

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 430**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/295** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/04** (2006.01)  
**C12N 7/00** (2006.01)  
**A61K 39/02** (2006.01)  
**A61K 39/112** (2006.01)  
**A61K 39/102** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2013 PCT/JP2013/054038**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13140919**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2013 E 13763687 (4)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2829281**

54 Título: **Vacuna de LPS**

30 Prioridad:

**22.03.2012 JP 2012065162**

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

**09.04.2019**

73 Titular/es:

**KM BIOLOGICS CO., LTD. (100.0%)  
 1-6-1 Okubo, Kita-ku, Kumamoto-shi  
 Kumamoto 860-8568, JP**

72 Inventor/es:

**SAKAMOTO, RYUICHI y  
 SAKAGUCHI, MASASHI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 708 430 T3

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

## DESCRIPCIÓN

## Vacuna de LPS

## 5 Campo técnico

La presente invención proporciona una nueva vacuna útil para prevenir enfermedades infecciosas causadas por *Salmonella* en las aves. Específicamente, la presente invención se refiere a un método para inmunizar aves utilizando como antígeno protector una estructura que contiene antígeno O, siempre que dicha estructura no contenga una célula completa, en donde dicha estructura contiene el Lípido A (p. ej., lipopolisacárido) derivado de *Salmonella*.

## Técnica anterior

15 Las bacterias tienen una afinidad por el colorante diferente dependiendo de las diferentes composiciones de la pared celular cuando se someten a prueba con tinción Gram y se dividen en dos grupos principales de bacterias Gram negativas y Gram positivas en función de las diferencias en su afinidad por el colorante. En el caso de las bacterias Gram negativas, la pared celular consiste en una membrana externa y una capa de peptidoglicano en el interior de la membrana externa. La membrana externa consiste en fosfolípidos, lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas y proteínas de membrana. Una estructura de membrana unitaria de la membrana externa consiste en fosfolípidos y lipopolisacáridos. Un lipopolisacárido se encuentra en una capa externa de la membrana y un fosfolípido en una capa interna de la misma. Un lipopolisacárido consiste en un lípido de elevado peso molecular, llamado lípido A, y un polisacárido unido a él. El lípido A forma una capa externa de la membrana externa, mientras que el polisacárido se extiende hacia afuera desde la membrana externa. Los tipos de sacáridos difieren entre sí entre la porción externa y la porción en las proximidades del Lípido A. La porción externa se denomina polisacárido de cadena lateral O (antígeno O) y la porción interna se denomina polisacárido central. El sacárido que consiste en antígeno O es principalmente una hexosa y una pentosa y una estructura alcalina que consiste en 3 a 5 tipos de estos sacáridos aparecen repetidamente. En el polisacárido central están presentes, además de estos sacáridos, sacáridos exclusivos de las bacterias respectivas, tales como una octosa, p. ej., cetodesoxioctonato, y una heptosa. El lípido A es un lípido exclusivo de las bacterias respectivas que comprende un sacárido, es decir, dos moléculas de glucosamina que están unidas entre sí mediante enlaces  $\beta$ -1,6, y un ácido fosfórico y un ácido graso unidos a Dicho sacárido. El lípido A está unido a un polisacárido central en la posición 6' del sacárido.

Hay muchos tipos de bacterias Gram negativas. *Salmonella* y *E. coli*, que pertenecen a *Enterobacteriaceae*, y *Haemophilus*, que pertenece a *Pasteurella*, también se incluyen en las bacterias Gram negativas.

*Salmonella*, un bacilo grande secundario con flagelos peritricos se divide en grupos atendiendo al tipo de antígeno O y se subdivide adicionalmente atendiendo a los tipos de antígeno H, dando como resultado más de 2.000 clases de serotipos. La gama de anfitriones de *Salmonella* es bastante amplia y se sabe que una gran variedad de mamíferos, incluidos los seres humanos y las aves, son infectados con o albergan *Salmonella*. Cuando los pollos son infectados, la *Salmonella* puede causar enfermedades sépticas en los pollos jóvenes. Sin embargo, en el caso de los pollos adultos, los pollos portadores son asintomáticos escapando del sacrificio y, como resultado, la carne de pollo y los huevos derivados de pollos contaminados con *Salmonella* son distribuidos induciendo la intoxicación alimentaria en seres humanos a través de productos alimenticios manufacturados de ese modo.

