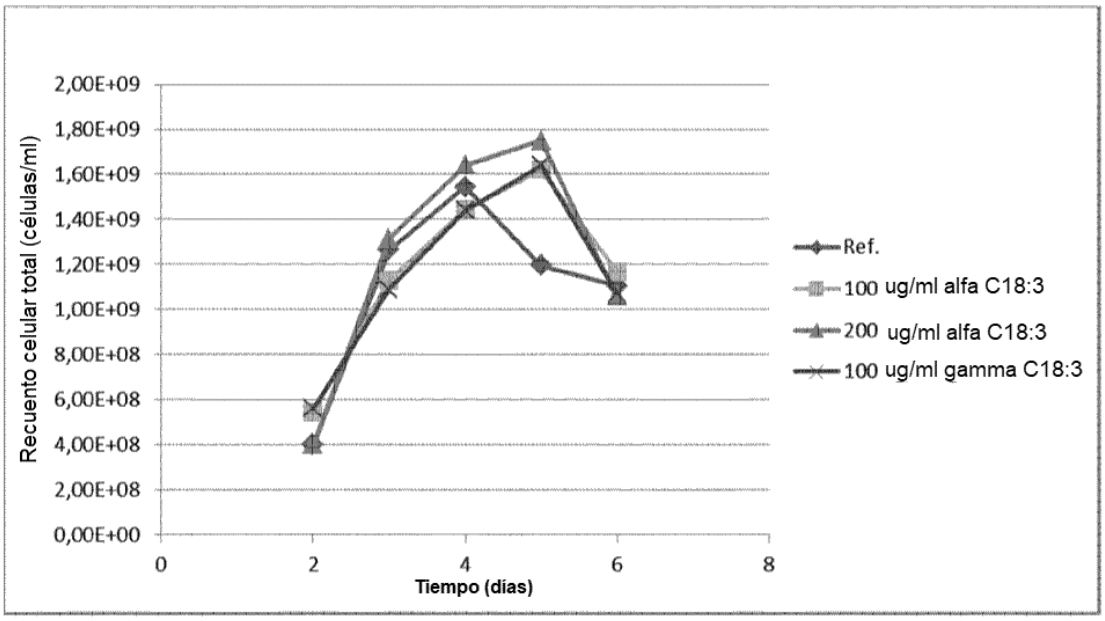

Figura 22

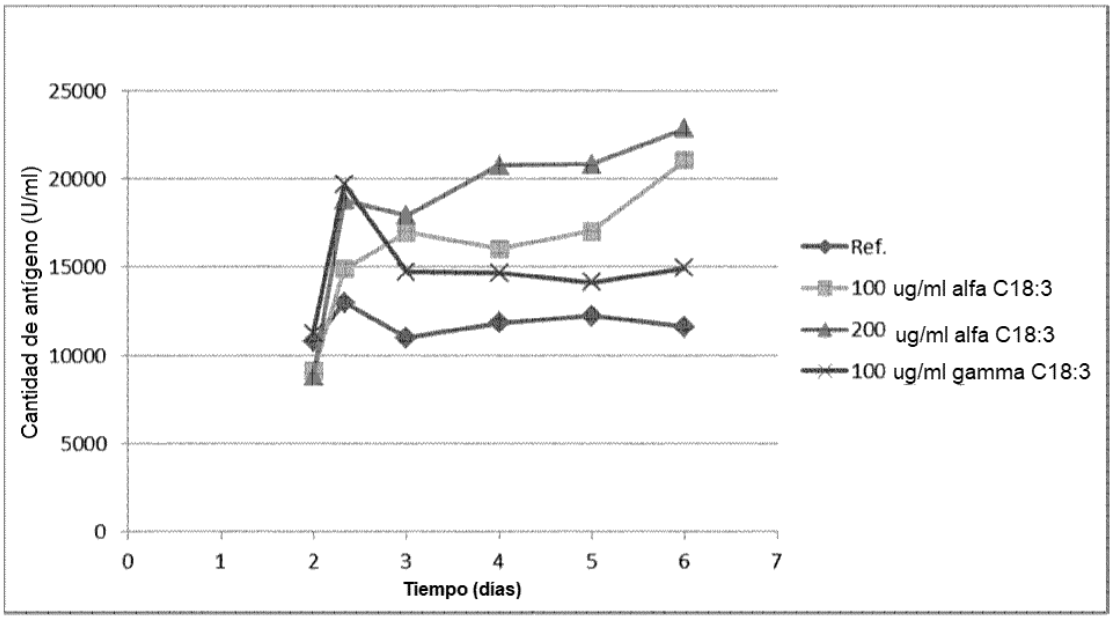

Figura 23

