

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 395**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2008 PCT/IB2008/003369**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2009 WO09090461**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2008 E 08870798 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 2224951**

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

30 Prioridad:

21.12.2007 US 15718 P

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

28.05.2020

73 Titular/es:

**ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)
10 Sylvan Way
Parsippany, NJ 07054, US**

72 Inventor/es:

**GOODYEAR, MARK DAVIS;
HUETHER, MICHAEL JOHN;
KREBS, RICHARD, LEE y
OIEN, NANCEE L.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 763 395 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

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

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere generalmente al campo de las vacunas y a procedimientos para estabilizar vacunas de emulsión. En particular, la presente invención se refiere a bacterinas tratadas térmicamente, a un procedimiento para producir bacterinas tratadas térmicamente y a vacunas de emulsión porcinas preparadas a partir de tales bacterinas tratadas térmicamente.

Antecedentes de la invención

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

La Patente de Estados Unidos N° 5.084.269 se refiere a una formulación de adyuvante que contiene lecitina en combinación con aceite mineral, que produce menos irritación en el animal hospedador e induce simultáneamente una inmunidad sistémica aumentada. Las composiciones de acuerdo con la Patente de Estados Unidos 5.084.269 están en uso comercial con el nombre comercial AMPHIGEN[®], una marca comercial de Pfizer, Inc.

- 20 Generalmente, los antígenos bacterianos son inestables cuando se calientan e incluso una exposición breve a temperaturas elevadas puede disminuir la actividad de los antígenos. Por ejemplo, las vacunas de carbunco actuales pueden perder toda la actividad biológica en 48 horas a 37°C (S. Sing, N. Ahuja, VI Chauhan, E. Rajasekaran, W. S. Mohsin, R. Bhat, y R. Bhatnagar, Broche. Biophys. Res. Commun. 2002 Sep. 6; 295(5):1058-62). Zeigler JA y col. (1976), Bulletin of the Pan American Health Organization 10(2), 126-130 muestra el uso de bacterinas inactivadas térmicamente que comprenden *Leptospira canicola* Moulton muertas para la vacunación en la que la bacteria se ha tratado térmicamente durante 30 minutos a 56 °C.

Sumario de la invención

- 30 La presente invención se refiere a bacterinas tratadas térmicamente, a un procedimiento para producir bacterinas tratadas térmicamente y a vacunas de emulsión porcinas preparadas a partir de tales bacterinas tratadas térmicamente. El procedimiento comprende calentar la bacteria hasta una temperatura de 55 a 70 °C durante 5 a 8 horas o de 60 a 70 °C durante 9 a 10 horas para formar una bacteria tratada térmicamente.

Descripción detallada

Definiciones

- 35 Actividad antigénica aceptable – La expresión “actividad antigénica aceptable” se refiere a la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora en animales vacunados después de ser expuestos o de pasar un ensayo de potencia codificado con organismos vivos homólogos.

Bacteria – El término “bacteria” se refiere a una suspensión de bacterias muertas que se puede usar como un componente de una vacuna.

- 40 Emulsionante – El término “emulsionante” se refiere a una sustancia usada para hacer que una emulsión sea más estable.

Emulsión – El término “emulsión” se refiere a una composición de dos líquidos inmiscibles en la que gotas pequeñas de un líquido están suspendidas en una fase continua del otro líquido.

- 45 Bacteria tratada térmicamente – La expresión “bacteria tratada térmicamente” se refiere a una bacteria que se ha tratado térmicamente y que tiene una actividad de lipasa del 50 % o menor que la actividad de lipasa antes del tratamiento térmico y tiene una actividad antigénica aceptable.

Emulsión Invertida – El término “emulsión invertida” se refiere a una emulsión de agua en aceite.

Lipasa – El término “lipasa” se refiere a enzimas, esterases, lipasas y fosfolipasas, que pueden causar la degradación de un emulsionante en una vacuna de emulsión.

Emulsión normal – El término “emulsión normal” se refiere a una emulsión de aceite en agua.

- 50 Emulsión de aceite en agua – El término “emulsión de aceite en agua” se refiere a una emulsión en la que pequeñas gotas de aceite están suspendidas en una fase acuosa continua.

Temperatura ambiente – El término “temperatura ambiente” se refiere a una temperatura de 18 a 25 °C.

Emulsión de agua en aceite – El término “emulsión de agua en aceite” significa una emulsión en la que están suspendidas gotas de agua en una fase oleosa continua.