La intoxicación alimentaria por *Salmonella* se desarrolla después de un período de latencia de 12 a 48 horas tras la ingestión de alimentos contaminados. El período de latencia puede variar dependiendo de la cantidad de bacterias ingeridas, el estado y la edad de los pacientes. Los síntomas son principalmente gastroenteritis aguda y los síntomas cardinales son diarrea, dolor abdominal, vómitos y fiebre. Por lo tanto, una vacuna contra la salmonela para pollos no evita el inicio de la enfermedad en los pollos, pero es una vacuna importante utilizada para la salud pública.

Entre las vacunas convencionales contra *Salmonella* se encuentra una vacuna de células completas que comprende células inactivadas de *Salmonella*. Tales vacunas de células completas se describen, por ejemplo, en la Referencia relacionada con patentes 4. Sin embargo, una vacuna de células completas puede causar efectos secundarios, ya que contiene porciones que no tienen antigenicidad. En el caso de los pollos que se crían en bandadas, en vista del ahorro de mano de obra de la vacunación, existe una gran demanda de una vacuna multivalente que pueda prevenir muchas enfermedades con una sola inyección. Además, una vacuna multivalente puede contribuir a la reducción del estrés en los pollos, ya que reduce el número de inyecciones. Sin embargo, aunque una vacuna multivalente es muy conveniente, es probable que cause una reacción a la vacunación en el lugar de la inyección, en particular, cuando contiene bacterias tales como *Salmonella*.

En estas circunstancias, la investigación de una vacuna de componentes contra *Salmonella* se ha llevado a cabo, en la cual se estudia la aplicación de un lipopolisacárido (antígeno O). Por ejemplo, existe un informe de que un

producto conjugado que consiste en antígeno O derivado de *Salmonella typhimurium* unido a una proteína portadora se ha administrado a ratones para confirmar su eficacia (Referencia no relacionada con patentes 1). También existe un informe de que un lipopolisacárido derivado de *Salmonella Typhi* se ha administra a ratones para confirmar su eficacia (Referencia relacionada con patentes 1). Además de *Salmonella*, existe un informe de que un lipopolisacárido derivado de *Burkholderia thailandensis* o *Burkholderia pseudomallei* se ha administrado a ratones para confirmar su eficacia (Referencia relacionada con patentes 2, Referencia no relacionada con patentes 2).

Sin embargo, la contaminación de un lipopolisacárido se evita con cuidado meticuloso en un medicamento utilizado para un organismo vivo, ya que un lipopolisacárido puede causar clínicamente una variedad de enfermedades altamente letales como choque séptico, coagulación intravascular diseminada (CID) y fallo multiorgánico (FMO) y se puede convertir en un factor causal de fiebre incluso en una pequeña cantidad (Referencia no relacionada con patentes 3). En la práctica, se informa de que más de 90% de los ratones mueren en un plazo de 72 horas cuando se les administra un lipopolisacárido (Referencia relacionada con patentes 3). En estas circunstancias, la idea de utilizar un lipopolisacárido per se como antígeno de vacuna generalmente no surgiría.

Referencias relacionadas con patentes

Referencia relacionada con patentes 1: WO2004/052394  
Referencia relacionada con patentes 2: WO2010/082020  
Referencia relacionada con patentes 3: Publicación de Patente Japonesa Núm.2001-26602  
Referencia relacionada con patentes 4: WO00/04920

Referencias no relacionadas con patentes

Referencia no relacionada con patentes 1: Infecc. Immun, 60, pág. 4679-4686, 1992  
Referencia no relacionada con patentes 2: Vaccine, 28, pág. 7551-7555, 2010  
Referencia no relacionada con patentes 3: Bull. Natl. Inst. Health Sci., 126, pág. 19-33, 2008  
Referencia no relacionada con patentes 4: AVIAN DISEASES, 53, pág. 281-286, 2009

### Descripción de la invención

(Problema técnico a resolver por la invención)

La presente invención pretende hacer posible producir una vacuna multivalente y una vacuna mixta para una vacuna contra *Salmonella* y a reducir la reacción frente a la inoculación.

(Medios para resolver los problemas)

Los autores de la presente invención han estudiado seriamente los problemas mencionados anteriormente y, como resultado, han encontrado que la inflamación en el lugar de la inyección se restringe inesperadamente cuando se administra a las aves una vacuna que comprende como ingrediente activo una estructura que contiene antígeno O (p. ej., lipopolisacárido) derivado de bacterias Gram negativas. A saber, una estructura que contiene antígeno O se libera de las células contenidas en el cultivo de *Salmonella*, p. ej. mediante tratamiento con ultrasonidos o fenol, y a continuación se recoge con una columna a la que se adhiere dicha estructura. Después se prepara una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo la estructura antes mencionada mediante una etapa de emulsificación, si es necesario. Los autores de la presente invención han descubierto que la composición de vacuna así preparada puede conferir inmunización contra *Salmonella* a las aves (p. ej., pollo) cuando se inmunizan con ella sin efectos secundarios específicos para completar de ese modo la presente invención.