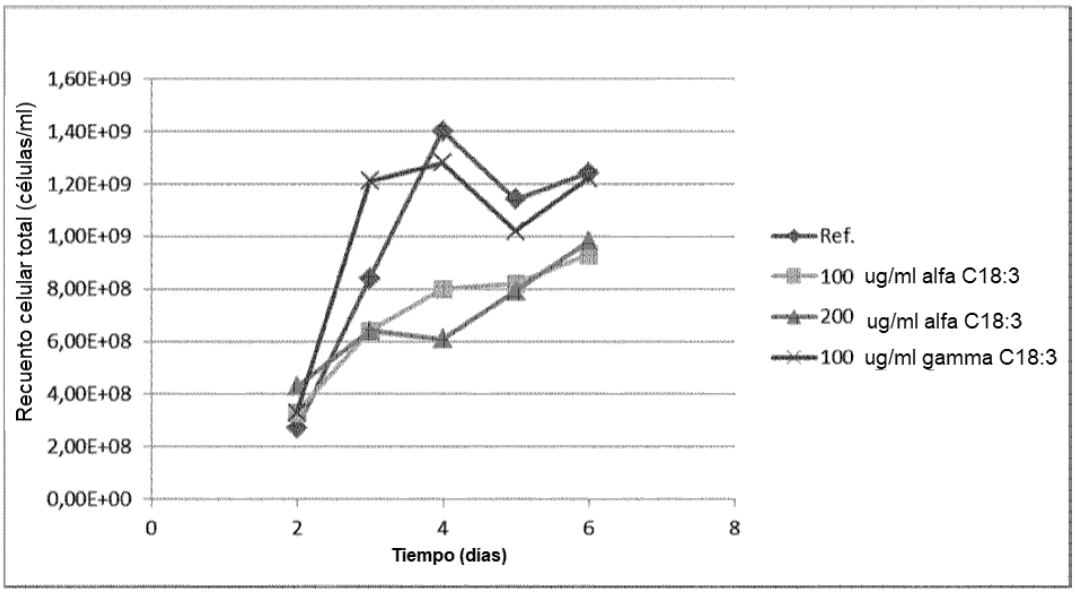

Figura 24

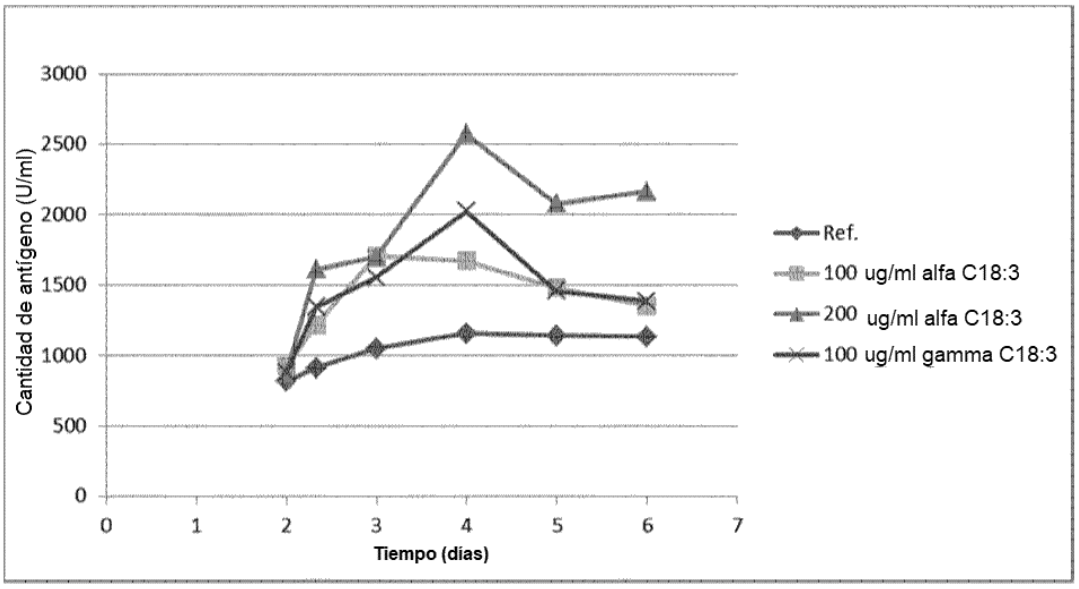

Figura 25

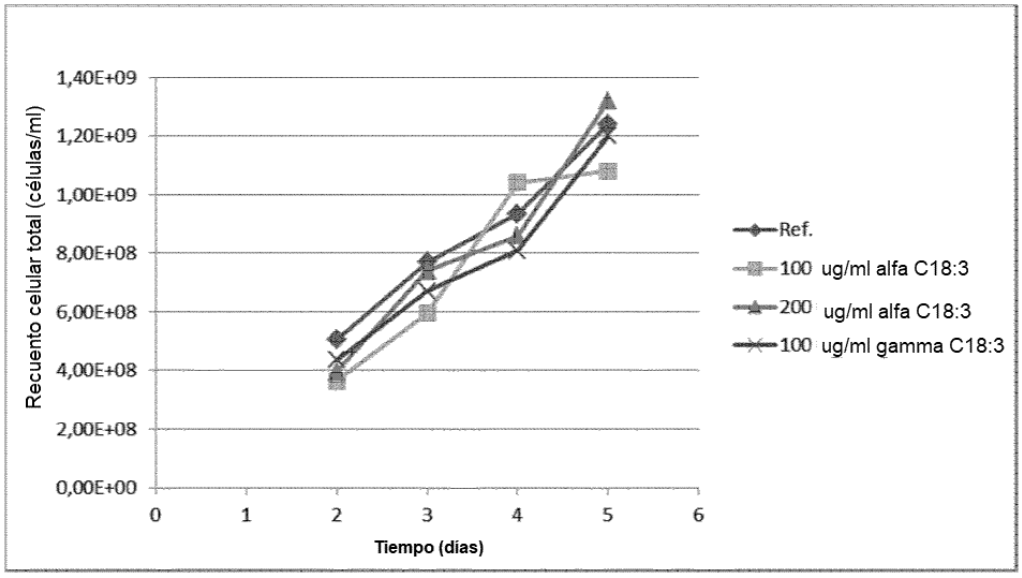