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a bacterinas con actividad lipasa reducida, a vacunas de emulsión porcinas preparadas a partir de tales bacterinas y a un procedimiento para producir una bacterina tratada térmicamente, comprendiendo el tratamiento térmico calentar la bacterina a una temperatura de 55 a 70 °C durante 5 a 8 horas o de 60 a 70 °C durante 9 a 10 horas, y de este modo, disminuir la actividad lipasa de bacterinas. Además de componentes antigénicos, algunas bacterinas tienen actividad lipasa. Cuando las bacterinas con actividad lipasa se incorporan a una emulsión, la lipasa puede degradar los emulsionantes usados para generar la emulsión. Las vacunas de emulsión que contienen bacterinas que tienen una actividad lipasa elevada tienden a ser emulsiones inestables, y las que contienen bacterinas que tienen niveles reducidos de lipasa tienden a ser estables. Los ejemplos de bacterias que cuando se destruyen pueden producir bacterinas que tienen actividad lipasa incluyen *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y especies de *Leptospira*, tales como los patógenos conocidos *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyposa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira bratislava* y *Leptospira pomona*. Estas bacterias pueden causar enfermedades en cerdos y es deseable la vacunación contra estas enfermedades. Las bacterinas de *Leptospira* tendrán más probablemente una actividad lipasa elevada, mientras que una bacterina de *Erysipelothrix rhusiopathiae* puede tener una actividad lipasa reducida, más manejable.

La lipasa, que puede degradar los emulsionantes usados para generar la emulsión y, por tanto, causar la inestabilidad y degradación de la emulsión, puede incluir una o más enzimas de degradación de la emulsión, tales como esterases, lipasas y fosfolipasas. En conjunto, estas enzimas, esterases, lipasas y fosfolipasas, se denominan lipasa. La actividad lipasa de una bacterina se puede medir usando un sustrato sintético denominado *O-pivaloiloximetil umbeliferona* (C-POM). La velocidad de la hidrólisis causada por la lipasa es la medida de la actividad lipasa. La velocidad de reacción de la hidrólisis causada por la lipasa en esta reacción se controla por un aumento en la intensidad de fluorescencia del producto de la actividad lipasa. La velocidad de reacción depende de las condiciones de ensayo de hidrólisis exactas elegidas, de tal forma que se deben realizar comparaciones de los niveles de actividad lipasa, medidos por las velocidades de hidrólisis, usando los datos producidos por las mismas condiciones de ensayo. Se describen procedimientos de la bibliografía en varios artículos, incluyendo Kurioka S. y Matsuda M. (1976) *Ana. Biochem.* 75: 281-289, De Silva N. S. y Quinn P. A. (1987) *J. Clin. Microbiol.* 25: 729-731, y Grau, A. y Ortiz A. (1998) *Chem. Phys. Of Lipids.* 91: 109-118.

En una vacuna de emulsión, la degradación de la emulsión produce la separación de fases de los componentes. Esto es indeseable ya que cuando hay separación de fases, las dosis individuales retiradas del recipiente pueden no contener el mismo nivel de los componentes de vacuna. Además, la pérdida de emulsión puede conducir a una pérdida de la actividad adyuvante del emulsionante y llevar a una disminución del efecto antigénico de la vacuna.

Los virus vivos atenuados se incluyen con frecuencia en vacunas junto con bacterinas. Tales vacunas son útiles porque se puede usar una sola vacuna para generar inmunidad para diferentes enfermedades con una vacuna. Si la actividad lipasa está presente en la bacterina, causará la liberación del emulsionante de la emulsión. Este emulsionante libre puede alterar e inactivar los virus de la vacuna viva, llevando de este modo a una pérdida de eficacia vírica.

Una bacterina útil en vacunas se puede formar mediante el cultivo de la bacteria de interés y la posterior destrucción de las bacterias para producir una bacterina que contiene una diversidad de componentes bacterianos, incluyendo componentes de la pared celular. Las bacterias pueden destruirse mediante una diversidad de procedimientos que incluyen exposición de las mismas a un compuesto tal como mertiolato, formalina, formaldehído, dietilamina, etilamina binaria (BEI), beta propiolactona (BPL) y glutaraldehído. Se pueden usar combinaciones de estos compuestos. Además, es posible destruir las bacterias con radiación esterilizante.

En la actualidad se ha descubierto que la actividad lipasa de una bacterina que tiene tal actividad lipasa se puede reducir por tratamiento térmico. En concreto, la actividad lipasa de una bacterina se puede reducir calentado la bacterina hasta una temperatura de aproximadamente 55 a 70 °C para formar una bacterina tratada térmicamente, que tiene una actividad antigénica aceptable. El tratamiento térmico se realiza durante un periodo de tiempo suficiente, de tal forma que la actividad lipasa de la bacterina tratada térmicamente es del 50 % o menor que la observada en la bacterina antes del tratamiento térmico. Para una buena estabilidad de la vacuna de emulsión no es necesario que la actividad lipasa se reduzca a cero. Se han descubierto vacunas que tienen una buena vida útil que se pueden preparar a partir de bacterinas tratadas térmicamente que tienen un nivel de actividad lipasa que es del 50 % o menor que el nivel de actividad lipasa antes del tratamiento térmico.