La presente invención incluye las siguientes invenciones.

1. Una composición de vacuna contra la salmonela para su uso en la inmunización de aves contra la salmonela que comprende como ingrediente activo una estructura que contiene antígeno O derivado de *Salmonella*, siempre que dicha estructura no contenga una célula completa, en donde dicha estructura contiene lípido A.
2. La composición de vacuna contra la salmonela para su uso de acuerdo con el apartado 1, en donde la estructura que contiene antígeno O es un lipopolisacárido.
3. La composición de vacuna contra la salmonela para su uso de acuerdo con el apartado 1 en donde la *Salmonella* es una o más seleccionadas del grupo que consiste en los Grupos O4, O7 y O9.
4. La composición de vacuna contra la salmonela para su uso de acuerdo con el apartado 1 o 3, en donde la *Salmonella* es una o más seleccionadas del grupo que consiste en *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella infantis*.
5. La composición de vacuna contra la salmonela para su uso de acuerdo con el apartado 1 o 3, en donde la estructura que contiene el antígeno O derivado de *Salmonella* es una mezcla de estructuras que

contienen antígeno O derivado de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella infantis*.

6. La composición de vacuna contra la salmonela para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 5, en donde la estructura que contiene el antígeno O es una estructura que contiene el antígeno O contenido en al menos 5.400 UE/ml de cada *Salmonella* en la composición de vacuna contra la salmonela.

7. La composición de vacuna contra la salmonela para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los apartados 1 a 6, en donde la composición de vacuna comprende adicionalmente un antígeno derivado de uno o más patógenos seleccionados del grupo que consiste en el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de la bronquitis infecciosa aviar, *Mycoplasma gallisepticum*, Virus del síndrome de la disminución de la puesta y *Haemophilus paragallinarum*.

### Efectos de la invención

Al utilizar una estructura que contiene antígeno O, en donde dicha estructura no contiene una célula completa y en donde dicha estructura contiene Lípido A (p. ej., lipopolisacárido) derivado de *Salmonella* como ingrediente activo de una composición de vacuna, es posible aliviar la hinchazón en el lugar de la inyección en comparación con la vacuna convencional de células completas. Además, al preparar una vacuna de componentes, es posible aumentar aún más el número de otros antígenos que se mezclan con ellos sin aumentar la cantidad de inyección.

Breve descripción de los dibujos.

La Fig. 1 muestra una puntuación de hinchazón en el sitio de inyección para una vacuna mixta de lipopolisacáridos derivados de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella infantis* y *Salmonella typhimurium* (vacuna de LPS trivalente) o una vacuna que comprende otros antígenos además de la vacuna trivalente de LPS (vacuna de LPS mixta decavalente).

La Fig. 2 muestra el número de células desprendidas cuando se realiza una prueba de sensibilización con *Salmonella typhimurium* para la vacuna de LPS trivalente en donde el asterisco \* muestra una diferencia significativa con el grupo de control ( $p < 0,05$ ).

La Fig. 3 muestra el número de células desprendidas cuando se realiza una prueba de sensibilización con *Salmonella enteritidis* para la vacuna de LPS trivalente en donde el asterisco \* muestra una diferencia significativa con el grupo de control ( $p < 0,05$ ).

La Fig. 4 muestra el número de células desprendidas cuando se realiza una prueba de sensibilización con *Salmonella infantis* para la vacuna de LPS trivalente en donde el asterisco \* muestra una diferencia significativa con el grupo de control ( $p < 0,05$ ).

La Fig. 5 muestra el número de células desprendidas cuando se realiza una prueba de sensibilización con *Salmonella enteritidis* para la vacuna de LPS mixta decavalente en donde el asterisco \* muestra una diferencia significativa con el grupo de control ( $p < 0,05$ ).

La Fig. 6 muestra el número de células desprendidas cuando se realiza una prueba de sensibilización con *Salmonella infantis* para la vacuna de LPS mixta decavalente en donde el asterisco \* muestra una diferencia significativa con el grupo de control ( $p < 0,05$ ).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

#### 1. Composición de la vacuna

La primera realización de la presente invención es una composición de vacuna de salmonela para su uso en la inmunización de aves contra la salmonela que comprende como ingrediente activo una estructura que contiene antígeno O derivado de *Salmonella* siempre que dicha estructura no contenga una célula completa, en donde dicha estructura contiene lípido A.