Figura 26

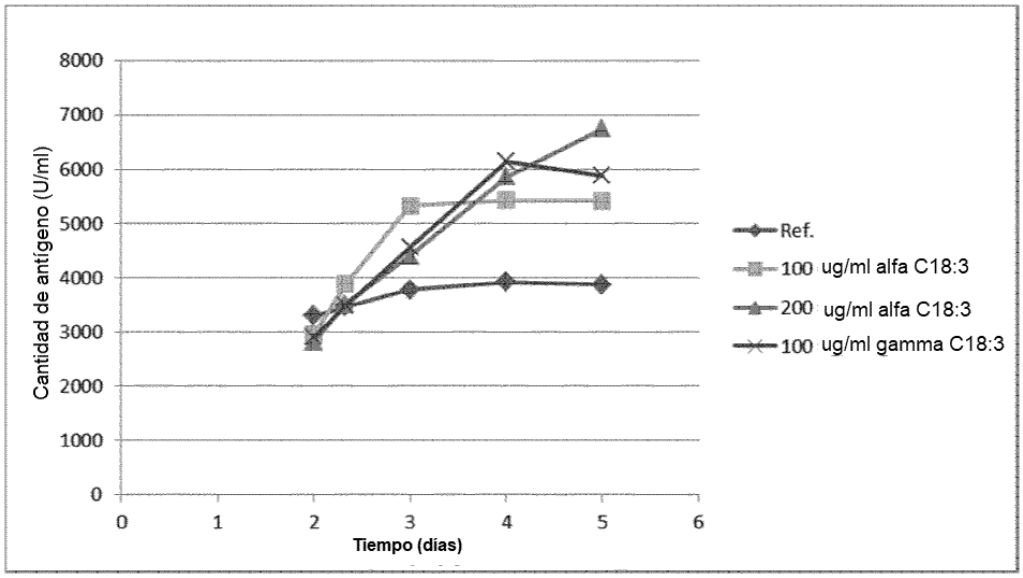

Figura 27

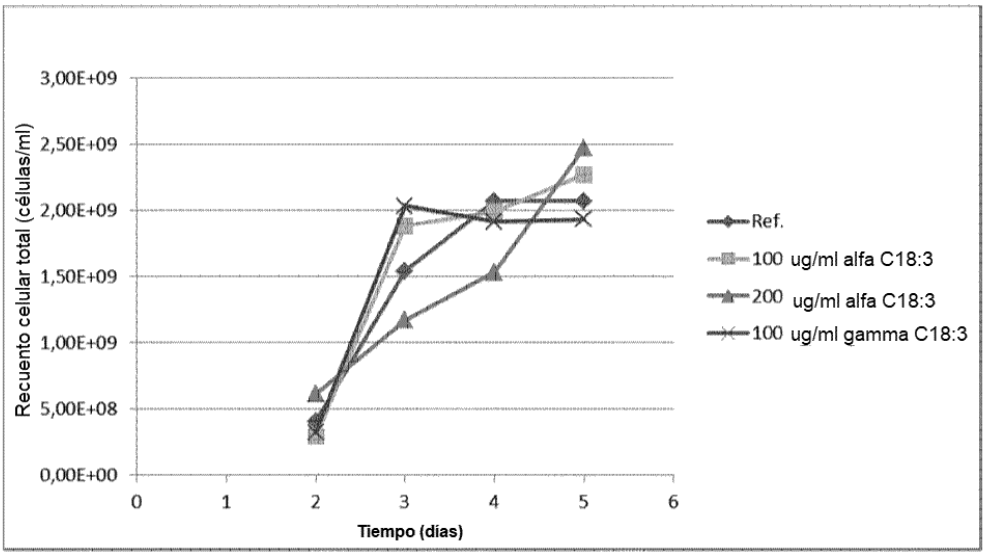

