



No. 09-024344- -00008-0000

Fecha: 2013-02-01 16:50:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 5



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRESIÓN DE NUEVAS CREACIONES

DIVISIONAL
SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: BACTERINAS TRATADAS CON CALOR Y VACUNAS DE
EMULSIÓN PREPARADAS A PARTIR DE ESTAS BACTERINAS TRATADAS
CON CALOR

EXPEDIENTE No. 09-024.344A

SOLICITANTE: PFIZER PRODUCTS INC.

DIRECCIÓN: EASTERN POINT ROAD, GROTON, CT 06340 E.U.A

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 01 de febrero de 2013

P2009/000024A

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-024344- -00008-0000

Fecha: 2013-02-01 16:50:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 5

Carlos R. Olarte
Juan G. Moure

Alexander Agudelo
Carlos A. Parra
Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Mónica Guevara
Andrés Alvarado
Ella Ponce
Liliana Galindo
María Clara Calderón
Mauricio Ávila
Laura Escobar
José Jairo Dangond
Gina Cáceres
Isabella Herrera
Zaava Ravid

Medellín

María Clara Múnera

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. 09-024.344A

Solicitud de patente de invención titulada: "BACTERINAS TRATADAS CON CALOR Y VACUNAS DE EMULSIÓN PREPARADAS A PARTIR DE ESTAS BACTERINAS TRATADAS CON CALOR"

Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC

Nuestra Ref.: P2009/0000024A

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente:

1. Me permito presentar una **SOLICITUD DIVISIONAL A**, para la solicitud de patente en referencia.

Atentamente,

CARLOS R. OLARTE
C.C. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Anexo: Solicitud Divisional

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.



Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000024A

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: PFIZER PRODUCTS INC

Dirección: Eastern Point Road, Groton,
CT 06340

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense
Lugar de Constitución: Estados Unidos de
America

Teléfono: **Fax:**
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ **NIT** ☐

C.E. ☐ **Otro** ☐

Cual

Número

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8ª-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ **NIT** ☐

C.E. ☐ **Otro** ☐

Cual

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2007/002553 Fecha Agosto 30, 2007

Publicación Internacional No. WO 2008/032158 Fecha Marzo 20, 2008

6

Título (54) BACTERINAS TRATADAS CON CALOR, Y VACUNAS DE EMULSIÓN
PREPARADAS A PARTIR DE ESTAS BACTERINAS TRATADAS CON CALOR

Clasificación Internacional (51) A61K 39/00, A61K 39/02

Prioridad

SI ☒ **NO** ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Septiembre 11, 2006

(31) Número de Solicitud

60/843,665

9

Comprobante de pago No. 13-

Fecha Enero de 2013

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple.

☒

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

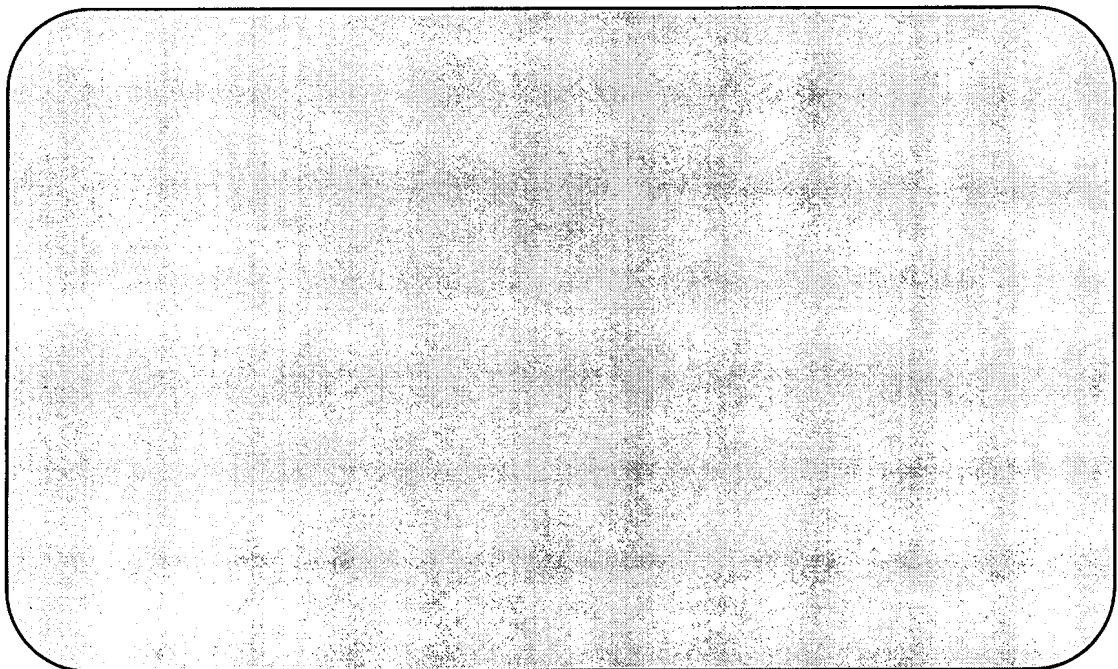
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

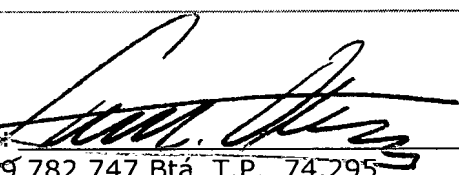
FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

α

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2007/002553

1. **Mark Davis GOODYEAR,**
Pfizer Global Research and Development,
301 Henrietta Street, Kalamazoo,
MI 49001
Estados Unidos de America
Nacionalidad: Estadounidense
2. **Michael John HUETHER,**
Pfizer Global Research and Development,
601 West Cornhusker Highway,
Lincoln, Nebraska 68521
Estados Unidos de America
Nacionalidad: Estadounidense
3. **Ramasamy Mannar MANNAN,**
392 Kildeer Lane, Deerfird,
IL 60015
Estados Unidos de America
Nacionalidad: Estadounidense
4. **Nancee Lois OIEN,**
Pfizer Global Research and Development,
301 Henrietta Street, Kalamazoo,
MI 49001
Estados Unidos de America
Nacionalidad: Estadounidense

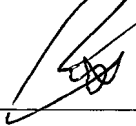
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0010401
		Bogotá D.C., Febrero 01 de 2013 - 12:16:49

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS					NI 830.122.870
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	181303253	30/01/2013	8.326.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. LINDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
				\$450.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-024344- -00008-0000
Fecha: 2013-02-01 16:50:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 5

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia:		Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	09-24344-	8	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:
Anexo 1 C.D

TRADUCCION OFICIAL No. 05-223

Efectuada el día 9 de diciembre de 2005, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 expedida por el Ministerio de Justicia y del Derecho el 11 de febrero de 2002.

Traducción de las Autenticaciones Notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por **PFIZER PRODUCTS, INC.**, a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, documento este que viene en español, se explica por sí solo y fue firmado por Grover F. Fuller, Jr. el 17 de noviembre de 2005 en Nueva York, Estados Unidos de América.

También en inglés y en español viene Certificación Notarial mediante la cual se confirma el nombre y cargo de **Grover F. Fuller, Jr.**, así como la existencia legal de la compañía. Dicha certificación notarial está firmada por Susan Z. Killian, Notario Público de Nueva York, cuyo cargo expira el 4 de octubre de 2008, según consta en su correspondiente sello notarial.

Suscrito y jurado ante mí el 17 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Susan Z. Killian


SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. 0138
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCION No. 0138 del 11/2/2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

ESTADO DE NUEVA YORK - CONDADO DE NUEVA YORK No. 467518

El suscrito, Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York, tribunal éste provisto de sello por ley, por medio de este documento certifico conforme a la ley ejecutiva del Estado de Nueva York que Susan Z. Killian, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración jurada o certificado de reconocimiento anexo, desempeñaba en el momento de tomar el mismo, las funciones de Notario Público, en y para el Estado de Nueva York, estando debidamente comisionado bajo juramento y habilitado como tal; que conforme a la ley en mi despacho obra un certificado de su nombramiento con su firma autógrafa; que conozco bien la letra manuscrita de dicho Notario Público o he comparado la firma que aparece en el instrumento anexo con la que reposa en los archivos de mi oficina, y creo en conciencia que la misma es auténtica.

EN FE DE LO CUAL, firmo de mi puño y letra y estampo mi sello oficial, el día 22 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York.

SERGIO ANDRES RUEDA IGLES
C. C. 8. 1.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCIÓN No. 0138 DE FEBRERO DE 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
El presente documento público
2. Fue firmado por: Norman Goodman
3. Que actuó en su calidad de: Escribano del Condado
4. Lleva el sello del Condado de Nueva York
Se certificó:
5. En Nueva York, Nueva York
6. El 22 de noviembre de 2005
7. Por parte del Secretario de Estado, (Encargado) del
Estado de Nueva York
8. Bajo el Número **NYC-10404952A**
9. Aparece Sello del Estado de Nueva York
10. Firmado por: James Bizzarri, Secretario de Estado
Especial Encargado

Es traducción fiel y completa efectuada por:


Sergio Andrés Rueda Iglesias
c.c. 80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C.C. 80.424.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
BOGOTÁ, D.C. 11 DE FEBRERO DE 2002
BOGOTÁ, D.C. 11 DE FEBRERO DE 2002
BOGOTÁ, D.C. 11 DE FEBRERO DE 2002

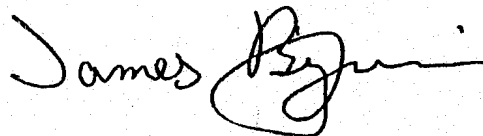
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: **United States of America**
This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York
6. the 22nd day of November 2005
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10404952A
9. Seal/Stamp
10. Signature



James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

PFIZER PRODUCTS INC.,

domiciled in

domiciliado en

Eastern Point Road, Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

PFIZER PRODUCTS INC.,

By:

Grover F. Fuller, Jr.

Vice President, Attorney-In- Fact

Date/Fecha:

17 November 2005

City, Country/Ciudad, País: New York, NY USA

Notarial Certification

On this date,

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

Grover F. Fuller, Jr.