Cuando se ha usado una velocidad de hidrólisis de un sustrato de ensayo como una medida de la actividad lipasa de una bacterina, entonces la velocidad de hidrólisis del sustrato de ensayo antes del tratamiento térmico se compara con la velocidad de hidrólisis después del tratamiento térmico. El tratamiento térmico se realiza para reducir la velocidad de hidrólisis hasta el 50 % o menos de la velocidad de hidrólisis que se observa para la bacterina fresca.

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

Hay ensayos codificados para actividad antigénica para la bacterina de *Leptospira pomona* (9 CFR §113.101), la bacterina de *Leptospira icterohaemorrhagiae* (9 CFR §113.102), la bacterina de *Leptospira canicola* (9 CFR §113.103), la bacterina de *Leptospira grippotyphosa* (9 CFR §113.104) y la bacterina de *Leptospira hardjo* (9 CFR §113.105) (9 CFR §113.101, §113.102, §113.103, §113.104 y §113.105). Para estas especies se puede definir una actividad antigénica aceptable como la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora en hámsteres

vacunados de tal forma que cuando se expone a los hámsteres con bacteria viva homóloga, al menos el 75 % de los hámsteres vacunados sobreviven en un modelo mientras que al menos el 80% de los hámsteres no vacunados no sobreviven. En el caso del antígeno, *Leptospira hardjo*, se puede definir una actividad antigénica aceptable como la capacidad de una vacuna de inducir un título de media geométrica de aglutinación serológica contra *Leptospira hardjo* de ≥ 40 en terneros que se han vacunado con una vacuna que comprende el antígeno bacteriano, *Leptospira hardjo*. Para otras bacterinas, la actividad antigénica aceptable se define como la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora en animales vacunados después de exponerlos o de pasar un ensayo de potencia con organismo vivo homólogo.

Tal como se desvela en el presente documento, el tratamiento térmico se puede realizar a lo largo de un intervalo de temperaturas y durante una extensión de tiempo variable. Generalmente, el calentamiento se puede realizar a una temperatura de aproximadamente 35 a aproximadamente 80 °C durante aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 24 horas. Cuando la bacterina se calienta a una temperatura mayor, tal como de aproximadamente 75 a aproximadamente 80 °C, el tiempo de calentamiento está en el extremo corto del intervalo de tiempo. Cuando el calentamiento se realiza a una temperatura inferior, el calentamiento se realiza durante un periodo de tiempo más prolongado. Una realización de la invención es el calentamiento a una temperatura de 60 a 70 °C durante 9 a 10 horas. Otra combinación de temperatura y tiempo es el calentamiento a una temperatura de aproximadamente 65 a aproximadamente 70 °C durante aproximadamente 5 a aproximadamente 8 horas. Otra combinación de temperatura y tiempo es el calentamiento a una temperatura de aproximadamente 65 a aproximadamente 70 °C durante aproximadamente una hora. Otra combinación de temperatura y tiempo es el calentamiento a una temperatura de aproximadamente 55 a aproximadamente 65 °C durante aproximadamente 5 a aproximadamente 8 horas. Una realización adicional de la presente invención es calentar la bacterina a una temperatura de 55 a 70 °C durante 5 a 8 horas.

Las bacterinas, después del tratamiento térmico, tienen una actividad lipasa menor que las bacterinas recién preparadas pero, por lo demás, se pueden formular de la misma manera que las bacterinas recién preparadas. En consecuencia, las bacterinas tratadas térmicamente se pueden incorporar en vacunas mediante procedimientos normales de producción de vacunas. Estos procedimientos se conocen bien en la técnica.

En otra realización de la presente invención, las vacunas de emulsión se pueden formar combinando la bacterina deseada tratada térmicamente de la presente invención con una fase oleosa y un emulsionante o emulsionantes. Después, la combinación se somete a agitación intensa para formar una emulsión. Los procedimientos de agitación adecuados incluyen homogeneizado y, posteriormente, microfluidificación. También se pueden incluir conservantes y excipientes en la combinación antes de la formación de la emulsión.

