

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 451**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2013** **PCT/EP2013/067132**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014** **WO14027083**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2013** **E 13750074 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020** **EP 2884996**

54 Título: **Una composición inmunógena de bacteria Leptospira muerta**

30 Prioridad:

17.08.2012 EP 12180792

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

07.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KLAASEN, HENRICUS LEO BERNARDUS MARIA;
LOEFFEN, PETER y
RIJKE, ERIC ONNO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 772 451 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

Una composición inmunógena de bacteria *Leptospira* muerta

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición que contiene una preparación celular inmunógena de bacteria *Leptospira* muerta y una vacuna para proteger a un animal contra una infección con bacteria *Leptospira*.

10 Antecedentes de la técnica

La leptospirosis es una zoonosis mundial provocada por la infección con cualquiera de los muchos serotipos patógenos de *Leptospira*. El género de los organismos es tremendamente variable y contiene más de 250 serovares. La prevalencia de serovares patógenos individuales varía en diferentes lugares, probablemente influenciada por factores tales como el clima, la fauna autóctona y las prácticas agrícolas. La leptospirosis afecta prácticamente a todas las especies de mamíferos. La leptospirosis humana también es importante y se produce endémicamente en los trópicos y como epidemias en climas templados. Sin embargo, a diferencia de otras especies, los seres humanos no son importantes en el mantenimiento de la enfermedad en la naturaleza y la transmisión de ser humano a ser humano es rara.

La vacunación humana contra la leptospirosis es un objetivo de la comunidad investigadora, pero el progreso ha sido extremadamente lento. Dado que la leptospirosis canina es una enfermedad importante y que los perros son una fuente de leptospirosis, existen muchas vacunas disponibles contra la enfermedad canina. Las vacunas comerciales contra la leptospirosis canina normalmente contienen antígenos inactivados de los serogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae (Ictero) y han estado disponibles durante más de cincuenta años. Las recomendaciones recientes para Europa son continuar con la inclusión en la vacuna de antígeno de los serogrupos Canicola e Ictero, más la inclusión de antígeno de los serogrupos Grippotyphosa (Grippe) y Australis. Mientras que en los EE.UU. actualmente existen cuatro vacunas caninas con antígenos de cuatro serogrupos (Canicola, Ictero, Grippe y Pomona), en Europa actualmente hay disponibles varias vacunas bivalentes habituales (Canicola, Ictero) y solo una vacuna trivalente (Canicola, Ictero y Grippe).

La mayoría de las vacunas contra la leptospirosis disponibles en el mercado, si no todas, comprenden una preparación celular inmunógena de bacteria *Leptospira* muerta, tal como, por ejemplo, células enteras inactivadas con formol. Se sabe que estas vacunas son muy estables a una temperatura de almacenamiento muy por debajo de la temperatura ambiente, normalmente entre 2 °C y 8 °C. Sin embargo, especialmente dado el hecho de que la leptospirosis es endémica en los trópicos, sería una ventaja importante que la vacuna fuera estable a una temperatura superior a la temperatura ambiente, puesto que esto permitiría el almacenamiento en condiciones ambientales, sin necesidad de ningún equipo de enfriamiento. En el pasado, se ha sometido a ensayo si la desnaturalización de las proteínas que están presentes en las vacunas de células enteras muertas (por ejemplo, mediante la aplicación de un tratamiento de choque térmico que no afecte a los antígenos de *Leptospira*), puesto que dichas proteínas podrían ser responsables de la inestabilidad de los antígenos de *Leptospira*, podría conducir a una mejora significativa de la estabilidad. Sin embargo, el resultado fue negativo.

Objeto de la invención

Existe la necesidad de mejorar significativamente la estabilidad de las composiciones que comprenden una preparación celular inmunógena de bacteria *Leptospira* muerta, en particular, para llegar a una composición que todavía sea eficaz para provocar una respuesta inmunitaria, incluso después de al menos tres meses de almacenamiento a una temperatura superior a la temperatura ambiente. En particular, existe la necesidad de una vacuna contra la leptospirosis, que siga siendo eficaz, al menos para ayudar en la prevención de una infección con bacteria *Leptospira*, incluso después de tres meses de almacenamiento de la vacuna a 37 °C, en particular, después de un almacenamiento de nueve meses a esta temperatura.