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

mayor de edad y domiciliado

Street 150 East 42nd Street

City New York

State New York 10017-5612 USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Vice President, Attorney-In-Fact of **PFIZER PRODUCTS INC.**

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de

3. That **PFIZER PRODUCTS INC.**, having its principal place of business located in Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

4. Que con sede principal ubicada en

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

NOTARY PUBLIC (Signature):

Susan Z. Killian



SUSAN Z. KILLIAN
Notary Public, State of New York
No. 01K16116521
Qualified in New York County
Commission Expires October 4, 2008

State of New York
County of New York
SWORN to and SUBSCRIBED before me
this 17 day of Nov. 2005
Susan Z. Killian

State of New York
County of New York, } ss.:

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal, DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

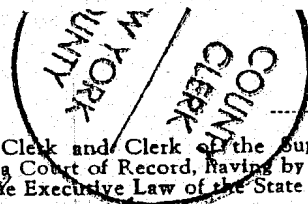
whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

FEE PAID \$3.00

NOV 22 2005

Norman Goodman
County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County



467518

Form 1

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 March 2008 (20.03.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/032158 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(74) Agent: FULLER, Grover, F., Jr.; Pfizer Inc., 150 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US).

(21) International Application Number:
PCT/IB2007/002553

(22) International Filing Date: 30 August 2007 (30.08.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/843,665 11 September 2006 (11.09.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **PFIZER PRODUCTS INC.** [US/US]; Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **GOODYEAR, Mark Davis** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US). **HUETHER, Michael John** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 601 West Cornhusker Highway, Lincoln, Nebraska 68521 (US). **MANNAN, Ramasamy Mannar** [US/US]; 392 Kildeer Lane, Deerfield, IL 60015 (US). **OIEN, Nancee Lois** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(54) Title: HEAT TREATED BACTERINS, AND EMULSION VACCINES PREPARED FROM SUCH HEAT TREATED BACTERINS

(57) Abstract: Heat treated bacterins, a method of producing heat treated bacterins, and emulsion vaccines prepared from such heat treated bacterins are disclosed.



WO 2008/032158 A2

HEAT TREATED BACTERINS, AND EMULSION VACCINES PREPARED FROM SUCH HEAT TREATED BACTERINS

FIELD OF INVENTION

5 This invention relates generally to the field of vaccines and to methods of stabilizing emulsion vaccines. In particular, this invention relates to heat treated bacterins, a method of producing heat treated bacterins, and emulsion vaccines prepared from such heat treated bacterins.

10 BACKGROUND OF THE INVENTION

Vaccination is increasingly used to control the infectious diseases in animals. Adjuvants are frequently used in vaccines because they are able to increase the humoral and/or cellular immune response to an antigen. Vaccines are often formulated as emulsions because the emulsion can act as an adjuvant, and has the
15 property of retaining the antigen as a depot at the site of injection. Emulsifiers are commonly used in emulsion vaccines. Besides using emulsifiers, the stability of the emulsion vaccines may also be achieved through reducing the droplet size of the emulsion by mechanical means.

U.S. Patent No. 5,084,269 relates to an adjuvant formulation containing
20 lecithin in combination with mineral oil, which produces less irritation within the host animal, and simultaneously induces increased systemic immunity. Compositions according to US Patent 5,084,269 are in commercial use under the trade name AMPHIGEN[®], a trademark of Pfizer, Inc.

Generally, bacterial antigens are unstable when heated and even brief
25 exposure to elevated temperatures can reduce the activity of the antigens. For example current anthrax vaccines can lose all biological activity with 48 hours at 37° C (S. Sing, N. Ahuja, V. Chauhan, E. Rajasekaran, W. S. Mohsin, R. Bhat, and R. Bhatnagar; Bioche. Biophys. Res. Commun. 2002 Sep. 6; 295(5):1058-62).

30 SUMMARY OF INVENTION

This invention relates to heat treated bacterins, a method of producing heat treated bacterins, and emulsion vaccines prepared from such heat treated bacterins. The method comprises heating the bacterin to a temperature of about 35 to about 80 °C to form a heat treated bacterin.

DETAILED DESCRIPTION

DEFINITIONS

Acceptable antigenic activity – The term “acceptable antigenic activity”
5 means the ability to induce a protective immune response in vaccinated animals after being challenged or by passing a codified potency test with homologous live organism.

Bacterin – The term “bacterin” means a suspension of killed bacteria which may be used as a component of a vaccine.

10 Emulsifier – The term “emulsifier” means a substance used to make an emulsion more stable.

Emulsion – The term “emulsion” means a composition of two immiscible liquids in which small droplets of one liquid are suspended in a continuous phase of the other liquid.

15 Heat treated bacterin – The term “heat treated bacterin” means a bacterin that has been heat treated and which has a lipase activity of 50% or less than the lipase activity before the heat treatment, and has acceptable antigenic activity.

Invert Emulsion – The term “invert emulsion” means a water in oil emulsion.

Lipase – The term “lipase” means enzymes, esterases, lipases, and
20 phospholipases, which can cause breakdown of an emulsifier in an emulsion vaccine.

Normal Emulsion – The term “normal emulsion” means an oil in water emulsion.

Oil in Water Emulsion – The term “oil in water emulsion” means an emulsion in which small droplets of oil are suspended in a continuous water phase.

25 Room Temperature – The term “room temperature” means a temperature from 18 to 25 °C.

Water in Oil Emulsion – The term “water in oil emulsion” means an emulsion in which droplets of water are suspended in a continuous oil phase.

30 DESCRIPTION

This invention relates to bacterins with reduced lipase activity, vaccines prepared from such bacterins, and a method of reducing the lipase activity of bacterins. In addition to antigenic components, some bacterins have lipase activity. When bacterins with lipase activity are incorporated into an emulsion, the lipase may

break down the emulsifiers used to create the emulsion. Emulsion vaccines that contain bacterins having high lipase activity tend to be unstable emulsions, and those that contain bacterins having low levels of lipase tend to be stable. Examples of bacteria which may, when killed, produce bacterins having lipase activity include

5 *Aceinetobacter calcoaceticus*, *Acetobacter paseruianus*, *Aeromonas hydrophila*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Arhaeglobus fulgidus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chromobacterium viscosum*,

10 *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Lawsonia intracellularis*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella* sp., *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* LC, *Clostridium perfringens*, *Photobacterium luminescens*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas wisconsinensis*, *Pseudomonas aeruginosa*,

15 *Pseudomonas fluorescens* C9, *Pseudomonas fluorescens* SIKW1, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas* sp B11-1, *Alcaligenes eutrophus*, *Psychrobacter immobilis*, *Rickettsia prowazekii*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Spirulina platensis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces cinnamomeus*,

20 *Streptomyces exfoliates*, *Streptomyces scabies*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Syechocystis* sp., *Vibrio cholerae*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema denticola*, *Treponema minutum*, *Treponema phagedenis*, *Treponema refringens*, *Treponema vincentii*, *Treponema palladium*, and *Leptospira* species, such as the known pathogens *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyposa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira*

25 *icterohaemorrhagiae*, and *Leptospira pomona*.

The lipase, which can break down the emulsifiers used to create the emulsion, and thus cause emulsion instability and breakdown, may include one or more emulsion breaking enzymes such as esterases, lipases, and phospholipases. Collectively these enzymes, esterases, lipases, and phospholipases are referred to as

30 lipase. The lipase activity of a bacterin may be measured using a synthetic substrate called O-pivaloyloxymethyl umbelliferone (C-POM). The rate of hydrolysis caused by the lipase is the measure of the lipase activity. The reaction rate of the hydrolysis caused by the lipase in this reaction is monitored by an increase in the fluorescence intensity of the product of the lipase activity. The reaction rate is dependent upon the

exact hydrolysis test conditions chosen, so that comparisons of lipase activity levels, as measured by hydrolysis rates, should be made using data produced by the same test conditions. Literature methods are disclosed in several articles, including Kurioka S., and Matsuda M. (1976) *Ana. Biochem.* 75: 281-289, De Silva NS, and Quinn PA.
5 (1987) *J. Clin. Microbiol.* 25: 729-731, and Grau, A., and Ortiz, A. (1998) *Chem. Phys. of Lipids.* 91: 109-118.

In an emulsion vaccine, the break down of the emulsion causes phase separation of the components. This is undesirable because when there is phase separation the individual doses removed from the container may not contain the same
10 level of the vaccine components. In addition, the loss of emulsion can lead to a loss of the adjuvant activity of the emulsifier and lead to a reduction in the antigenic effect of the vaccine.

Attenuated live viruses are frequently included in vaccines along with bacterins. Such vaccines are useful because a single vaccine can be used to create
15 immunity to different diseases with one vaccine. If the lipase activity is present in the bacterin, it will cause release of the emulsifier from the emulsion. This free emulsifier can disrupt and inactivate the live vaccine viruses, thereby leading to a loss of viral infectivity.

A bacterin useful in vaccines may be formed by culturing the bacterium of
20 interest, and then killing the bacteria to produce a bacterin containing a variety of bacterial components, including cell wall components. The bacteria may be killed by a variety of methods including exposing them to a compound such as merthiolate, formalin, formaldehyde, diethylamine, binary ethylenamine (BEI), beta propiolactone (BPL), and glutaraldehyde. Combinations of these compounds may be used. In
25 addition, it is possible to kill the bacteria with sterilizing radiation.

It has now been found that the lipase activity of a bacterin having such lipase activity may be reduced by heat treatment. Specifically, the lipase activity of a bacterin may be reduced by heating the bacterin to a temperature of about 35 to about 80 °C to form a heat treated bacterin, which has acceptable antigenic activity. The
30 heat treatment is conducted for a period of time sufficient so that the lipase activity of the heat treated bacterin is 50% or less than that found in the bacterin prior to the heat treatment. For good emulsion vaccine stability it is not necessary that the lipase activity be reduced to zero. We have found that vaccines having a good shelf life may

be prepared from heat treated bacterins having lipase activity level that is 50% or less than of the lipase activity level before the heat treatment.

When a rate of hydrolysis of a test substrate has been used as a measure of the lipase activity of a bacterin, then the rate of hydrolysis of the test substrate before the heat treatment is compared to the rate of hydrolysis after the heat treatment. The heat treatment is conducted so as to reduce the rate of hydrolysis to 50% or less than the rate of hydrolysis that is observed for the fresh bacterin.

The exact method of measuring the lipase activity level is not critical as long as the same method is used to measure the activity before the heat treatment and the activity after the heat treatment. For example, if the rate of hydrolysis of a test substrate is measured using one substrate, a different substrate might produce a different rate. However, if the same substrate is used for the initial activity determination and the activity determination after treatment, the relative rates will still show the effect of the heat treatment.