De acuerdo con la presente invención, en una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo una estructura que contiene antígeno O (específicamente, lipopolisacárido) derivado de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis* o *Salmonella enteritidis*, el desprendimiento de células se reduce frente a la sensibilización con las células respectivas. Se supone que esto se debe al mantenimiento de la antigenicidad contra las estructuras respectivas derivadas de una pluralidad de bacterias Gram negativas, incluso si las estructuras respectivas se mezclan entre sí. Además, en la vacuna mixta decavalente que comprende la vacuna trivalente mezclada con antígenos diferentes de las estructuras mencionadas anteriormente, se mantiene la antigenicidad contra las células que proporcionan las estructuras mencionadas anteriormente. Se supone que esto se debe al mantenimiento de la antigenicidad contra las estructuras mencionadas anteriormente, incluso si la vacuna mixta comprende antígenos distintos de las estructuras mencionadas anteriormente.

Como tal, la composición de vacuna de la presente invención incluye:

(A) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo la estructura mencionada

anteriormente derivada de una única bacteria Gram negativa (en lo sucesivo, también denominada "vacuna monovalente");

5 (B) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo la estructura mencionada anteriormente derivada de una pluralidad de bacterias Gram-negativas (en lo sucesivo, también denominada "vacuna polivalente"); y

(C) una composición de vacuna que comprende una vacuna monovalente o una vacuna polivalente junto con antígenos diferentes de la estructura mencionada anteriormente (también denominada en lo sucesivo "vacuna mixta").

10 (1) Células bacterianas

15 La composición de vacuna de la presente invención comprende como un ingrediente activo una estructura que contiene antígeno O como se describe anteriormente. Por lo tanto, la composición de vacuna de la presente invención se puede aplicar en sentido amplio a *Salmonella* dividida en grupos en función de los tipos de antígeno O y subdividida a continuación en función de los tipos de antígeno H, incluidos el Grupo 02 (A), el Grupo 04 (B), el Grupo 07 (C1, C4), el Grupo 08 (C2, C3), el Grupo 09 (D1) y el Grupo O3/O10 (E1, E2, E3) como se muestra en la Tabla 1 y la Tabla 2 (la designación anterior se muestra entre paréntesis).

Tabla 1

Serotipo O	Serotipo	Antígeno O: (eliminado opcionalmente)
O2 (A)	<i>Salmonella paratyphi</i> A	1, 2, 12
O4 (B)	<i>Salmonella paratyphi</i> B	1, 4, (5), 12
	<i>Salmonella stanley</i>	1, 4, (5), 12, 27
	<i>Salmonella derby</i>	1, 4, (5), 12
	<i>Salmonella agona</i>	1, 4, 12
	<i>Salmonella typhimurium</i>	1, 4, (5), 12
	<i>Salmonella heidelberg</i>	1, 4, (5), 12
O7 (C1, C4)	<i>Salmonella paratyphi</i> C	6, 7, (Vi)
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	6, 7,
	<i>Salmonella braenderup</i>	6, 7, 14
	<i>Salmonella montevideo</i>	6, 7, 14
	<i>Salmonella thompson</i>	6, 7, 14
	<i>Salmonella virchow</i>	6, 7
	<i>Salmonella infantis</i>	6, 7, 14
	<i>Salmonella bareilly</i>	6, 7, 14
	<i>Salmonella tennessee</i>	6, 7, 14

20

Tabla 2

Serotipo O	Serotipo	Antígeno O: (eliminado opcionalmente)
O8 (C2, C3)	<i>Salmonella narashino</i>	6, 8
	<i>Salmonella newport</i>	6, 8, 20
	<i>Salmonella lichfield</i>	6, 8
O9 (D1)	<i>Salmonella sendai</i>	1, 9, 12
	<i>Salmonella typhi</i>	9, 12, (Vi)
	<i>Salmonella enteritidis</i>	1, 9, 12
	<i>Salmonella panama</i>	1, 9, 12
	<i>Salmonella enterica subsp. salamae</i>	1, 9, 12
	<i>Salmonella gallinarum</i>	1, 9, 12

Serotipo O	Serotipo	Antígeno O: (eliminado opcionalmente)
O3 / O10 (E1, E2, E3)	<i>Salmonella anatum</i>	3, 10, (15), (15, 34)
	<i>Salmonella meleagridis</i>	3, 10, (15), (15, 34)
	<i>Salmonella london</i>	3, 10, (15)
	<i>Salmonella give</i>	3, 10, (15), (15, 34)
	<i>Salmonella weltevreden</i>	3, 10, (15)