Sumario de la invención

Con el fin de cumplir con el objeto de la invención, se ha ideado una composición de acuerdo con el preámbulo, en donde la preparación celular inmunógena de bacteria *Leptospira* muerta está presente en una solución de ácido cítrico (en donde el término "ácido" incluye la base conjugada del ácido). Se ha demostrado que teniendo los antígenos presentes en esta solución, la estabilidad de los antígenos mejora notablemente. Una vacuna de acuerdo con la presente invención almacenada durante al menos tres meses a 37 °C que conserva un nivel de masa antigénica suficiente para proporcionar una protección casi completa contra una infección con bacteria *Leptospira*.

Definiciones

Una vacuna en el sentido de la presente invención es una composición adecuada para la aplicación a un animal (incluyendo seres humanos), que comprende uno o más antígenos, normalmente combinados con un vehículo

farmacéuticamente aceptable tal como un líquido que contiene agua, opcionalmente que comprende agentes inmunoestimulantes (adyuvantes), sales, tampones, conservantes, modificadores de la viscosidad etc., que tras la administración al animal induce una respuesta inmunitaria para tratar una enfermedad o trastorno, es decir, ayuda a prevenir, mejorar o curar la enfermedad o trastorno.

5 Un vehículo es un medio para transportar los antígenos con el fin de poder presentarlos de forma práctica. Los vehículos normales son agua u otros líquidos hidrófilos, pero también se usan habitualmente partículas sólidas (por ejemplo, para antígenos administrados a través de un nebulizador de polvo seco).

10 Una preparación celular de bacterias muertas es una preparación que contiene, en esencia, células bacterianas muertas, opcionalmente tratada adicionalmente (lo que puede incluir lisis al menos parcialmente las células), por ejemplo, para llegar a una preparación más estable o más inmunógena. Una preparación celular se opone a una preparación que comprende un extracto de células bacterianas tal como proteínas de superficie extraídas y/o polisacáridos.

15 Realizaciones de la invención

En una realización, la solución comprende 20 mmoles de ácido cítrico por litro.

20 En otra realización, la solución se tampona a un pH entre 5 y 6.

En otra realización, las bacterias *Leptospira* se eligen entre *Leptospira interrogans* serogrupo Canicola serovar Portland-Vere, *Leptospira interrogans* serogrupo Australis serovar Bratislava, *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni y *Leptospira kirschnerchpirachi* serogrupo Grippotyphosa serovar Dadas, en particular, las bacterias *Leptospira* son *Leptospira interrogans* serogrupo Australis serovar Bratislava.

Se describe el uso de ácido cítrico para estabilizar una preparación inmunógena de bacteria *Leptospira* muerta en un vehículo líquido, disolviendo el ácido cítrico en el vehículo, en donde la preparación conserva al menos el 25 % de su masa antigénica (medida en unidades de ELISA, en comparación con la misma preparación almacenada a una temperatura de 2-8 °C) durante un almacenamiento de 3 meses a una temperatura superior a 18 °C, en particular a 37 °C.

Ejemplos

35 La invención se explicará ahora adicionalmente basándose en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Determinación de la eficacia de antígenos de *Leptospira* muerta como están presentes en una vacuna disponible en el mercado en perros

Ejemplo 2: Determinación de la estabilidad de antígenos de *Leptospira* cuando se almacenan a 37 °C.

40 Ejemplo 3: Determinación de la estabilidad de antígenos de *Leptospira* formulados en ácido cítrico cuando se almacenan a 37 °C.

Ejemplo 1

45 En este primer ejemplo, se determinó la eficacia de antígenos de *Leptospira* muerta como están presentes en una vacuna disponible en el mercado en perros convencionales, formulándose los antígenos de acuerdo con la etiqueta de la vacuna (100 %) o diluyéndose cuatro veces (25 %). Se formularon concentraciones definidas de bacterias *Leptospira* químicamente inactivadas del mismo tipo y serovares presentes en la vacuna Nobivac L4 disponible en el mercado (disponible de MSD Animal Health, Boxmeer, Países Bajos; véase también la Publicación del 21 de mayo de 2012 del Sumario de opinión del CVMP de la Agencia Europea del Medicamento con respecto a Nobivac L4), a saber, *Leptospira interrogans* serogrupo Canicola serovar Portland-Vere (*Leptospira canicola*; 5300 unidades de ELISA/ml), *Leptospira interrogans* serogrupo Australis serovar Bratislava (*Leptospira Bratislava*; 1000 unidades de ELISA/ml), *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni (*Leptospira icterohaemorrhagiae*; 540 Unidades de ELISA/ml) y *Leptospira kirschneri* serogrupo Grippotyphosa serovar Dadas (*Leptospira grippotyphosa*; 1000 unidades de ELISA/ml) en tampón PBS 10 mM a pH 7,2 (el tampón contenido por litro de agua 8,9 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ y 0,2 g de KH₂PO₄). La formulación final se cargó en viales de 3 ml, se tapó con tapones de goma y se selló con tapas corrugadas de aluminio. Esta vacuna se almacenó a 2-8 °C (estable durante hasta 39 meses). Junto a esta vacuna, se preparó una vacuna diluida diluyendo el antígeno en el mismo tampón PBS para alcanzar una concentración final que contenía un 25 % de la cantidad de Unidades de Elisa por ml. Las vacunas se sometieron a ensayo de la siguiente manera.