For the bacterins comprising one or more of the following, *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira pomona*, there is a codified test for antigenic activity (9CFR §113.101, §113.102, §113.103, §113.104, and §113.105). For these species acceptable antigenic activity is defined as the ability to induce a protective immune response in vaccinated hamsters such that when hamsters are challenged with homologous live bacteria, at least 75% of the vaccinated hamsters survive in a model where at least 80% of the non-vaccinated hamsters do not survive. In the case of the antigen, *Leptospira hardjo*, acceptable antigenic activity is defined as the ability of a vaccine to induce a serological agglutination geometric mean titer against *Leptospira hardjo* of ≥ 40 in calves that have been vaccinated with a vaccine comprising the bacterial antigen, *Leptospira hardjo*. For other bacterins acceptable antigenic activity is defined as the ability to induce a protective immune response in vaccinated animals after being challenged or by passing a codified potency test with homologous live organism.

The heat treatment may be conducted over a range of temperatures, and for a variable length of time. Generally, the heating may be done at a temperature of about 35 to about 80 °C for about 20 minutes to about 24 hours. When the bacterin is heated to a higher temperature, such as about 75 to about 80 °C, the time of heating is at the short end of the time range. When the heating is done at a lower temperature, the heating is done for a longer period of time. Another combination of temperature and

time is heating at a temperature of about 60 to about 70 °C for about 9 to about 10 hours. Another combination of temperature and time is heating at a temperature of about 65 to about 70 °C for about 5 to about 8 hours. Another combination of temperature and time is heating at a temperature of about 65 to about 70 °C for about one hour. Another combination of temperature and time is heating at a temperature of about 55 to about 65 °C for about 5 to about 8 hours.

The bacterins, after the heat treatment, have a lower lipase activity than freshly prepared bacterins but otherwise may be formulated in the same manner as freshly prepared bacterins. Accordingly, the heat treated bacterins may be incorporated into vaccines by ordinary methods of producing vaccines. These methods are well known in the art.

Emulsion vaccines may be formed by combining the desired bacterin with an oils phase and an emulsifier, or emulsifiers. The combination is then subjected to intense agitation to form an emulsion. Suitable agitation methods include homogenizing and subsequently microfluidizing. Preservatives and excipients may also be included in the combination prior to emulsification.

Vaccines may include both bacterins and viral antigens. In preparing a vaccine that includes bacterins and viral antigens, the bacterins, any viral antigens to be included, the emulsifier, or emulsifiers, and optionally preservatives and excipients are combined with an oil phase, and emulsified. Following emulsion formation, the pH of the formulations may be adjusted to an appropriate pH using either solutions of NaOH or HCl. For vaccine use, it is generally desirable that the pH be close to neutral to avoid irritation at the injection site. A pH of about 7.0 to about 7.3 is common.

Suitable oil phases for emulsion vaccine formation include non-metabolizable oils and metabolizable oils. The non-metabolizable oils include mineral oils, such as white mineral oil, and light mineral oil. The metabolizable oils include vegetable oils, fish oils and synthetic fatty acid glycerides.

Examples of emulsifiers that may be used in preparing emulsion vaccines of this invention are phospholipids, sorbitan esters, polyethoxylated sorbitan esters, and mannitol derivatives which are common vaccine emulsifiers. Phospholipid emulsifiers include lecithin, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylserine, and lecithin, (e.g. such as AMPHIGEN[®]). Sorbitan ester emulsifiers include sorbitan monolaurate, (e.g. Span[®] 20 and Arlacel[®] 20), sorbitan

monooleate (e.g. Span[®] 80 and Arlacel[®] 80), sorbitan monopalmitate (e.g. Span[®] 40 and Arlacel[®] 40), and sorbitan monostearate (e.g. Span[®] 60 and Arlacel[®] 60). Polyethoxylated sorbitan esters include polyethoxy sorbitan monolaurate (e.g. Tween[®] 20 and Tween[®] 21), polyethoxy sorbitan monooleate (e.g. Tween[®] 80),
5 polyethoxy sorbitan monopalmitate (e.g. Tween[®] 40), and polyethoxy sorbitan monostearate (e.g. Tween[®] 60). Mannitol derivative emulsifiers include mannitol octadecanoic ethers. Span[®], Arlacel[®], and Tween[®] are trademarks of ICI Americas. AMPHIGEN[®] is a trademark of Pfizer, Inc. Generally, vaccines are formulated as normal oil in water emulsions, although it is possible to prepare invert water in oil
10 emulsions.

A variety of adjuvants, such as Quil A, cholesterol, aluminum phosphate, and aluminum hydroxide, and preservatives such as merthiolate may be used in vaccines. Quil A is purified mixture of quillaja saponins extracted from the bark of the South American tree Quillaja Saponaria Molina. Quil A acts directly on the immune system
15 to activate a generalized state of sensitivity. In doing so, it induces both humoral and cell-mediated responses. The lipophilic chain allows interaction of antigen and adjuvant to be delivered into the cytosol for processing in an endogenous pathway. Quil A is often used with cholesterol because cholesterol eliminates the less desirable side effects when added in the appropriate proportions. Cholesterol forms insoluble
20 complexes with Quil A that form helix-like structures as the cholesterol binds with Quil A, thus exposing the molecule's sugar units that help stimulate the immune response.

It is common to add viral antigens to vaccines containing bacterins. One advantage of this approach is that one vaccine may be used to create immunity to
25 several diseases instead of requiring dosages of several different vaccines to achieve the same result. Both killed viruses and attenuated live viruses may be used in vaccines. Among the viruses that may be used are Avian herpesvirus, Bovine herpesviruses, Canine herpesviruses, Equine herpesviruses, Feline viral rhinotracheitis virus, Marek's disease virus, Ovine herpesviruses, Porcine herpesviruses,
30 Pseudorabies virus, Avian paramyxoviruses, Bovine respiratory syncytial virus, Canine distemper virus, Canine parainfluenza virus, Bovine Parainfluenza 3, Ovine parainfluenza 3, Rinderpest virus, Border disease virus, Bovine viral diarrhea (BVD) virus, Classical swine fever virus, Avian Leukosis virus, Bovine immunodeficiency virus, Bovine leukemia virus, Equine infectious anemia virus, Feline

immunodeficiency virus, Feline leukemia virus, Ovine progressive pneumonia virus, Ovine pulmonary adenocarcinoma virus, Canine coronavirus, Bovine coronavirus, Feline enteric coronavirus, Feline infectious peritonitis, virus, Porcine epidemic diarrhea virus, Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, Porcine
5 parvovirus, Transmissible gastroenteritis virus, Turkey coronavirus, Bovine ephemeral fever virus, Rabies, Vesicular stomatitis virus, Avian influenza, Equine influenza virus, Swine influenza virus, Canine influenza virus, Eastern Equine encephalitis virus (EEE), Venezuelan equine encephalitis virus, and Western equine encephalitis virus.

10 If lipase activity is present in the bacterin, it may cause release of the emulsifier from the emulsion. This free emulsifier may disrupt the live virus envelope, and inactivate the live vaccine viruses, thereby leading to a loss of viral infectivity. Accordingly, heat treatment of the bacterin serves to stabilize the emulsion, and preserve its adjuvant effect, as well as preserving the viral infectivity of
15 the viruses.

The following examples are provided for the purpose of further illustration and are not intended to limit the scope of the claimed invention.

PROCEDURES

Procedure 1 Determination of Turbidity

20 Turbidity is determined in Nephelometric Units (NU) by a light scattering method. The intensity of light scattered by the sample under defined conditions is compared to the intensity of light scattered by a standard reference suspension. The higher the intensity of the scattered light, the higher the turbidity of the sample. A light source is directed into the sample and the light scatter is measured at 90° to the
25 direction of the light source. The instrument is calibrated by measuring the light scatter from a formazin suspension.

Calibration Of The Nephelometer Instrument

Ultra-filtered water is prepared by filtering distilled water through a membrane filter having a pore size of 0.2 µm. A first solution is prepared by dissolving 1.00 g
30 hydrazine sulfate, (NH₂) H₂SO₄, in ultra-filtered water and diluted with ultra-filtered water to 100 ml, in a volumetric flask. A second solution is prepared by dissolving 10.00 g. of hexamethylenetetramine in ultra-filtered water and diluting with ultra-filtered water to 100 ml, in a volumetric flask. A formazin suspension is prepared by mixing 5.0 ml of the first solution with 5.0 ml of the second solution. The mixture is

allowed to stand for 24 hours at approximately 24 °C. The mixture is diluted to 100ml with ultra-filtered water to form a stock turbidity suspension having a turbidity of 400 NU. A 40 NU formazin turbidity suspension is prepared by diluting 10.00 ml of the stock turbidity suspension to 100 ml with ultra-filtered water. Further
5 calibration solutions are prepared by diluting the stock solution.

Measurement of Turbidity

The sample to be measured is diluted with ultra-filtered water so that the turbidity falls within the calibrated range of the nephelometer. The turbidity is
10 measured and the original turbidity is calculated using the following equation:

$$\text{Original Turbidity in NU} = \frac{M \times (D + O)}{O}$$

where: M is the turbidity of the diluted sample in NU

D is the volume of dilution water, in mL

15 O is the original sample volume, in mL

Procedure 2 Lipase Analysis

Lipase activity was determined using O-pivaloxymethylumbelliferone as a fluorogenic substrate. Lipase catalyzed hydrolysis of this non-fluorescent substrate produces a hydroxymethylether, which is unstable under aqueous conditions. The
20 decomposition of the unstable hydroxymethylether generates formaldehyde and the fluorescent product umbelliferone. Monitoring the fluorescence intensity of umbelliferone produced, as a function of time, provides a sensitive kinetic measurement of the lipase enzymatic activity.

O-pivaloxymethylumbelliferone (Molecular Probes product no. P35901)
25 solutions were prepared in neat DMSO, at a stock concentration of 5 mM; unused solution was stored at -20 °C, protected from light. The 5 mM O-pivaloxymethylumbelliferone solution was diluted to 750 µM using 58 mM TRIS-HCl buffer (pH 8.0), and the resulting solution pre-warmed to 37 °C. The *Leptospira* sample or the control buffer/medium was centrifuged for 10 minutes at room
30 temperature at 6500 X gravity to form a pellet and a supernatant. Reactions were performed by combining 15 µL of 100 mM TRIS-HCl buffer (pH 8.0) with 15 µL of the supernatant at room temperature from *Leptospira* sample or the control buffer/medium, in assay wells of low volume 96 well plates (Corning 3393, black polystyrene non-binding surface, half area); pre-incubating for 10 minutes at 37 °C;
35 then initiating the reaction by the addition of 20 µL of 750 µM O-

pivaloxymethylumbelliferone or the control buffer/medium. The resulting reaction mixtures contained 53 mM TRIS-HCl buffer (pH 8.0) and 0 or 300 μ M *O*-pivaloxymethylumbelliferone. Fluorescence intensity was measured at 30-45 second intervals over a one-hour period (Spectramax Gemini XS, 37 °C, λ_{ex} = 360 nm, λ_{em} = 460 nm, PMT sensitivity setting 'medium', 6 reads per well). The reaction rate was determined from the slope of the resulting progress curve.