Las vacunas pueden incluir tanto bacterinas como antígenos víricos. Al preparar una vacuna que incluye bacterinas y antígenos víricos, las bacterinas, cualquier antígeno vírico que se vaya a incluir, el emulsionante o emulsionantes y, opcionalmente, conservantes y excipientes se combinan con una fase oleosa y se emulsionan. Después de la formación de la emulsión, el pH de las formulaciones se puede ajustar a un pH apropiado usando soluciones de NaOH o HCl. Para el uso en vacunas, generalmente es deseable que el pH sea próximo al neutro para evitar la irritación en el sitio de inyección. Es común un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,3.

Las fases oleosas adecuadas para la formación de una vacuna de emulsión incluyen aceites no metabolizables y aceites metabolizables. Los aceites no metabolizables incluyen aceites minerales, tales como aceite mineral blanco y aceite mineral ligero. Los aceites metabolizables incluyen aceites vegetales, aceites de pescado y glicéridos de ácidos grasos sintéticos.

Los ejemplos de emulsionantes que se pueden usar para preparar vacunas de emulsión de la presente invención son fosfolípidos, ésteres de sorbitán, ésteres de sorbitán polietoxilados y derivados de manitol que son emulsionantes de vacunas comunes. Los emulsionantes fosfolipídicos incluyen lecitina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y lecitina (por ejemplo, tal como AMPHIGEN®). Los emulsionantes de éster de sorbitán incluyen monolaurato de sorbitán (por ejemplo, Span® 20 y Arlacel® 20), monooleato de sorbitán (por ejemplo, Span® 80 y Arlacel® 80), monopalmitato de sorbitán (por ejemplo, Span® 40 y Arlacel® 40) y monoestearato de sorbitán (por ejemplo, Span® 60 y Arlacel® 60). Los ésteres de sorbitán polietoxilados incluyen monolaurato de polietoxisorbitán (por ejemplo, Tween® 20 y Tween® 21), monooleato de polietoxisorbitán (por ejemplo, Tween® 80), monopalmitato de polietoxisorbitán (por ejemplo, Tween® 40) y monoestearato de polietoxisorbitán (por ejemplo Tween® 60). Los emulsionantes derivados de manitol incluyen éteres octadecanoicos de manitol. Span®, Arlacel® y Tween® son marcas comerciales de ICI Americas. AMPHIGEN® es una marca comercial de Pfizer, Inc. Generalmente, las vacunas se formulan como emulsiones normales de aceite en agua, aunque es posible preparar emulsiones invertidas de agua en aceite.

Se pueden usar una diversidad de adyuvantes, tales como Quil A, colesterol, fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio y conservantes tales como mertiolato en vacunas. Quil A es una mezcla purificada de saponinas de Quillaja extraídas de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* Molina. El Quil A actúa directamente sobre el sistema inmune para activar un estado generalizado de sensibilidad. Al hacerlo, induce respuestas tanto humorales como mediadas por células. La cadena lipófila permite la interacción del antígeno y del adyuvante que se van a suministrar al citosol para el procesamiento en una ruta endógena. A menudo se usa Quil A con colesterol ya que el colesterol elimina los efectos secundarios menos deseables cuando se añade en las proporciones apropiadas. El colesterol forma complejos insolubles con Quil A que forman estructuras de tipo hélice cuando el colesterol se une a Quil A, exponiendo de este modo las unidades de azúcar de la molécula que ayudan a estimular la respuesta inmune.

Es común añadir antígenos virales porcinos a vacunas que contienen bacterinas. Una ventaja de esta estrategia es que se puede usar una vacuna para generar inmunidad para varias enfermedades en vez de requerir dosificaciones de varias vacunas diferentes para conseguir el mismo resultado. Se pueden usar tanto virus inactivados como virus vivos atenuados en vacunas. Entre los virus que causan enfermedades porcinas que se pueden usar están el

adenovirus porcino, el circovirus porcino, el herpesvirus porcino, el virus de la pseudorrabia, el virus de la fiebre porcina clásica, el virus de la diarrea epidémica porcina, el virus de encefalomielitis hemaglutinante porcina, el parvovirus porcino, el coronavirus respiratorio porcino, el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino, la gripe porcina, el virus de la gastroenteritis transmisible y el virus de la estomatitis vesicular.

- 5 Si la actividad lipasa está presente en la bacterina, puede causar la liberación del emulsionante de la emulsión. Este emulsionante libre puede alterar la envoltura del virus vivo e inactivar los virus de vacunas vivas, llevando de este modo a una pérdida de infectividad vírica. En consecuencia, el tratamiento térmico de la bacterina sirve para estabilizar la emulsión y conservar su efecto adyuvante, así como para conservar la infectividad vírica de los virus.