Cría de los animales de ensayo

65 Un proveedor comercial proporcionó perros beagle convencionales de seis semanas de edad sin anticuerpos de suero aglutinante detectables contra cada uno de los serogrupos de *Leptospira* mencionados anteriormente. En cada uno de los estudios, los grupos de tratamiento (n = 8) consistieron en cachorros de ambos sexos y cachorros

derivados de diferentes camadas con el fin de evitar que los efectos del género y de la camada interfirieran con los efectos del tratamiento. Los perros seleccionados estaban libres de anomalías clínicas o enfermedades antes de su inclusión en estos estudios. La cría fue la misma en cada estudio.

5 Vacunación

En todos los estudios, los perros fueron vacunados dos veces por vía subcutánea, a la edad de 6 y 10 semanas con 1 ml de la vacuna respectiva.

10 Prueba de provocación

Las cepas de prueba de provocación utilizadas fueron *Leptospira interrogans* serogrupo Canicola serovar Canicola cepa Moulton, *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni cepa CF1 (ambas cepas recibidas del Centro Nacional de Referencia de Leptospirosis, KIT Biomedical Research, Ámsterdam, Países Bajos),
 15 *Leptospira kir- schneri* serogrupo Grippotyphosa serovar Bananal/liangguang cepa 11808 y *Leptospira interrogans* serogrupo Australis serovar Bratislava cepa As-05-101 (ambas recibidas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Centro Nacional de Enfermedades Animales). Para cada una de las cuatro cepas se siguió el siguiente procedimiento. El material de prueba de provocación real se preparó a partir de un cultivo almacenado en nitrógeno líquido y se hizo pasar dos veces en medio Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson y Harris
 20 (Faine 1994; *Clinical leptospirosis in humans, and clinical leptospirosis in animals*; en *Leptospira and Leptospirosis*, CRC Press, 1994; págs. 1-13, 199-225). Los cultivos almacenados en nitrógeno líquido eran re-aislados de animales infectados experimentalmente: las cepas CF1 y 11808 eran re-aislados de riñón de hámster, la cepa Moulton era un re-aislado de riñón de perro y la cepa As-05-101 era un re-aislado de orina de perro. En todos los estudios, la prueba de provocación se realizó tres semanas después de la segunda vacunación usando una combinación de dos vías de provocación: inyección intraperitoneal (IP) (2 ml) e instilación conjuntival (0,25 ml en el saco conjuntival ventral de cada ojo). Las concentraciones de células bacterianas (células/ml) en los materiales de ensayo se determinaron mediante recuento microscópico directo total con microscopía de campo oscuro y estaban entre 0,5 y 10×10^9 células/ml.

30 Examen

Los perros fueron examinados regularmente a lo largo de cada experimento, incluyendo la medición de la temperatura corporal después de la prueba de provocación usando transpondedores subcutáneos. Se tomaron muestras de sangre y suero mediante venopunción yugular a intervalos regulares durante el experimento para el
 35 recuento de trombocitos, cultivo bacteriano, PCR y ensayo de anticuerpos contra *Leptospira*. Las muestras de suero se analizaron mediante el ensayo de aglutinación microscópica (EAM) contra los serogrupos Canicola, Icter, Gripp y Australis (Faine 1994). Los títulos de aglutinación microscópica se expresaron como los recíprocos de las diluciones de suero más altas que indujeron una aglutinación del 50 %. Se usaron muestras de sangre que usaron EDTA como anticoagulante para evaluar los recuentos de trombocitos después de la prueba de provocación usando un contador de células Cell-Dyn 3500 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, EE.UU.).