EXAMPLES

Example 1 Reduction Of Lipase Activity By Heat Treatment

A pool of merthiolate killed leptospira containing the following species

Leptospira canicola, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo*, and *Leptospira pomona* was prepared to form a bacterin. Six samples of the bacterin were stored overnight (approximately 12 hours) at 4 °C, 37 °C, 45 °C, 56 °C, 65 °C, and 80 °C. The sample stored at 4 °C served as the non-treated control. The samples stored for 12 hours at 37 °C, 45 °C, 56 °C, 65 °C, and 80 °C were heat treated samples. After storage, the rate at which a test substrate hydrolysed in the presence of each bacterin was measured according to the method of Procedure 2. The rate of hydrolysis for a sample divided by the rate of hydrolysis of the sample stored at 4 °C multiplied by 100 is the percentage of the original lipase activity of each bacterin that remains after storage. The following chart shows the temperature of storage and the percentage of the original lipase activity that remains after storage.

Storage Temperature (12 hours)	4 °C	37 °C	45 °C	56 °C	65 °C	80 °C
Percent of Original Lipase Activity	100%	55.4%	32.5%	15.7%	10.8%	8.4%

Example 2 Preparation of Experimental Vaccine Formulations

Cultures of *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo*, and *Leptospira pomona* were grown. The turbidity of each culture was measured in nephelometric units (NU). The bacteria were killed with merthiolate to form bacterins. Each bacterin was heat treated at 65 °C for 8 hours to reduce the lipase activity. The bacterins were combined and then

mixed with AMPHIGEN[®], adjuvants, preservatives, and diluting buffer so that each 5 ml dose of the vaccine contained the components set forth in the chart below.

Concentrations of Antigens

Component	Concentration of Component/Dose
L. canicola	1200 NU/5 ml dose
L. icterohaemorrhagiae	1200 NU/5 ml dose
L. grippotyphosa	1200 NU/5 ml dose
L. hardjo	2400 NU/5 ml dose
L. pomona	1200 NU/5 ml dose

5

The formulation was homogenized using a Silverson homogenizer and microfluidized using a microfluidizer from Microfluidics. Following both homogenization and microfluidization, the pH of the formulation was adjusted to a pH of 7.0 to 7.3.

10

Example 3 Potency Testing in Hamsters and Cows

The vaccine of Example 2 was administered to hamsters and cows to test for potency using standard lab and host animal models. The test hamsters were then challenged with a dose of a *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, or *Leptospira pomona* to test potency of the vaccines. The numbers of survivors were measured as a demonstration of efficacy. Bovine microscopic agglutination titers were measured against *Leptospira hardjo* to demonstrate the potency of that fraction of the vaccine in cows. The table below shows that vaccines prepared from heat treated *Leptospira* bacterins are capable of producing an antigenic response that passes efficacy criteria.

20

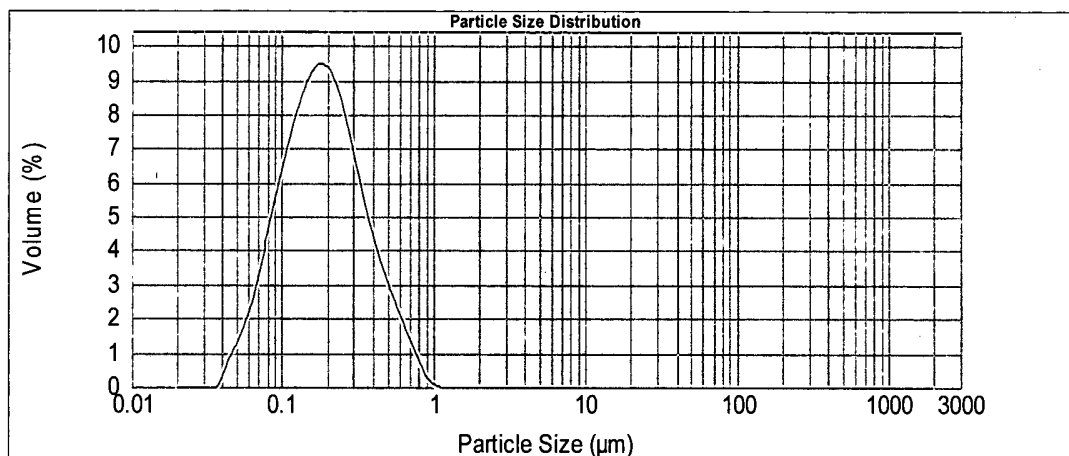
Leptospira Thermal Conditioning	HAMSTER SURVIVORS				BOVINE SEROLOGY
	Canicola	Icteero	Grippe	Pomona	Hardjo
65 °C (8 hours)	10/10	10/10	10/10	10/10	Pass
Untreated	10/10	10/10	10/10	10/10	Pass

Example 4 Physiochemical Testing Of Vaccines

A vaccine was prepared from heat treated *Leptospira* bacterins according to the method of Example 2. A similar vaccine was prepared from and non-heat treated *Leptospira* bacterins according to the method of Example 2. Both vaccine

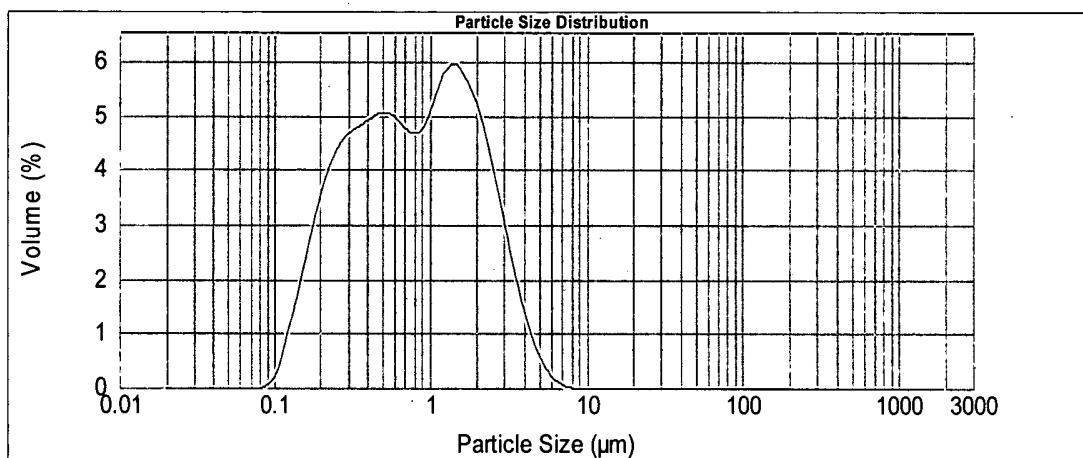
formulations were stored 4 °C for 60 days. Particle size analysis was done for each vaccine when freshly prepared on day 0 and again at 60 days using a laser diffractometer.

The charts shown below show particle size distributions for each vaccine on
5 day 0 before and after storage for 60 days.

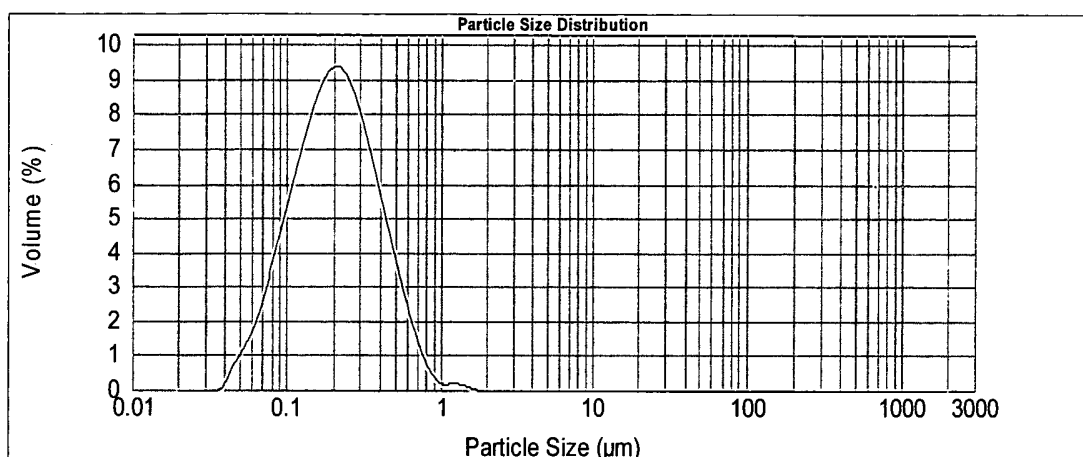


Particle size analysis of freshly prepared vaccine
containing non-heat treated *Leptospira* bacterins day 0

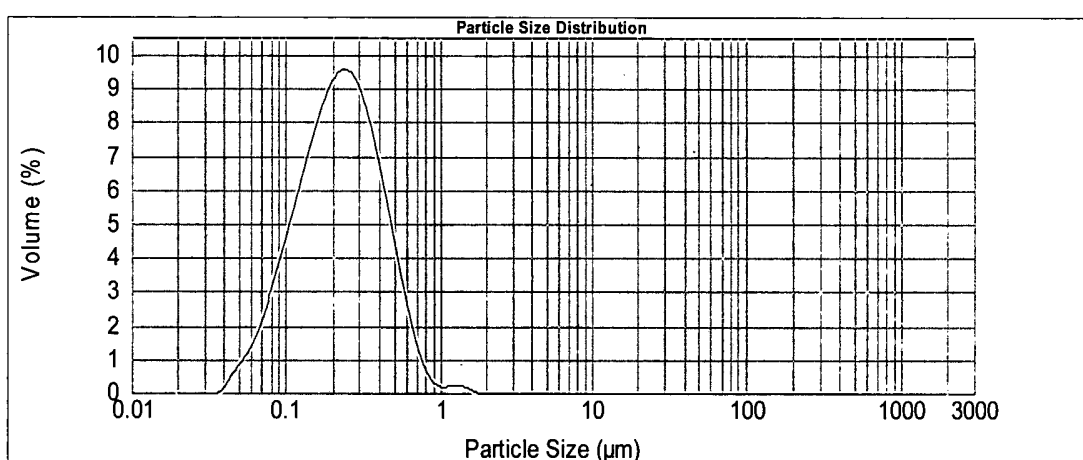
10



Particle size analysis of vaccine containing
non-heat treated *Leptospira* bacterins at day 60



Particle size analysis of freshly prepared vaccine containing heat treated *Leptospira* bacterins day 0



5

Particle size analysis of vaccine containing heat treated *Leptospira* bacterins at day 60

The vaccine prepared from heat treated *Leptospira* bacterins shows particle size retention indicating emulsion stability. The vaccine prepared from non-heat treated *Leptospira* bacterins shows an increase in particle size indicating emulsion breakdown.