Figura 28

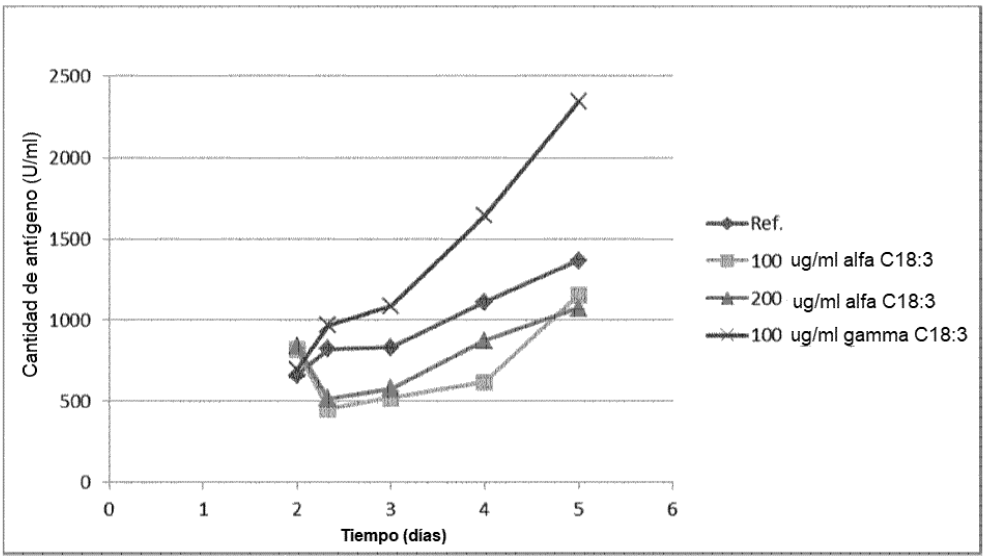

Figura 29

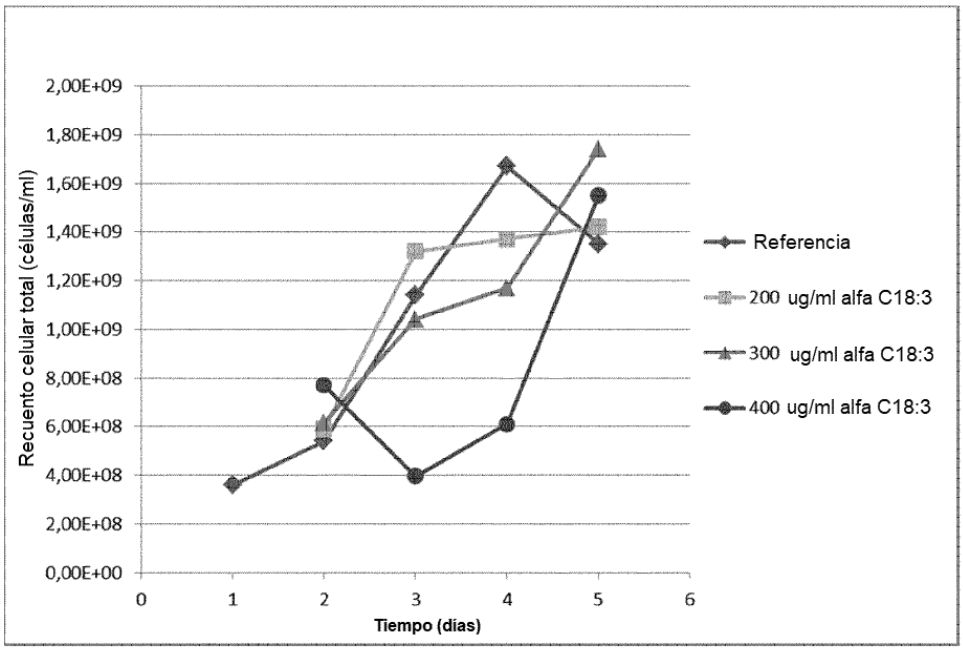