Se usó EDTA o sangre heparinizada para volver a aislar de sangre organismos de prueba de provocación hasta el día 21 posterior a la prueba de provocación. Con el mismo fin, se recogieron muestras de orina a intervalos regulares mediante cistocentesis y se muestreó y se procesó tejido renal tomado en la necropsia 4 semanas
 45 después de la exposición como se ha descrito anteriormente (Klaasen HLBM, Molken- boer MJCH, Vrijenhoek MP et al. *Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. Vet Microbiol* 2003; 95: 121-132). Se inocularon muestras de sangre, orina y tejido homogeneizado renal en medio EMJH y los cultivos se incubaron y se examinaron como describe Klaasen.

Se examinaron muestras de suero de los días 0, 3 y 7 después de la prueba de provocación para detectar la presencia de ADN de organismos de prueba de provocación con una PCR en tiempo real dirigida al gen *secY*. Esta PCR es un ensayo validado y es adecuada para la detección de ADN de todas las especies patógenas de *Leptospira* (Ahmed A, Engelberts MFM, Boer KR et al. *Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic Leptospira species in clinical materials. PLoS ONE* 2009; 4 (9): e7093). La PCR fue realizada por la
 50 OMS/OAA/OMSA y el Centro Nacional de Referencia de Leptospirosis, KIT Biomedical Research, Ámsterdam, Países Bajos. Los resultados de la PCR se puntuaron como positivos, sospechosos o negativos.

Los perros con signos clínicos graves después de la prueba de provocación se sacrificaron humanitariamente. En estos casos, se realizó un examen post mortem que incluyó un examen histopatológico con especial atención a la
 60 detección de nefritis intersticial [Klaasen 2003].

La definición de un perro positivo para infección fue un perro con al menos dos muestras positivas de sangre (por cultivo) o suero (por PCR) u orina/riñón (por cultivo) en días diferentes o un perro con nefritis inducida por provocación o evidencia clínica o hematológica (trombocitopenia) de leptospirosis. La definición de un perro positivo para infección renal (animal portador, excretor persistente) fue un perro con al menos una muestra positiva de orina/riñón desde el día 14 posterior a la prueba de provocación o nefritis inducida por prueba de provocación
 65

(demostrada mediante examen histopatológico).

Resultados

- 5 A continuación se muestran los resultados de las cuatro vacunas (sin diluir y diluidas). Muestra que las vacunas, incluso a una dilución del 25 %, todavía ayudan a proteger a los perros contra una infección y protegen a casi todos los animales sometidos a prueba de provocación contra la infección renal.

Tabla 1 Cepa de prueba de provocación Canicola

Vacuna	Perros positivos para infección	Perros positivos para infección renal
100 % de <i>canicola</i>	2/8	0/8
25 % de <i>canicola</i>	1/8	1/8
control	8/8	8/8

10

Tabla 2 Cepa de prueba de provocación Icterohaemorrhagiae

Vacuna	Perros positivos para infección	Perros positivos para infección renal
100 % de ictero	0/7	0/7
25 % de ictero	3/7	0/7
Control	7/7	7/7

Tabla 3 Cepa de prueba de provocación Grippotyphosa

Vacuna	Perros positivos para infección	Perros positivos para infección renal
100 % de grippo	0/8	0/8
25 % de grippo	0/8	0/8
Control	7/8	6/8

15

Tabla 4 Cepa de prueba de provocación Bratislava

Vacuna	Perros positivos para infección	Perros positivos para infección renal
100 % de bratislava	0/8	0/8
25 % de bratislava	0/8	0/8
control	6/8	1/8

Ejemplo 2

- 20 La bacteria *Leptospira* muerta es estable a 2-8 °C durante al menos 39 meses (etiqueta de la vacuna disponible en el mercado Nobivac L4). En este experimento, se determinó si los cuatro antígenos, formulados como se indica en el Ejemplo 1 (100 % de las vacunas) mantienen un nivel de al menos el 25 % de unidades de ELISA cuando se almacenan a 37 °C durante tres meses. Los resultados se indican a continuación en el presente documento. La masa antigénica resultante (valor medio de tres lotes diferentes) se calcula como porcentaje de la masa antigénica resultante de las mismas vacunas almacenadas a 2-8 °C.