Example 5 Viricidal Assay

Following the method of Example 2 vaccines were prepared from non-heat treated *Leptospira* bacterins and heat treated *Leptospira* bacterins. After 5 to 6 months of aging, the vaccines were tested for viricidal activity against BHV-1 virus, PI3 virus and BRSV virus. The viricidal activity test was performed by rehydrating monovalent viricidal assay controls (VAC), with the adjuvanted diluent to be tested. Two monovalent viricidal assay controls were rehydrated at each dose volume. The two rehydrated monovalent VACs were pooled and incubated at 20-25 °C for two hours prior to titration and inoculation on cells to determine by TCID₅₀ (50% tissue

culture infective dose), live viral titer. It is unsatisfactory to have a viral titer loss of greater than 0.7 TCID₅₀/ml.

The results of the viricidal assays showing viral titer loss are listed in the table below:

5

Leptospira Thermal Conditioning	Viral Titer Loss (TCID ₅₀)		
	BHV-1	PI3	BRSV
8 hours at 65 °C	0.1	0.0	0.4
Untreated	1.0	≥ 1.2	≥ 1.3

The vaccine made with non-heat treated *Leptospira* bacterins shows high levels of viricidal activity. The vaccine made with heat treated *Leptospira* bacterins was non-viricidal.

CLAIMS

1. A heat treated bacterin, comprising a suspension of killed bacteria having a lipase activity of 50% or less than the lipase activity of the bacterin before heat treatment.
- 5 2. A heat treated bacterin, according to claim 1 wherein the heat treatment comprises heating a bacterin having lipase activity to a temperature of about 35 to about 80 °C for about 20 minutes to about 24 hours.
3. A heat treated bacterin, according to claim 1 wherein the heat treatment comprises heating a bacterin having lipase activity to a temperature of about 60 to
10 about 70 °C for about 9 to about 10 hours.
4. A heat treated bacterin, according to claim 1 wherein the heat treatment comprises heating a bacterin having lipase activity to a temperature of about 65 to about 70 °C for about 5 to about 8 hours.
5. A heat treated bacterin, comprising a suspension of killed bacteria, according
15 to claim 1 wherein the heat treatment comprises: heating a bacterin having lipase activity to a temperature of about 65 to about 70 °C for about 1 hour.
6. A heat treated bacterin, comprising a suspension of killed bacteria, according to claim 1 wherein the heat treatment comprises: heating a bacterin having lipase activity to a temperature of about 55 to about 65 °C for about 5 to about 8 hours.
- 20 7. A heat treated bacterin, comprising a suspension of killed bacteria, according to claim 2 wherein the killed bacteria are one to five *Leptospira* species selected from the group consisting of *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyposa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, and *Leptospira pomona*.
8. A vaccine comprising an emulsion and a heat treated bacterin, according to
25 claim 2.
9. A vaccine according to claim 8 further comprising live viruses.
10. A vaccine according to claim 8 further comprising a lecithin preparation, Quil A, and cholesterol.
11. A vaccine according to claim 8 further comprising killed viruses.
- 30 12. A vaccine according to claim 9 further comprising killed viruses.
13. A vaccine according to claim 9 wherein the live viruses are one to three viruses selected from the group consisting of bovine rhinotracheitis (IBR) virus, parainfluenza 3 (PI3) virus, and bovine respiratory syncytial virus (BRSV).

14. A vaccine according to claim 12 wherein the live viruses are one to three viruses selected from the group consisting of bovine rhinotracheitis (IBR) virus, parainfluenza 3 (PI3) virus, and bovine respiratory syncytial virus (BRSV).
15. A vaccine according to claim 14 wherein the killed viruses are one or two viruses selected from the group consisting of Type 1 Bovine Viral Diarrhea (BVD), and Type 2 Bovine Viral Diarrhea (BVD).
16. A vaccine according to claim 15 further comprising a lecithin in oil preparation, Quil A, and cholesterol.
17. A method of preparing a heat treated bacterin, comprising heating a bacterin having lipase activity to a temperature of about 35 to about 80 °C for about 20 minutes to about 24 hours.
18. A method of preparing a heat treated bacterin, comprising
- a) measuring the lipase activity of the bacterin;
 - b) heating the bacterin to a temperature of about 35 to about 80 °C for about 20 minutes to about 24 hours;
 - c) measuring the lipase activity of the bacterin after heat treatment;
 - d) comparing the lipase activity of the bacterin before heating to the lipase activity of the bacterin after heating;
 - e) select a heat treated bacterin wherein the lipase activity after heat treatment is 50% or less of the lipase activity of the bacterin before heat treatment.
19. A method according to claim 17 wherein the bacterin comprises a suspension of one to five killed *Leptospira* species selected from the group consisting of *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyposa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, and *Leptospira pomona*.
20. A method according to claim 18 wherein the bacterin comprises a suspension of one to five killed *Leptospira* species selected from the group consisting of *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyposa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, and *Leptospira pomona*.
21. A heat treated bacterin prepared by:
- a) forming a bacterin having lipase activity;
 - b) heating the bacterin to a temperature of about 35 to about 80 °C for a period of time sufficient to reduce the lipase activity to a level of 50% or less than the level before the heat treatment.

22. A bacterin according to claim 21 wherein the period of time sufficient to reduce the lipase activity to a level of 50% or less than the level before the heat treatment is about 20 minutes to about 24 hours.

BACTERINAS TRATADAS CON CALOR, Y VACUNAS DE EMULSIÓN
PREPARADAS A PARTIR DE ESTAS BACTERINAS TRATADAS CON CALOR

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere, en general, al campo de las vacunas y a métodos para estabilizar vacunas de emulsión. En particular, esta invención se refiere a bacterinas tratadas con calor, a un método para producir bacterinas tratadas con calor y a vacunas de emulsión preparadas a partir de estas bacterinas tratadas con calor.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La vacunación se usa cada vez más para controlar las enfermedades infecciosas en animales. A menudo se usan adyuvantes en las vacunas debido a que pueden aumentar la respuesta inmune humoral y/o celular a un antígeno. Las vacunas a menudo se formulan como emulsiones porque la emulsión puede actuar como un adyuvante, y tiene la propiedad de retener el antígeno como un depósito en el sitio de inyección. En las vacunas de emulsión comúnmente se usan emulsionantes. Aparte de usar emulsionantes, la estabilidad de las vacunas de emulsión también puede conseguirse reduciendo el tamaño de las gotas de la emulsión por medios mecánicos.

20

La Patente de Estados Unidos N° 5.084.269 se refiere a una formulación adyuvante que contiene lecitina en combinación con aceite mineral, que produce menos irritación dentro del animal hospedador, y simultáneamente induce una mayor inmunidad sistémica. 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.

25

Generalmente, los antígenos bacterianos son inestables cuando se calientan e incluso una breve exposición a temperaturas elevadas puede reducir la actividad de los antígenos. Por ejemplo, las vacunas contra el ántrax actuales pueden perder toda la actividad biológica en 48 horas a 37°C (S. Sing, N. Ahuja, V. Chauhan, E. Rajasekaran, W. S. Mohsin, R. Bhat, y R. Bhatnagar; Bioche. Biophys. Res. Commun. 2002 Sep. 6; 295(5): 1058-62).

30

SUMARIO DE LA INVENCION

35 Esta invención se refiere a bacterinas tratadas con calor, a un método para

producir bacterinas tratadas con calor y a vacunas de emulsión preparadas a partir de estas bacterinas tratadas con calor. El método comprende calentar la bacterina a una temperatura de aproximadamente 35 a aproximadamente 80°C para formar una bacterina tratada con calor.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA

DEFINICIONES

Actividad antigénica aceptable – la expresión "actividad antigénica aceptable" significa la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora en
10 animales vacunados después de la exposición o pasando un ensayo de potencia codificado con organismos vivos homólogos.

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

Emulsionante – el término "emulsionante" significa una sustancia usada
15 para obtener una emulsión más estable.

Emulsión – el término "emulsión" significa una composición de dos líquidos inmiscibles en los que pequeñas gotas de un líquido se suspenden en una fase continua del otro líquido.

Bacterina tratada con calor – la expresión "bacterina tratada con calor"
20 significa una bacterina que se ha tratado con calor y que tiene una actividad lipasa de 50% o menor con respecto a la actividad lipasa antes del tratamiento con calor, y tiene actividad antigénica aceptable.

Emulsión invertida – la expresión "emulsión invertida" significa una emulsión de agua en aceite.

25 Lipasa – el término "lipasa" significa enzimas, esterasas, lipasas y fosfolipasas, que pueden producir la degradación de un emulsionante en una vacuna de emulsión.

Emulsión normal – la expresión "emulsión normal" significa una emulsión de aceite en agua.

30 Emulsión de aceite en agua – la expresión "emulsión de aceite en agua" significa una emulsión en la que pequeñas gotas de aceite están suspendidas en una fase acuosa continua.

Temperatura ambiente – la expresión "temperatura ambiente" significa una temperatura de 18 a 25°C.

35 Emulsión de agua en aceite – la expresión "emulsión de agua en aceite"

significa una emulsión en la que gotas de agua están suspendidas en una fase oleosa continua.

DESCRIPCIÓN

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

La lipasa, que puede degradar los emulsionantes usados para crear la emulsión, y de esta manera producir inestabilidad y ruptura de la emulsión, puede incluir una o más enzimas de ruptura de la emulsión tales como esterasas, lipasas y fosfolipasas. Colectivamente, estas enzimas esterasas, lipasas y fosfolipasas reciben en nombre de lipasa. La actividad lipasa de una bacterina puede medirse usando un sustrato sintético denominado O-pivaloiloximetil umbeliferona (C-POM). La velocidad de hidrólisis producida por la lipasa es la medida de la actividad lipasa. La velocidad de reacción de la hidrólisis producida 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 exactas del ensayo de hidrólisis elegidas, de forma que las comparaciones de los niveles de actividad lipasa, medidos por las velocidades de hidrólisis, deben realizarse usando datos producidos por las mismas condiciones de ensayo. Se describen métodos bibliográficos en varios artículos, incluyendo Kurioka S., y Matsuda M. (1976) *Ana. Biochem.* 75: 281-289, De Silva NS, y Quinn PA.(1987) *J. Clin. Microbiol.* 25: 729-731, y Grau, A., y Ortiz, A. (1998) *Chem. Phys. of Lipids.* 91: 109-118.