Figura 30

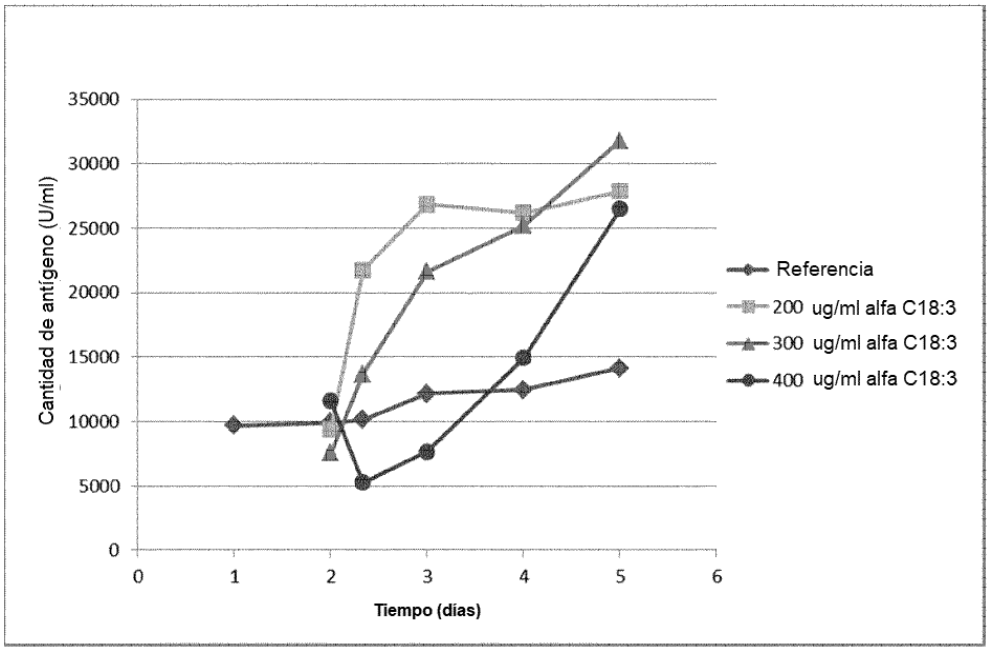

Figura 31

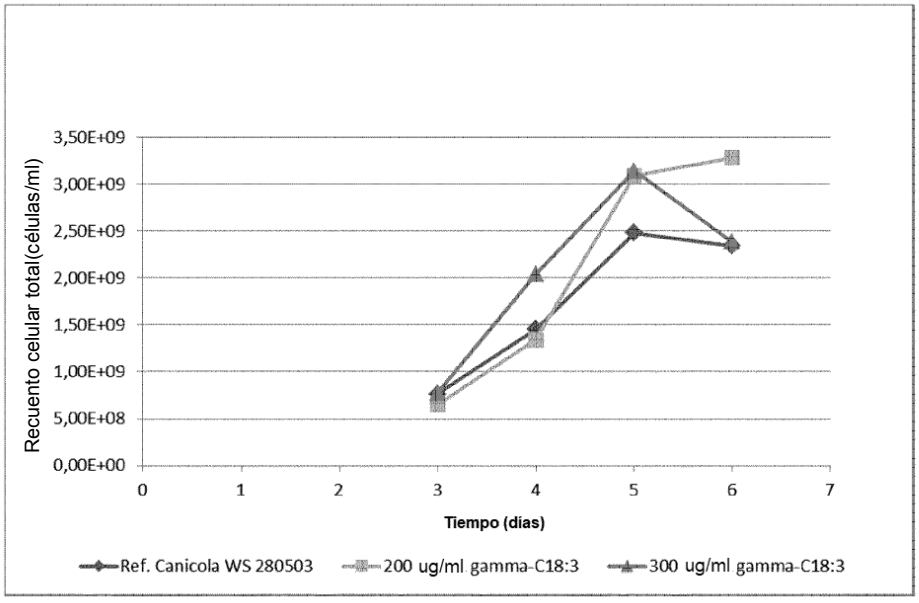

Figura 32