25

Tabla 5 Masa de AG en porcentaje después del almacenamiento a 37 °C, en comparación con el almacenamiento a 2-8 °C

Ictero	Bratislava	Grippo	Canicola
98	0	66	80

- 30 Muestra que los antígenos de células enteras muertas de los serogrupos Icterohaemorrhagiae, Canicola y Grippotyphosa son relativamente estables a 37 °C, pero que los antígenos del serogrupo Australis, serovar Bratislava son altamente inestables y no alcanzan al menos el nivel del 25 %, establecido como criterio deseado para la eficacia como vacuna. Aunque a temperatura ambiente, normalmente 20-25 °C, el nivel restante de masa antigénica puede ser mayor, está claro que la estabilidad, en particular para los antígenos de Bratislava, pero también para los antígenos de Grippotyphosa y Canicola, puede mejorarse.

35

Se realizaron ensayos adicionales para mejorar la estabilidad en primer lugar con los antígenos de Bratislava solamente, esperando que cualquier mejora significativa también mejore la estabilidad de los otros antígenos.

Ejemplo 3

Se formularon concentraciones definidas (1000 U/ml) de los mismos antígenos de Bratislava que se describen en el Ejemplo 1 con ácido cítrico, disolviendo el citrato de sodio en formulaciones con diferente pH. Se usó un primer tampón que condujo a un pH de 5 (4,1 gramos de citrato de sodio deshidratado y 1,3 gramos de monohidrato de ácido cítrico por litro) y un segundo tampón que condujo a un pH de 6 (5,4 gramos de citrato de sodio deshidratado y 0,33 gramos de monohidrato de ácido cítrico por litro). Además, se disolvió citrato de sodio tal cual, proporcionando un pH de 7. Como control, los antígenos se pusieron en un tampón PBS como se menciona en el Ejemplo 1 (pH 7,2) y un tampón de acetato 20 mM (pH 5; 1,99 gramos de trihidrato de acetato de sodio y 0,32 gramos de ácido acético). Se alcanzaron las concentraciones finales que se indican en la tabla 6 a continuación. Estas formulaciones se cargaron en viales de vidrio de 3 ml, se taparon con tapones de goma y se sellaron con tapas corrugadas de aluminio.

Tabla 6 Formulaciones utilizadas para experimentos de estabilidad de antígenos de Bratislava

Formulación	Contenido próximo a 1000 U/ml de células enteras muertas de <i>Leptospira bratislava</i>
1	PBS
2	Citrato 20 mM, tamponado a pH 5
3	Citrato 20 mM, tamponado a pH 6
4	Citrato 20 mM, pH 7
5	Tampón de acetato 20 mM, pH 5

La mitad de los viales se incubaron a 2-8 °C, mientras que la otra mitad se incubó a 37 °C. Después de 3 y 9 meses, los viales se analizaron usando un ensayo ELISA de masa antigénica para antígenos de *Leptospira bratislava*. La masa antigénica se determinó frente a la masa antigénica de un patrón de referencia. Los resultados se indican a continuación en el presente documento en la Tabla 7. La masa antigénica resultante (valor medio de tres viales diferentes) se calcula como porcentaje de la masa antigénica resultante de las mismas vacunas almacenadas a 2-8 °C.

Tabla 7 Masa de AG en porcentaje después del almacenamiento a 37 °C, en comparación con el almacenamiento a 2-8 °C

Formulación	3 meses de almacenamiento	9 meses de almacenamiento
1	0	0
2	93	No determinado
3	93	86
4	47	No determinado
5	13	No determinado

Muestra que la estabilidad de los antígenos bacterianos inactivados del serogrupo Australis, serovar Bratislava, aumenta significativamente mediante la adición de ácido cítrico a la formulación. El criterio deseado de al menos el 25 % de la masa antigénica durante un almacenamiento de tres meses a 37 °C (e incluso considerablemente más largo), en comparación con la vacuna almacenada en condiciones convencionales, se ha cumplido con varios niveles de pH, aunque un pH de entre 5 y 6 parece conducir a los mejores resultados. Usar un pH de 5 como tal, sin el ácido cítrico, no conduce a ningún resultado utilizable (formulación 5). Un límite inferior para el ácido cítrico puede determinarse fácilmente mediante experimentación habitual: siempre que la estabilidad después de tres meses de almacenamiento a 37 °C sea del 25 % o más, se cumple el criterio de estabilidad deseado. Puede encontrarse un límite superior de la misma manera, aunque entonces la seguridad de la formulación también podría convertirse en un criterio. El nivel de seguridad requerido puede establecerse en cualquier nivel deseado y no interfiere con la presente invención como tal.