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

A menudo se introducen virus vivos atenuados en las vacunas junto con las bacterinas. Estas vacunas son útiles porque puede usarse una sola vacuna para crear inmunidad a diferentes enfermedades con una vacuna. Si en la bacterina está presente la actividad lipasa, producirá la liberación del emulsionante de la emulsión. Este emulsionante libre puede romper e inactivar los virus de vacuna vivos, ocasionando de esta manera una pérdida de infectividad viral.

Una bacterina útil en vacunas puede formarse cultivando la bacteria de interés y después destruyendo la bacteria para producir una bacterina que contiene una diversidad de componentes bacterianos, incluyendo componentes de la pared celular. La bacteria puede destruirse por una diversidad de métodos que incluyen su exposición a un compuesto tal como mertiolato, formalina, formaldehído, dietilamina, etilenamina binaria (BEI), beta propiolactona (BPL) y glutaraldehído. Pueden usarse combinaciones de estos compuestos. Además, es posible destruir

las bacterias con radiación de esterilización.

Ahora se ha descubierto que la actividad lipasa de una bacterina que tiene esta actividad lipasa puede reducirse por tratamiento con calor. Específicamente, la actividad lipasa de una bacterina puede reducirse calentando la bacterina a una temperatura de aproximadamente 35 a aproximadamente 80°C para formar una bacterina tratada con calor, que tiene una actividad antigénica aceptable. El tratamiento con calor se realiza durante un periodo de tiempo suficiente para que la actividad lipasa de la bacterina tratada con calor sea 50% o menor con respecto a la encontrada en la bacterina antes del tratamiento con calor. Para conseguir una buena estabilidad en una vacuna de emulsión, no es necesario que la actividad lipasa se reduzca a cero. Se ha descubierto que pueden prepararse vacunas con una buena vida útil a partir de bacterinas tratadas con calor que tienen un nivel de actividad lipasa que es 50% o menor con respecto al nivel de actividad lipasa antes del tratamiento con calor.

Cuando se ha usado una velocidad de hidrólisis de un sustrato de ensayo como medida de la actividad lipasa de una bacterina, la velocidad de hidrólisis del sustrato de ensayo antes del tratamiento con calor se compara con la velocidad de hidrólisis después del tratamiento con calor. El tratamiento con calor se realiza para reducir la velocidad de hidrólisis a 50% o menos con respecto a la velocidad de hidrólisis que se observa para la bacterina sin tratamiento.

El método exacto para medir el nivel de actividad lipasa no es crítico siempre que se use el mismo método para medir la actividad antes del tratamiento con calor y la actividad después del tratamiento con calor. Por ejemplo, si la velocidad de hidrólisis de un sustrato de ensayo se mide usando un sustrato, un sustrato diferente produciría 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 mostrarán el efecto del tratamiento con calor.

Para las bacterinas que comprenden uno o más de los siguientes *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippityphosa* o *Leptospira pomona*, hay un ensayo codificado para la actividad antigénica (9CFR §113.101, §113.102, §113.103, §113.104 y §113.105). Para estas especies, una actividad antigénica aceptable se define como la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora en hámsters vacunados de tal forma que cuando los hámsters se exponen a bacterias vivas homólogas, al menos 75% de los hámsters vacunados

sobrevivan en un modelo en el que al menos 80% de los hámsters no vacunados no sobreviven. En caso del antígeno *Leptospira hardjo*, una actividad antigénica aceptable se define como la capacidad de una vacuna de inducir una titulación media geométrica de aglutinación serológica contra *Leptospira hardjo* de ≥ 40 en
5 terneros que se han vacunado con una vacuna que comprende el antígeno bacteriano, *Leptospira hardjo*. Para otras bacterinas, una actividad antigénica aceptable se define como la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora en animales vacunados después de la exposición o pasando un ensayo de potencia codificado con un organismo vivo homólogo.

10 El tratamiento con calor puede realizarse en un intervalo de temperaturas, y durante un periodo de tiempo variable. Generalmente, el calentamiento puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 35 a aproximadamente 80°C durante un periodo de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 24 horas. Cuando la bacterina se calienta a una temperatura superior, tal como de
15 aproximadamente 75 a aproximadamente 80°C, el tiempo de calentamiento está en el extremo inferior del intervalo de tiempo. Cuando el calentamiento se realiza a una temperatura inferior, el calentamiento se realiza durante un periodo de tiempo mayor. Otra combinación de temperatura y tiempo es el calentamiento a una temperatura de aproximadamente 60 a aproximadamente 70°C durante un periodo
20 de aproximadamente 9 a aproximadamente 10 horas. Otra combinación de temperatura y tiempo es el calentamiento a una temperatura de aproximadamente 65 a aproximadamente 70°C durante un periodo de 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
25 durante aproximadamente una hora. Otra combinación de temperatura y tiempo es el calentamiento a una temperatura de aproximadamente 55 a aproximadamente 65°C durante un periodo de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 horas.

Las bacterinas, después del tratamiento con calor, tienen una actividad lipasa menor que las bacterinas recién preparadas, pero por lo demás pueden
30 formularse de la misma manera que las bacterinas recién preparadas. Por consiguiente, las bacterinas tratadas con calor pueden incorporarse en vacunas por métodos habituales de producción de vacunas. Estos métodos son bien conocidos en la técnica.

Pueden formarse vacunas de emulsión combinando la bacterina deseada
35 con una fase oleosa y uno o más emulsionantes. La combinación después se

somete a agitación intensa para formar una emulsión. Los métodos de agitación adecuados incluyen homogeneización y posteriormente microfluidización. También pueden incluirse conservantes y excipientes en la combinación antes de la emulsión.

5 Las vacunas pueden incluir tanto bacterinas como antígenos virales. Para preparar una vacuna que incluye bacterinas y antígenos virales, las bacterinas, cualquier antígeno viral que se vaya a incluir, el emulsionante o los 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
10 puede ajustarse a un pH apropiado usando soluciones de NaOH o HCl. Para el uso en vacunas, generalmente es deseable que el pH esté próximo al neutro para evitar la irritación en el sitio de inyección. Es común un valor de pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,3.

Las fases oleosas adecuadas para la formación de vacunas de emulsión
15 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.

Son ejemplos de emulsionantes que pueden usarse en la preparación de
20 vacunas de emulsión de esta invención fosfolípidos, ésteres de sorbitano, ésteres de sorbitano polietoxilados y derivados de manitol que son emulsionantes de vacuna comunes. Los emulsionantes fosfolípidos incluyen lecitina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y lecitina, (por ejemplo, tal como AMPHIGEN®). Los emulsionantes de éster de sorbitano incluyen monolaurato
25 de sorbitano, (por ejemplo, Span® 20 y Arlacel® 20), monooleato de sorbitano (por ejemplo, Span® 80 y Arlacel® 80), monopalmitato de sorbitano (por ejemplo, Span® 40 y Arlacel® 40) y monoestearato de sorbitano (por ejemplo, Span® 60 y Arlacel® 60). Los ésteres de sorbitano polietoxilados incluyen monolaurato de polietoxi sorbitano (por ejemplo Tween® 20 y Tween® 21), monooleato de polietoxi sorbitano
30 (por ejemplo, Tween® 80), monopalmitato de polietoxi sorbitano (por ejemplo, Tween® 40) y monoestearato de polietoxi sorbitano (por ejemplo, Tween® 60). Los emulsionantes que son 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. En general, las vacunas se
35 formulan como emulsiones normales de aceite en agua, aunque es posible preparar

emulsiones invertidas de agua en aceite.

En las vacunas puede usarse una diversidad de adyuvantes tales como Quil A, colesterol, fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio, y conservantes tales como mertiolato. Quil A es una mezcla purificada de saponinas de quillaja extraídas a partir de la corteza del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina. Quil A actúa directamente sobre el sistema inmune activando un estado de sensibilidad generalizado. Al hacer esto, induce tanto una respuesta humoral como una respuesta mediada por células. La cadena lipófila permite la interacción del antígeno y el adyuvante a administrar en el citosol para el procesamiento en una ruta endógena. Quil A a menudo se usa con colesterol porque el colesterol elimina los efectos secundarios menos deseables cuando se añade en las proporciones apropiadas. El colesterol forma complejos insolubles con Quil A formando estructuras de tipo helicoidal cuando el colesterol se une a Quil A, exponiendo de esta manera las unidades de azúcar de la molécula que ayudan a estimular la respuesta inmune.

Es común añadir antígenos virales a vacunas que contienen bacterinas. Una ventaja de esta estrategia es que una vacuna puede usarse para crear inmunidad contra varias enfermedades en lugar de requerir dosificaciones de varias vacunas diferentes para conseguir el mismo resultado. En las vacunas pueden usarse tanto virus muertos como virus vivos atenuados. Entre los virus que pueden usarse se encuentran los herpesvirus aviáres, herpesvirus bovinos, herpesvirus caninos, herpesvirus equinos, virus de la rinotraqueítis viral felina, virus de la enfermedad de Marek, herpesvirus ovinos, herpesvirus porcinos, virus de la pseudorabia, paramixovirus aviáres, virus sincitial respiratorio bovino, virus del moquillo canino, parainfluenzavirus canino, parainfluenza 3 bovino, parainfluenza 3 ovino, Rinderpest virus, virus de la enfermedad de Border, virus de la diarrea viral bovina (BVD), virus de la fiebre porcina clásica, virus de la leucosis aviar, virus de la inmunodeficiencia bovina, virus de la leucemia bovina, virus de la anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia felina, virus de la leucemia felina, virus de la neumonía progresiva ovina, virus de adenocarcinoma pulmonar ovino, coronavirus canino, coronavirus bovino, coronavirus entérico felino, virus de la peritonitis infecciosa felina, virus de la diarrea epidémica porcina, virus de la encefalomiелitis de hemaglutinación porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, coronavirus de pavo, virus de la fiebre efímera bovina, rabia, virus de la estomatitis vesicular, influenza aviar, influenzavirus equino, influenzavirus

porcino, influenzavirus canino, virus de la encefalitis equina oriental (EEE), virus de la encefalitis equina venezolana y virus de la encefalitis equina occidental.

Si en la bacterina está presente la actividad lipasa, puede provocar la liberación del emulsionante de la emulsión. Este emulsionante libre puede romper la
5 envuelta del virus vivo e inactivar los virus vivos de la vacuna conduciendo de esta manera a una pérdida de infectividad viral. Por consiguiente, el tratamiento con calor de la bacterina sirve para estabilizar la emulsión y conservar su efecto adyuvante, así como para conservar la infectividad viral de los virus.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente y no
10 pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada.