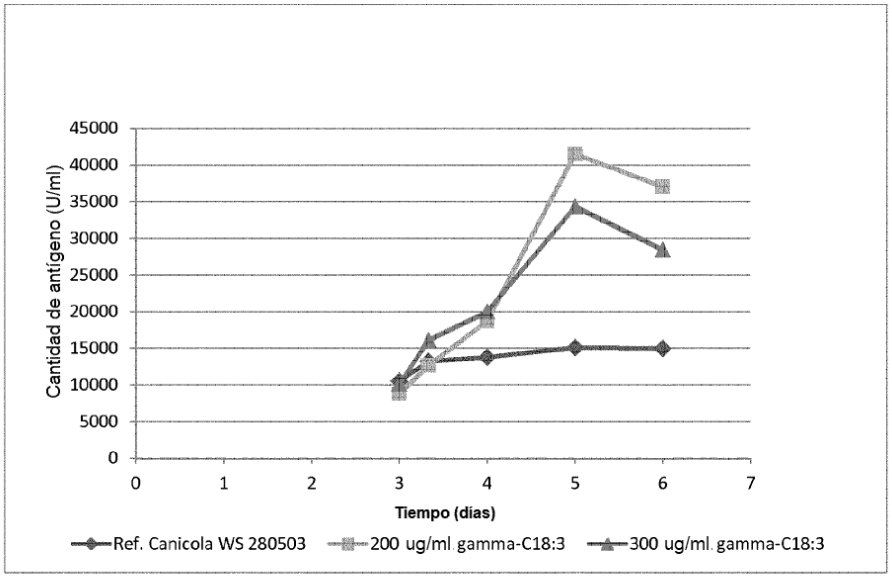

Figura 33

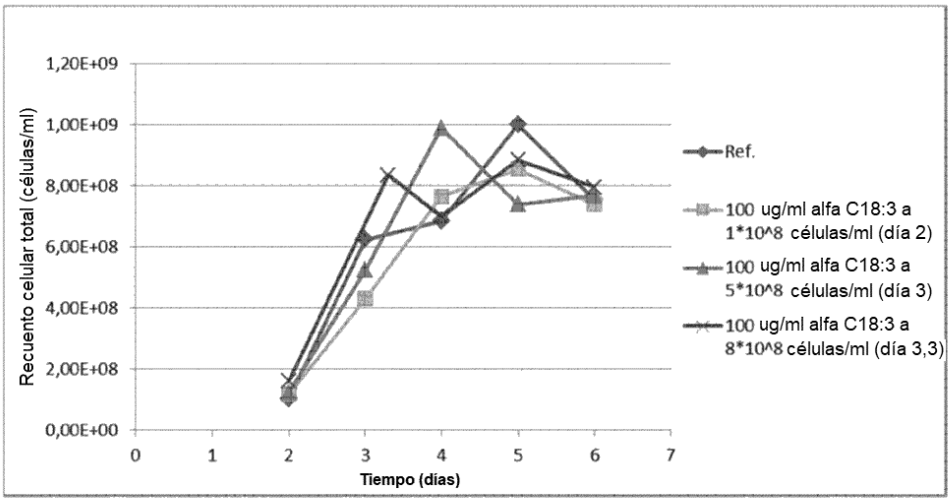

Figura 34