- 10 Los siguientes ejemplos se proporcionan con el propósito de una ilustración adicional y no tienen por objeto limitar el alcance de la invención que se reivindica.

PROCEDIMIENTOS

Procedimiento 1 Determinación de turbidez

- 15 La turbidez se determina en unidades nefelométricas (UN) mediante un procedimiento de dispersión de la luz. La intensidad de la luz dispersada por la muestra en condiciones definidas se compara con la intensidad de la luz dispersada por una suspensión de un patrón de referencia. Cuanto mayor sea la intensidad de la luz dispersada, mayor es la turbidez de la muestra. Se dirige una fuente de luz hacia la muestra y se mide la dispersión de la luz en un ángulo de 90° a la dirección de la fuente de luz. El instrumento se calibra midiendo la dispersión de la luz de una suspensión de formazina.

Calibrado del instrumento nefelómetro

- 20 Se prepara agua ultrafiltrada filtrando agua destilada a través de un filtro de membrana que tiene un tamaño de poro de 0,2 µm. Se prepara una primera solución disolviendo 1,00 g de sulfato de hidrazina, (NH₂)H₂SO₄, en agua ultrafiltrada y se diluye con agua ultrafiltrada hasta 100 ml en un matraz volumétrico. Se prepara una segunda solución disolviendo 10,00 g de hexametileno tetramina en agua ultrafiltrada y diluyendo con agua ultrafiltrada hasta 100 ml en un matraz volumétrico. Se prepara una suspensión de formazina mezclando 5,0 ml de la primera solución con 5,0 ml de la segunda solución. Se deja reposar la mezcla durante 24 horas a aproximadamente 24 °C. La mezcla se diluye hasta 100 ml con agua ultrafiltrada para formar una suspensión de turbidez madre que tiene una turbidez de 400 UN. Se prepara una suspensión de formazina de una turbidez de 40 UN diluyendo 10,00 ml de la suspensión de turbidez madre con 100 ml de agua ultrafiltrada. Se preparan soluciones de calibrado adicionales diluyendo la solución madre.

- 30 **Medición de turbidez**

La muestra a medir se diluye con agua ultrafiltrada de tal forma que la turbidez entre dentro del intervalo calibrado del nefelómetro. La turbidez se mide y se calcula la turbidez original usando la siguiente ecuación:

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

- 35 en la que: M es la turbidez de la muestra diluida en UN
D es el volumen de agua de dilución, en ml
O es el volumen de muestra original, en ml

Procedimiento 2 Análisis de lipasa

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

- 45 Se prepararon soluciones de O-pivaloximetilumbeliferona (Molecular Probes producto n.º P35901) en DMSO puro a una concentración de solución madre de 5 mM; se almacenó solución sin usar a -20 °C, protegida de la luz. La solución de O-pivaloximetilumbeliferona 5 mM se diluyó hasta 750 µM usando tampón TRIS-HCl 58 mM (pH 8,0) y la solución resultante se precalentó hasta 37 °C. La muestra de bacterina o el tampón/medio de control se centrifugó durante 10 minutos a temperatura ambiente a 6500 X de gravedad para formar un sedimento y un sobrenadante. Se realizaron las reacciones combinando 15 µl de tampón TRIS-HCl 100 mM (pH 8,0) con 15 µl del sobrenadante a temperatura ambiente a partir de la muestra de bacterina o del tampón/medio de control, en pocillos de ensayo de placas de 96 pocillos de volumen reducido (Corning 3393, superficie de no unión de poliestireno negra, semiárea); preincubando durante 10 minutos a 37 °C; iniciando después la reacción mediante la adición de 20 µl de O-pivaloximetilumbeliferona 750 µM o el tampón/medio de control. Las mezclas de reacción resultantes contenían tampón TRIS-HCl 53 mM (pH 8,0) y O-pivaloximetilumbeliferona 0 ó 300 µM. Se midió la intensidad de fluorescencia a intervalos de 30-45 segundos a lo largo de un periodo de una hora (Spectramax Gemini XS, 37°C, λ_{ex} = 360 nm λ_{em} = 460 nm, "medio" de ajuste de sensibilidad PMT, 6 lecturas por pocillo). La velocidad de reacción se determinó a partir de la pendiente de la curva de progresión resultante.

Procedimiento 3 Medición de la turbidez de una preparación de *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Se mide espectrofotométricamente la turbidez de una preparación de *Erysipelothrix rhusiopathiae* a una longitud de onda de 600 nm. El resultado se describe en unidades ópticas (UO).