Dada la gran semejanza de los antígenos, puede esperarse razonablemente que mediante el uso de la misma medida (añadiendo los antígenos de *Leptospira* a una solución de ácido cítrico), la estabilidad de otros antígenos bacterianos de *Leptospira* muerta también mejorará. Esto se sometió a ensayo y los resultados se indican a continuación con respecto al Ejemplo 4.

Ejemplo 4

Se formularon concentraciones definidas de los mismos cuatro antígenos de *Leptospira* descritos en el Ejemplo 1 con tres concentraciones diferentes de ácido cítrico (10, 20 y 50 mmol/l) a pH 6. Como control, los antígenos se pusieron en un tampón PBS. Las formulaciones se cargaron en viales de vidrio de 3 ml, se taparon con tapones de goma y se sellaron con tapas corrugadas de aluminio.

La mitad de los viales se incubaron a 2-8 °C, mientras que la otra mitad se incubó a 27 °C. Después de 8 semanas y 9 meses, los viales se analizaron usando un ensayo ELISA de masa antigénica para antígenos de *Leptospira*. La masa antigénica se determinó frente a la masa antigénica de un patrón de referencia. Los resultados se indican a continuación en las Tablas 8, 9, 10 y 11 para los diferentes tipos de antígenos. La masa antigénica resultante (valor medio de tres viales diferentes) se calcula como porcentaje de la masa antigénica resultante de las mismas vacunas almacenadas a 2-8 °C.

Tabla 8 Masa de AG en porcentaje de antígenos de Bratislava después del almacenamiento a 27 °C, en comparación con el almacenamiento a 2-8 °C

Concentración de citrato [mM]	8 semanas de almacenamiento	9 meses de almacenamiento
10	100	44
20	100	84
50	97	80
0 (control)	75	0

Tabla 9 Masa de AG en porcentaje de antígenos de Grippotyphosa después del almacenamiento a 27 °C, en comparación con el almacenamiento a 2-8 °C

Concentración de citrato [mM]	8 semanas de almacenamiento	9 meses de almacenamiento
10	100	100
20	100	100
50	94	94
0 (control)	100	59

Tabla 10 Masa de AG en porcentaje de antígenos de Icterohaemorrhagiae después del almacenamiento a 27 °C, en comparación con el almacenamiento a 2-8 °C

Concentración de citrato [mM]	8 semanas de almacenamiento	9 meses de almacenamiento
10	97	100
20	100	100
50	100	100
0 (control)	91	98

Tabla 11 Masa de AG en porcentaje de antígenos de Canicola después del almacenamiento a 27 °C, en comparación con el almacenamiento a 2-8 °C

Concentración de citrato [mM]	8 semanas de almacenamiento	9 meses de almacenamiento
10	92	100
20	93	98
50	89	82
0 (control)	74	51

Muestra que la estabilidad de diversos tipos de antígenos bacterianos inactivados de *Leptospira* aumenta significativamente mediante la adición de ácido cítrico a la formulación, en línea con las expectativas basadas en los resultados con los antígenos de Bratislava. El criterio deseado de al menos el 25 % de la masa antigénica durante un almacenamiento de tres meses a 27 ° (e incluso considerablemente más largo), en comparación con la vacuna almacenada en condiciones convencionales, se ha cumplido en diversas soluciones de ácido cítrico.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que contiene una preparación celular inmunógena de bacteria *Leptospira* muerta en una solución de ácido cítrico, **caracterizada por que** la solución comprende 20 mmoles de ácido cítrico por litro.
- 5 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación anterior, **caracterizada por que** la solución está tamponada a un pH entre 5 y 6.
3. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** las bacterias *Leptospira* se eligen entre *Leptospira interrogans* serogrupo Canicola serovar Portland-Vere, *Leptospira interrogans* serogrupo Australis serovar Bratislava, *Leptospira interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni y *Leptospira kirschneri* serogrupo Grippotyphosa serovar Dadas.
- 10 4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** las bacterias *Leptospira* son *Leptospira interrogans* serogrupo Australis serovar Bratislava.
- 15 5. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso como vacuna para proteger a un animal contra una infección con bacterias *Leptospira*.