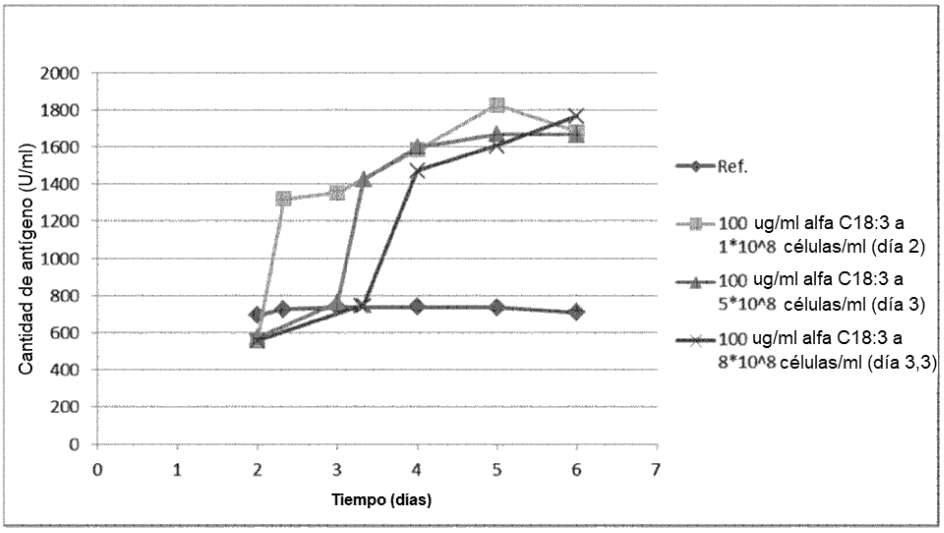

Figura 35

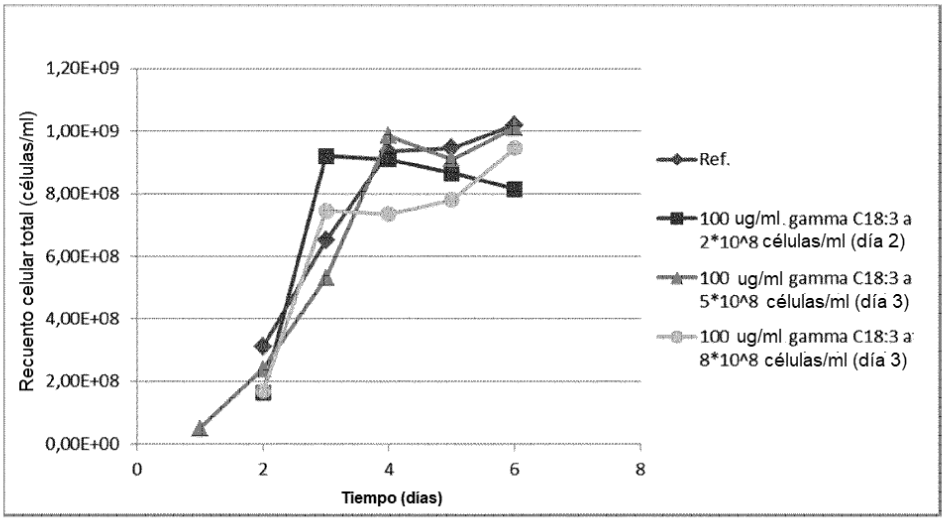

Figura 36

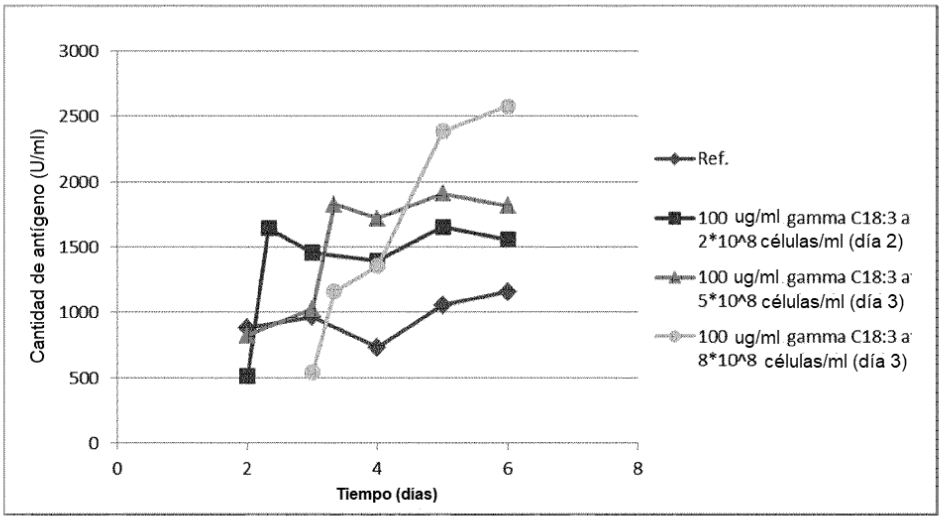