Ejemplos

Ejemplo 1 Disminución de la actividad de lipasa por tratamiento térmico

Se preparó una combinación de leptospiros destruidas con mertiolato que contenía las siguientes especies: *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo* y *Leptospira pomona* a partir de bacterinas individuales. Se almacenaron seis muestras de las bacterinas combinadas durante una noche (aproximadamente 12 horas) a 4 °C, 37 °C, 45 °C, 56 °C, 65 °C y 80 °C. La muestra almacenada a 4 °C sirvió como el control sin tratar. Las muestras almacenadas durante 12 horas a 37 °C, 45 °C, 56 °C, 65 °C y 80 °C eran muestras tratadas térmicamente. Después del almacenamiento, la velocidad a la que se hidrolizaba un sustrato de ensayo en presencia de cada bacterina se midió de acuerdo con el procedimiento del Procedimiento 2. La velocidad de hidrólisis para una muestra dividida por la velocidad de hidrólisis de la muestra almacenada a 4 °C multiplicada por 100 es el porcentaje de la actividad lipasa original de cada bacterina que se conserva después del almacenamiento. La siguiente tabla muestra la temperatura de almacenamiento y el porcentaje de la actividad lipasa original que se conserva después del almacenamiento.

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

Se prepararon dos series de *Leptospira bratislava*. Las series se inactivaron con mertiolato y después se sometieron a tratamiento térmico a 65 °C durante 8 horas. Las muestras se sacudieron antes del tratamiento y cada dos horas durante el tratamiento. Se determinó la actividad lipasa en cada momento de acuerdo con el procedimiento del Procedimiento 2. Cuando se tomaba una muestra, se medía la velocidad a la que se hidrolizaba un sustrato de ensayo en presencia de cada muestra. La velocidad de hidrólisis para una muestra dividida entre la velocidad de la velocidad de hidrólisis inicial multiplicada por 100 es el porcentaje de la actividad lipasa original de cada bacterina que se conserva después del tratamiento térmico. La siguiente tabla muestra el tiempo de muestra y el porcentaje promedio de la actividad lipasa original que se conserva a ese tiempo.

Tiempo de muestra (horas)	Inicial	2	4	6	8
Porcentaje de actividad lipasa original	100%	41%	34%	28%	24%

Ejemplo 2 Preparación de formulaciones de vacuna experimental

Se cultivaron cultivos de *Leptospira canicola*, *Leptospira icterogorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira pomona*, *Leptospira bratislava*, *Erysipelothrix rhusiopathieae* y parvovirus porcino. Se midió la turbidez de cada cultivo de *Leptospira* en unidades nefelométricas (UN). Se midió la turbidez del cultivo de *Erysipelothrix rhusiopathieae* en unidades ópticas (UO). Las bacterias se destruyeron con mertiolato para formar bacterinas. Cada bacterina de *Leptospira* se trató térmicamente a 65 °C durante 8 horas para reducir la actividad de lipasa. La bacterina de *Erysipelothrix rhusiopathieae* no se trató térmicamente. Las bacterinas de *Leptospira* se combinaron con parvovirus porcino inactivado y *Erysipelothrix rhusiopathieae* muerta y después se mezclaron con AMPHIGEN®, adyuvantes, conservantes y tampón de dilución de tal forma que cada 2 ml de dosis de la vacuna contenían los componentes indicados en la siguiente tabla.

Concentraciones de antígenos

Componente	Concentración de componente/dosis
<i>L. canicola</i>	1200 UN/dosis de 2 ml
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	1200 UN/dosis de 2 ml
<i>L. grippotyphosa</i>	1200 UN/dosis de 2 ml
<i>L. hardjo</i>	2400 UN/dosis de 2 ml
<i>L. Pomona</i>	1200 UN/dosis de 2 ml
<i>L. bratislava</i>	1200 UN/dosis de 2 ml
<i>Erysipelothrix rhusiopathieae</i>	14 UO/dosis de 2 ml
Parvovirus porcino	17.920 HA/0,05 ml

Ejemplo 3 Ensayo de potencia en hámsteres y cerdos

La vacuna del Ejemplo 2 se administró a hámsteres y conejos para ensayar para potencia usando modelos animales de laboratorio convencionales. Los hámsteres de ensayo se expusieron después a una dosis de *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira bratislava* o *Leptospira pomona* para ensayar

la potencia de las vacunas. Se midió el número de supervivientes como una demostración de eficacia. Se midieron los títulos de aglutinación microscópica de conejo frente a *Leptospira hardjo* para demostrar la potencia de esa fracción de la vacuna. La siguiente tabla muestra que las vacunas preparadas a partir de bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente son capaces de producir una respuesta antigénica que pasa los criterios de eficacia.