PROCEDIMIENTOS

Procedimiento 1 Determinación de Turbidez

La turbidez se determina en unidades nefelométricas (NU) por un método de
15 dispersión de 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 referencia convencional. Cuanto mayor es la intensidad de la luz dispersada, mayor es la turbidez de la muestra. Se dirige una fuente de luz a la muestra y la dispersión de la luz se mide a 90° con respecto a la dirección de la fuente luminosa. El
20 instrumento se calibra midiendo la dispersión de la luz desde una suspensión de formazina.

Calibración del Instrumento Nefelómetro

Se prepara agua ultrafiltrada filtrando agua destilada a través de un filtro de membrana que tiene un tamaño de poros de 0,2 μm . Se prepara una primera
25 solución disolviendo 1,00 g de sulfato de hidrazina, $(\text{NH}_2)_2 \text{H}_2\text{SO}_4$, en agua ultrafiltrada y se diluye con agua ultrafiltrada hasta 100 ml, en un matraz aforado. Se prepara una segunda solución disolviendo 10,00 g de hexametilentetramina en agua ultrafiltrada y se diluye con agua ultrafiltrada hasta 100 ml, en un matraz aforado. Se prepara una suspensión de formazina mezclando 5,0 ml de la primera
30 solución con 5,0 ml de la segunda solución. La mezcla se deja en reposo durante 24 horas a aproximadamente 24°C. La mezcla se diluye hasta 100 ml con agua ultrafiltrada para formar una suspensión madre de turbidez con una turbidez de 400 NU. Se prepara una suspensión de turbidez de formazina de 40 NU diluyendo 10,00 ml de la suspensión madre de turbidez hasta 100 ml con agua ultrafiltrada. Se
35 preparan soluciones de calibración adicionales diluyendo la solución madre.

Medición de Turbidez

La muestra a medir se diluye con agua ultrafiltrada de manera que la turbidez esté dentro del intervalo calibrado del nefelómetro. Se mide la turbidez y la
5 turbidez original se calcula usando la siguiente ecuación:

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

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

D es el volumen de agua de dilución, en ml

O es el volumen de la muestra original, en ml.

10

Procedimiento 2 Análisis de Lipasa

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

Se prepararon soluciones de O-pivaloximetilumbeliferona (Molecular Probes, nº de producto P35901) en DMSO puro, a una concentración de solución madre de
20 5 mM; la solución no usada se almacenó a -20°C, protegida de la luz. La solución de O-pivaloximetilumbeliferona 5 mM se diluyó a 750 µM usando tampón TRIS-HCl 58 mM (pH 8,0), y la solución resultante se precalentó a 37°C. La muestra de *Leptospira* o el tampón/medio de control se centrifugó durante 10 minutos a temperatura ambiente a 6500 veces la fuerza de la gravedad para formar un
25 sedimento y un sobrenadante. Las reacciones se realizaron combinando 15 µl de tampón TRIS-HCl 100 mM (pH 8,0) con 15 µl del sobrenadante a temperatura ambiente de la muestra de *Leptospira* o el tampón/medio de control, en pocillos de ensayo de placas de 96 pocillos de bajo volumen (Corning 3393, superficie sin unión de poliestireno negro, semiárea); preincubando durante 10 minutos a 37°C; y
30 después iniciando la reacción por 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 durante un periodo de una hora (Spectramax Gemini XS, 37°C, $\lambda_{ex} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm,

sensibilidad PMT 'media', 6 lecturas por pocillo). La velocidad de reacción se determinó a partir de la pendiente de la curva de progreso resultante.

EJEMPLOS

5 Ejemplo 1 Reducción de Actividad Lipasa por Tratamiento con Calor

Se preparó un conjunto de leptospira inactivada con mertiolato que contenía las siguientes especies *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo* y *Leptospira pomona* para formar una bacterina. Se almacenaron durante una noche seis muestras de la bacterina
10 (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 control no tratado. Las muestras almacenadas durante 12 horas a 37°C, 45°C, 56°C, 65°C y 80°C eran muestras tratadas con calor. Después del almacenamiento, la velocidad a la que se hidrolizó un sustrato de ensayo en presencia de cada bacterina se midió de acuerdo con el método del
15 Procedimiento 2. La velocidad de hidrólisis para una muestra dividida por la velocidad de hidrólisis de la muestra almacenada a 4°C multiplicado por 100 es el porcentaje de la actividad lipasa original de cada bacterina que queda después del almacenamiento. El siguiente diagrama muestra la temperatura de almacenamiento y el porcentaje de actividad lipasa original que queda después del almacenamiento.

20

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%

Ejemplo 2 Preparación de Formulaciones de Vacuna Experimentales

Se realizaron cultivos de *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo* y *Leptospira pomona*. La turbidez de cada cultivo se midió en unidades nefelométricas (NU). Las
25 bacterias se inactivaron con mertiolato para formar bacterinas. Cada bacterina se trató con calor a 65°C durante 8 horas para reducir la actividad lipasa. Las bacterinas se combinaron y después se mezclaron con AMPHIGEN®, adyuvantes, conservantes y tampón de dilución de forma que cada dosis de 5 ml de la vacuna

contenía los componentes indicados en el siguiente diagrama.

Concentraciones de Antígenos

Componente	Concentración de Componente/Dosis
L. canicola	1200 NU/dosis de 5 ml
L. icterohaemorrhagiae	1200 NU/dosis de 5 ml
L. grippotyphosa	1200 NU/dosis de 5 ml
L. hardjo	2400 NU/dosis de 5 ml
L. pomona	1200 NU/dosis de 5 ml

- 5 La formulación se homogeneizó usando un homogeneizador Silverson y se microfluidizó usando un microfluidizador de Microfluidics. Después de la homogeneización y de la microfluidización, el pH de la formulación se ajustó a un valor de 7,0 a 7,3.

10 **Ejemplo 3 Ensayo de Potencia en Hámsters y Vacas**

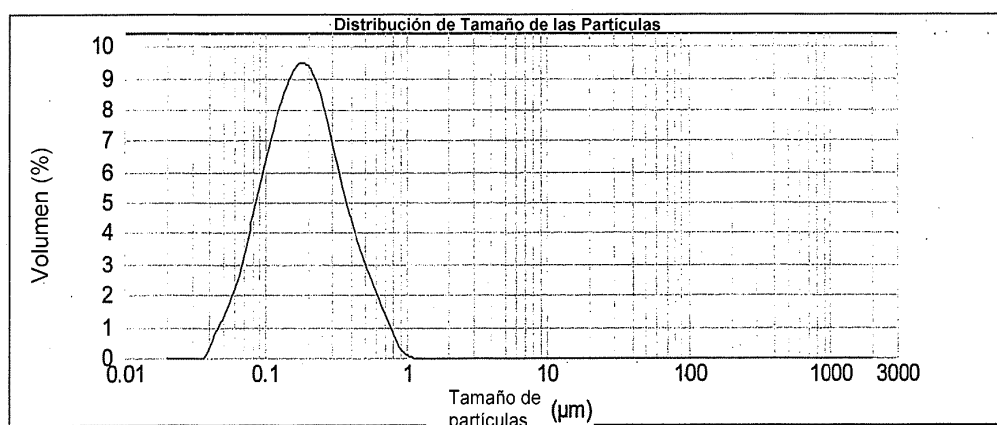
- La vacuna del Ejemplo 2 se administró a hámsters y vacas para ensayar la potencia usando modelos de animales hospedadores y de laboratorio convencionales. Los hámsters de ensayo después se expusieron a una dosis de *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa* o
- 15 *Leptospira Pomona* para ensayar la potencia de las vacunas. El número de supervivientes se midió como una demostración de la eficacia. Se midieron titulaciones de aglutinación microscópica bovina contra *Leptospira hardjo* para demostrar la potencia de esa fracción de la vacuna en vacas. La tabla presentada a continuación demuestra que las vacunas preparadas a partir de bacterinas de
- 20 *Leptospira* tratadas con calor pueden producir una respuesta antigénica que pasa los criterios de eficacia.

Acondicionamiento Térmico de <i>Leptospira</i>	HÁMSTERS SUPERVIVIENTES				SEROLOGÍA BOVINA
	Canicola	Icteero	Grippo	Pomona	Hardjo
65°C (8 horas)	10/10	10/10	10/10	10/10	Pasa
No tratado	10/10	10/10	10/10	10/10	Pasa

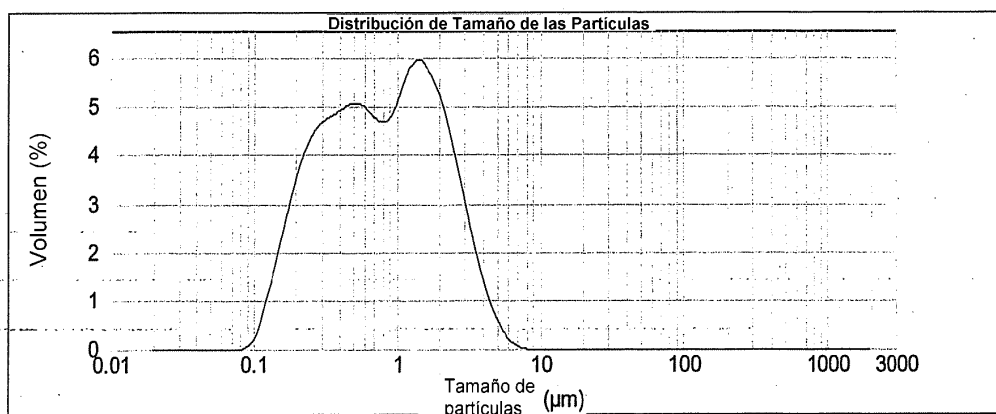
Ejemplo 4 Ensayo Fisicoquímico de Vacunas

Se preparó una vacuna a partir de bacterinas de *Leptospira* tratadas con calor de acuerdo con el método del Ejemplo 2. Se preparó una vacuna similar a partir de bacterinas de *Leptospira* no tratadas con calor de acuerdo con el método del Ejemplo 2. Las dos formulaciones de vacuna se almacenaron a 4°C durante 60 días. Se realizó un análisis del tamaño de las partículas para cada vacuna recién preparada el día 0 y de nuevo a los 60 días usando un difractómetro láser.