Figura 37

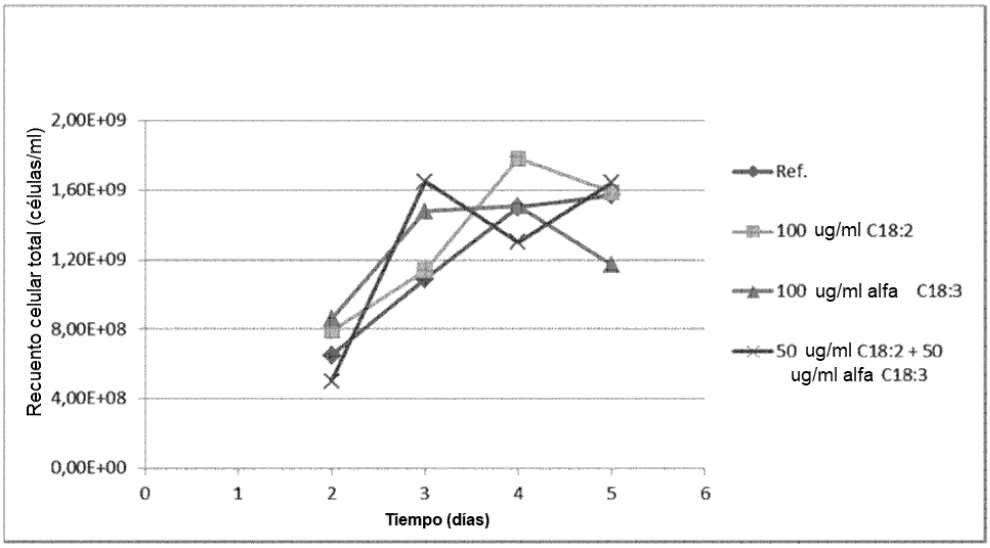
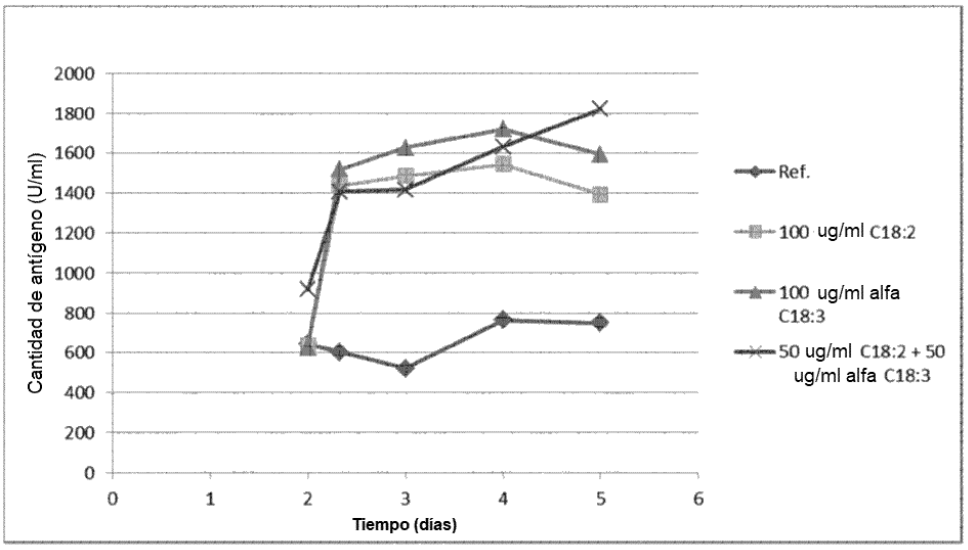
Figura 38