Acondicionamiento térmico de <i>Leptospira</i>	HAMSTERES SUPERVIVIENTES					SEROLOGIA de conejo
	canicola	bratislava	ictero	grippe	pomona	hardjo
65 °C (8 horas)	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	Pasa
Sin tratar	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	Pasa

5

Se ensayó *Erysipelothrix rhusiopathiae* en conejos comparando el título serológico de la vacuna con el título de una vacuna de referencia. La vacuna tenía una RP (potencia relativa) de 3,0. Se ensayó PPV en el ensayo de hemaglutinación y tenía un título de HA de 1024 HA/0,05 ml. Un título de 320 HA/0,05 ml es un valor aceptable para una vacuna.

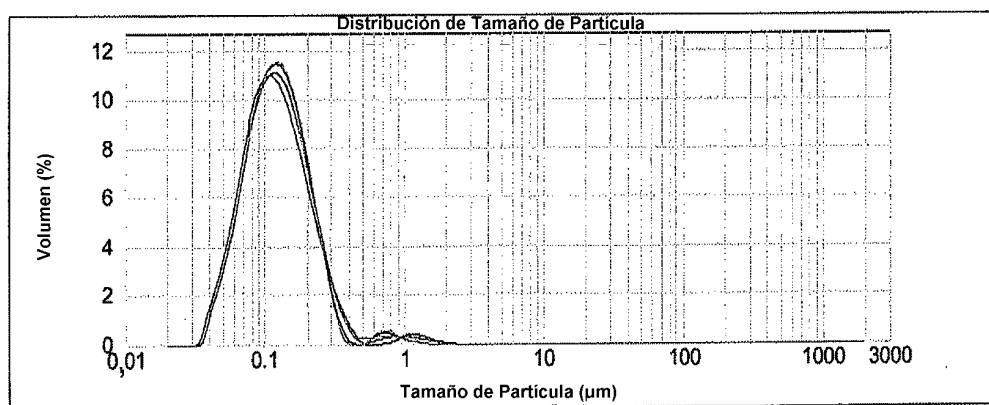
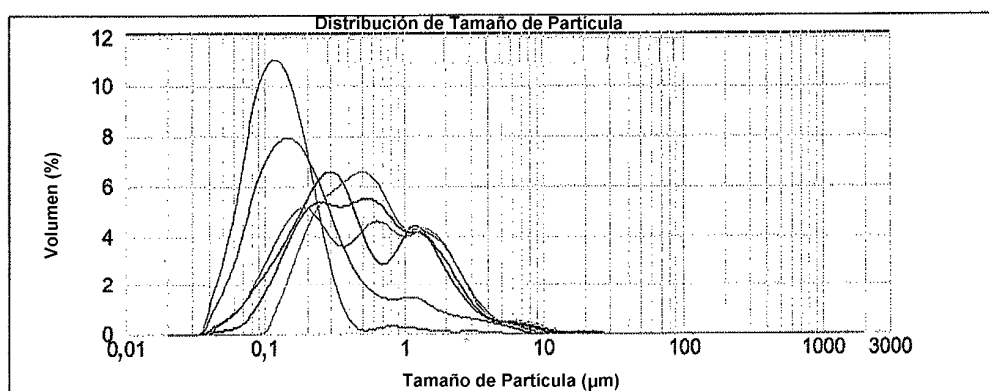
10 **Ejemplo 4 Ensayo fisicoquímico de vacunas**

Se preparó una vacuna con bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente y otros componentes de acuerdo con la formulación enumerada en el Ejemplo 2. Se preparó una vacuna similar a partir de bacterinas de *Leptospira* sin tratar térmicamente de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2. Ambas formulaciones de vacuna se almacenaron a 4 °C durante 0, 6, 12, 15 y 18 meses de permanencia. Se realizó el análisis de tamaño de partícula para cada vacuna en cada momento usando un difractor láser.

15

Los gráficos mostrados a continuación muestran las distribuciones de tamaño de partícula para cada vacuna a lo largo de varios meses de control (0, 6, 12, 15 y 18 meses).

Análisis del tamaño de partícula de vacunas recién preparadas que contienen bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente a día 0



20

La vacuna preparada a partir de bacterinas de *Leptospira* sin tratar térmicamente (gráfico superior) muestra un aumento en el tamaño de partícula que indica degradación de la emulsión. La vacuna preparada a partir de bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente (gráfico inferior) muestra la conservación del tamaño de partícula a lo largo de 18 meses de almacenaje, que indica la estabilidad de la emulsión.