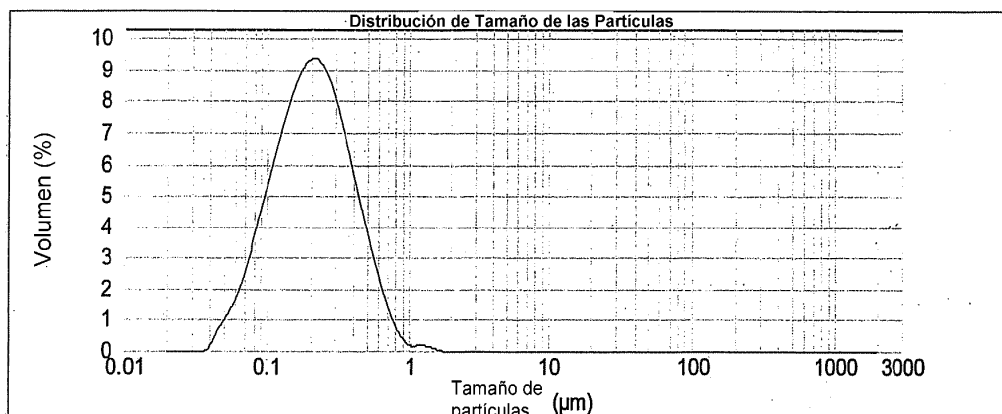
Los diagramas presentados a continuación muestran distribuciones de tamaños de las partículas para cada vacuna el día 0 antes y después del almacenamiento durante 60 días.



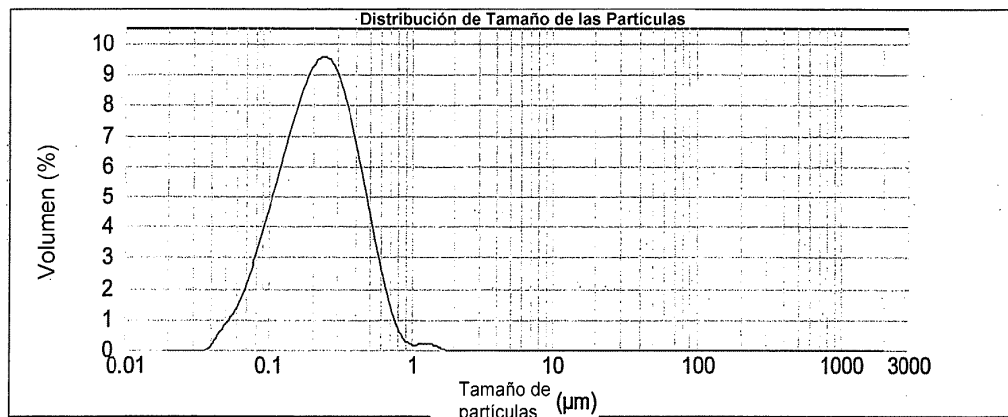
Análisis del tamaño de las partículas de vacunas recién preparadas que contenían bacterinas de *Leptospira* no tratadas con calor el día 0



Análisis del tamaño de las partículas de vacunas que contenían bacterinas de *Leptospira* no tratadas con calor el día 60



Análisis del tamaño de las partículas de vacunas recién preparadas que contenían bacterinas de *Leptospira* tratadas con calor el día 0



5 Análisis del tamaño de las partículas de vacunas que contenían bacterinas de *Leptospira* tratadas con calor el día 60

La vacuna preparada a partir de bacterinas de *Leptospira* tratadas con calor muestra una retención del tamaño de las partículas que indica estabilidad de la emulsión. La vacuna preparada a partir de bacterinas de *Leptospira* no tratadas con calor muestra un aumento del tamaño de las partículas que indica ruptura de la emulsión.

Ejemplo 5 Ensayo Viricida

15 Siguiendo el método del Ejemplo 2, se prepararon vacunas a partir de bacterinas de *Leptospira* no tratadas con calor y bacterinas de *Leptospira* tratadas con calor. Después de 5 a 6 meses de maduración, las vacunas se ensayaron con respecto a la actividad viricida contra virus BHV-1, virus PI3 y virus BRSV. El ensayo de la actividad viricida se realizó rehidratando controles de ensayo viricida

(VAC) monovalentes, con el diluyente con adyuvante a ensayar. A cada volumen de dosificación se rehidrataron dos controles de ensayo viricida monovalentes. Los dos VAC monovalentes rehidratados se reunieron e incubaron a 20-25°C durante dos horas antes de la titulación e inoculación en células para determinar, por medio de la TCID₅₀ (dosis infecciosa de cultivo tisular de 50%), la titulación de virus vivos. No es satisfactorio tener una pérdida de titulación viral mayor de 0,7 TCID₅₀/ml.

En la siguiente tabla se indican los resultados de los ensayos viricidas que muestran una pérdida de titulación viral:

Acondicionamiento Térmico de Leptospira	Pérdida de Titulación Viral (TCID ₅₀)		
	BHV-1	PI3	BRSV
8 horas a 65 °C	0,1	0,0	0,4
No tratado	1,0	≥1,2	≥1,3

10

La vacuna realizada con bacterinas de Leptospira no tratadas con calor muestra altos niveles de actividad viricida. La vacuna preparada con bacterinas de Leptospira tratadas con calor no era viricida.

RESUMEN

Se describen bacterinas tratadas con calor, un método para producir bacterinas tratadas con calor y vacunas de emulsión preparadas a partir de estas bacterinas tratadas con calor.

CAPITULO REIVINDICATORIO

Solicitud Divisional A

1. Una vacuna en emulsión que comprende:
 - a. Una emulsión que comprende un aceite seleccionado a partir del grupo que consiste en aceites minerales, aceites vegetales, aceites de pescado y glicéridos sintéticos de ácidos grasos; y uno o más emulsificantes seleccionados a partir del grupo que consiste en fosfolípidos, esteres de sorbitán, esteres de sorbitán polietoxilado y derivados del manitol; y
 - b. Una suspensión de bacterina de *Leptospira* que comprende bacterias *Leptospira* seleccionadas a partir del grupo que consiste en: *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira Pomona* y combinaciones de las mismas, en donde la bacterina de *Leptospira* ha sido previamente calentada a una temperatura de 55 a 70°C durante 5 a 10 horas, o a una temperatura de 65 a 70°C durante una hora.
2. Una vacuna en emulsión de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde dicha bacterina de *Leptospira* tratada con calor es preparada mediante un método de producción que comprende calentar la bacterina a 60-70°C durante 9-10 horas o calentar la bacterina a 65-70°C durante 5-8 horas.
3. Una vacuna en emulsión de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 ó 2, que además comprende virus vivos.
4. Una vacuna en emulsión de acuerdo con la Reivindicación 3, en donde los virus vivos son de uno a tres virus seleccionados del grupo que consiste en *virus de rinotraqueitis bovina* (IBR), *virus de parainfluenza 3* (PI3) y *virus respiratorio sincital bovino* (BRSV).
5. Una vacuna en emulsión de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, que además comprende virus muertos.
6. Una vacuna en emulsión de acuerdo con la Reivindicación 5, en donde los virus muertos son una ó dos virus seleccionados del grupo que consiste en *diarrea bovina viral tipo 1* (BVD) y *diarrea bovina viral tipo 2* (BVD).
7. Una vacuna en emulsión de acuerdo con la Reivindicación 1, que además comprende una preparación de lecitina, Quil A (mezcla purificada de extracto de saponinas de quillaja) y colesterol.

8. Un método para la preparación de la bacterina de *Leptospira* tratada con calor de la vacuna en emulsión de la Reivindicación 1, que comprende los pasos de:

- a. medir la actividad lipasa de la bacterina;
- b. calentar la bacterina a una temperatura de 55°C a 70°C durante 5 a 10 horas, ó a una temperatura de 65°C a 70°C durante 1 hora;
- c. medir la actividad lipasa de la bacterina después del tratamiento con calor;
- d. comparar la actividad lipasa de la bacterina antes del calentamiento con la actividad lipasa de la bacterina después del calentamiento; y
- e. seleccionar la bacterina tratada con calor, en donde la actividad lipasa después del tratamiento con calor sea del 50% o menos que la actividad lipasa de la bacterina antes del tratamiento con calor.

9. Un método de acuerdo con la Reivindicación 8, en donde la bacterina es calentada a una temperatura de 60 a 70°C durante 9 a 10 horas, o a una temperatura de 65 a 70°C durante 5 a 8 horas.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 March 2008 (20.03.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/032158 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01) **A61K 39/02** (2006.01)

(74) Agent: **FULLER, Grover, F., Jr.**; Pfizer Inc., 150 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US).

(21) International Application Number:
PCT/IB2007/002553

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 30 August 2007 (30.08.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/843,665 11 September 2006 (11.09.2006) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): **PFIZER PRODUCTS INC.** [US/US]; Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **GOODYEAR, Mark Davis** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US). **HUETHER, Michael John** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 601 West Cornhusker Highway, Lincoln, Nebraska 68521 (US). **MANNAN, Ramasamy Mannar** [US/US]; 392 Kildeer Lane, Deerfield, IL 60015 (US). **OIEN, Nancee Lois** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
3 July 2008

(54) Title: HEAT TREATED BACTERINS, AND EMULSION VACCINES PREPARED FROM SUCH HEAT TREATED BACTERINS

(57) Abstract: Heat treated bacterins, a method of producing heat treated bacterins, and emulsion vaccines prepared from such heat treated bacterins are disclosed.



WO 2008/032158 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/002553

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00 A61K39/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZEIGLER J A ET AL: "Immunization against leptospirosis: vaccine trials with heat-killed whole cell and outer envelope antigens in hamsters." BULLETIN OF THE PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION 1976, vol. 10, no. 2, 1976, pages 126-130, XP008089205 ISSN: 0085-4638 page 126, right-hand column, last paragraph - page 127, left-hand column, paragraph TOP page 127, right-hand column, line 10 - line 13 ----- -/--	1-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 March 2008

Date of mailing of the international search report

03/04/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mata Vicente, Teresa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/002553

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TYLER J W ET AL: "Humoral response in neonatal calves following immunization with Escherichia coli (strain J5): the effects of adjuvant, age and colostral passive interference." VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY DEC 1989, vol. 23, no. 3-4, December 1989 (1989-12), pages 333-344, XP002471639 ISSN: 0165-2427 abstract	1-22
X	----- BURNS KAREN E ET AL: "Evaluation of the effect of heating an oil-emulsion Pasteurella multocida bacterin on tissue reaction and immunity." AVIAN DISEASES 2003 JAN-MAR, vol. 47, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 54-58, XP008089224 ISSN: 0005-2086 abstract	1-22
A	----- DE 37 21 169 A1 (LION CORP [JP]) 14 January 1988 (1988-01-14) page 3, line 62 - line 64; table I -----	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2007/002553

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 3721169	A1	14-01-1988	NONE