Ejemplo 5 Ensayo de hemaglutinación (HA) de PPV

5 Las formulaciones de vacuna enumeradas en el Ejemplo 2 (las vacunas en la lista en el Ejemplo 2 contenían todas los antígenos enumerados —mismas vacunas para todo el trabajo) preparadas a partir de bacterinas de *Leptospira* sin tratar térmicamente y bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente se ensayaron inicialmente para el título de HA y el título de hemólisis. La estabilidad de los títulos de HA en diversos momentos. El ensayo de HA se realizó ajustando una muestra a un pH de 11-11,2 para extraer el virus PPV (parvovirus porcino) del gel de hidróxido de aluminio. Después se centrifugó la muestra y se recogió el sobrenadante para usar en el ensayo. Se añadieron glóbulos rojos de cobaya a una placa de 96 pocillos que sirve como el indicador de aglutinación. El sobrenadante de la muestra se diluyó 2 veces a lo largo de filas por duplicado con una dilución de partida de 1:5. La placa se incubó a 10 5 ± 3 °C durante 16-24 horas. El grado de hemaglutinación se puntúa de 0-4 para cada pocillo. El título se registra como la última dilución que contiene una puntuación de 2 o superior. Durante el ensayo de vacunas que no estaban tratadas térmicamente, se observó que la vacuna estaba causando hemólisis. El título de la hemólisis era la mayor dilución a la que se observó hemólisis. Las vacunas tratadas térmicamente no produjeron hemólisis.

15 La siguiente tabla muestra los títulos de HA y los títulos de hemólisis promedio a lo largo del tiempo. La CTC es una vacuna con bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente. La OOP es una vacuna sin bacterinas de *Leptospira* tratadas térmicamente.

Tabla 1: Títulos de HA de PPV a lo largo del tiempo

Seguimiento de HA de PPV de OOP y CTC a lo largo del tiempo										
		INICIAL		1 mes	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	7 meses	10 meses
	1	2	3							
OOP	160	1280	1280	1280	1280	1280	640	1280	1280	1280
CTC	1280	1280	1280	1280	1280	640	640	640	640	1280
Título de hemólisis										
OOP	80	80	80	160	160	160	160	160	80	80
CTC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende una emulsión, una bacterina tratada térmicamente que comprende una suspensión de bacterias muertas, en la que las bacterias muertas son *Leptospira Bratislava* y una o más especies de *Leptospira* seleccionadas del grupo que consiste en *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo* y *Leptospira Pomona*; y de uno a trece virus causantes de enfermedad porcina seleccionados del grupo constituido por adenovirus porcino, circovirus porcino, herpesvirus porcino, virus de la pseudorrabia, virus de la fiebre porcina clásica, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de encefalomiелitis hemaglutinante porcina, parvovirus porcino, coronavirus respiratorio porcino, virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino, gripe porcina, virus de la gastroenteritis transmisible y virus de la estomatitis vesicular, y en la que la bacterina tratada térmicamente se ha tratado térmicamente durante 5 a 8 horas a 55 a 70 °C o durante 9 a 10 horas a 60 a 70 °C.
2. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una preparación de lecitina y un adyuvante a base de alumbre.
3. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las especies de *Leptospira* son *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira Pomona* y *Leptospira Bratislava*.
4. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 que adicionalmente comprende una suspensión de *Erysipelothrix rhusiopathiae* muertas que no se ha tratado térmicamente.
5. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 2 que comprende además una lecitina en preparación de aceite.
6. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la bacterina tratada térmicamente se ha tratado térmicamente durante 5 a 8 horas a 55 a 70 °C.
7. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la bacterina tratada térmicamente se ha tratado térmicamente durante 5 a 8 horas a 65 a 70 °C.
8. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 o 7, en la que la bacterina tratada térmicamente se ha tratado térmicamente durante 8 horas a 65 °C.
9. Un procedimiento de producción de una vacuna tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende:
- (a) tratar térmicamente la bacterina que comprende una suspensión de bacterias muertas para reducir la actividad lipasa, en la que el tratamiento térmico comprende calentar la bacterina a una temperatura de 55 a 70 °C durante 5 a 8 horas o 60 a 70 °C durante 9 a 10 horas; y
- (b) incorporar las bacterias tratadas térmicamente en la vacuna; y
- (c) opcionalmente, incorporar en dicha vacuna *Erysipelothrix rhusiopathiae* muertas que no se han tratado térmicamente.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el tratamiento térmico comprende calentar la bacterina hasta una temperatura de 65 a 70 °C durante 5 a 8 horas.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 en el que el tratamiento térmico comprende calentar la bacterina a una temperatura de 65 °C durante 8 horas.