De acuerdo con la presente invención, en una vacuna trivalente que comprende como ingrediente activo una estructura que contiene antígenos O como se ha descrito anteriormente derivada de *Salmonella typhimurium* (Grupo O4), *Salmonella infantis* (Grupo O7) y *Salmonella enteritidis* (Grupo O9), el desprendimiento de células se reduce frente a la sensibilización con las células respectivas. Se supone que se debe al mantenimiento de la antigenicidad de las estructuras mencionadas anteriormente preparadas por medio del procedimiento para la preparación de la presente invención independientemente de los tipos de antígeno O. Por lo tanto, se supone que la composición de vacuna de la presente invención puede ser aplicable a *Salmonella* en su conjunto, pero no limitada a *Salmonella* pertenecientes al Grupo O4, al Grupo O7 y al Grupo O9.

En la Referencia no relacionada con patentes 4, en aves inmunizadas con una vacuna que comprende células de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis* y *Salmonella enteritidis*, el desprendimiento de células se reduce frente a la sensibilización no solamente con las cepas de vacuna respectivas, sino también con *Salmonella heidelberg* pertenecientes al mismo grupo de antígeno O (grupo O4) que *Salmonella typhimurium*. Por lo tanto, se supone que la vacuna también puede ser eficaz para las células que tienen un antígeno O homólogo al de las cepas de la vacuna pero que son de diferentes serotipos. A saber, en caso de una vacuna de *Salmonella*, se supone que la vacuna también puede ser eficaz para células que tienen un antígeno O homólogo al de las cepas de la vacuna, en otras palabras, para células del mismo Grupo de antígeno O que las de las cepas de la vacuna. Por lo tanto, la composición de la vacuna de la presente invención, cuando se aplica para *Salmonella*, también puede ser aplicable a las células de otras *Salmonella* pertenecientes al Grupo O4, al Grupo O7 y al Grupo O9.

Por lo tanto, la composición de vacuna de la presente invención incluye:

- (A) una vacuna monovalente que comprende como ingrediente activo una estructura que contiene antígeno O derivado de *Salmonella*;
- (B) una vacuna polivalente que comprende como ingrediente activo estructuras que contienen antígeno O derivado de dos o más *Salmonella*;
- (C) una vacuna monovalente que comprende como ingrediente activo una estructura que contiene antígeno O derivado de *Salmonella* pertenecientes al Grupo O4, al Grupo O7 o al Grupo O9;
- (D) una vacuna polivalente que comprende como ingrediente activo estructuras que contienen antígeno O derivado de dos o más *Salmonella* seleccionado del grupo que consiste en el Grupo O4, el Grupo O7 y el Grupo O9; y
- (E) una vacuna mixta que comprende la vacuna monovalente o la vacuna polivalente anteriores junto con antígenos diferentes de la estructura mencionada anteriormente.

Las *Salmonella* ilustrativas incluidas en *Salmonella*, Grupo O4, Grupo O7 o Grupo O9 pueden incluir las celdas que se muestran en la Tabla 1 y la Tabla 2. Preferiblemente, las *Salmonella* son aquellas pertenecientes al Grupo O4, Grupo O7 y Grupo O9. Además, preferentemente, el grupo O4 es *Salmonella typhimurium*, el Grupo O7 es *Salmonella Infantis* y el grupo O9 es *Salmonella enteritidis*.

(2) Estructura que contiene antígeno O

La composición de vacuna de la presente invención comprende como ingrediente activo una estructura que contiene antígeno O. Como el antígeno O es principalmente responsable de la antigenicidad, una estructura que contiene antígeno O puede ser cualquier estructura en la medida en que contenga el antígeno O, siempre que sea una estructura que no contenga una célula completa. Por ejemplo, una estructura que contiene antígeno O incluye lipopolisacáridos. En caso de que no se utilice una etapa de eliminación del Lípido A con el propósito de una producción eficaz, la composición de vacuna de la presente invención comprende preferiblemente como ingrediente activo lipopolisacáridos. No hay preocupación por los efectos secundarios de la composición de vacuna de la presente invención.

(3) Vacuna monovalente

La composición de vacuna de la presente invención incluye una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo la estructura mencionada anteriormente derivada de una sola clase de bacterias Gram negativas (vacuna monovalente), en particular *Salmonella*.

5 La *Salmonella* es preferiblemente una *Salmonella* perteneciente a los Grupos O4, O7 y O9. La *Salmonella* perteneciente al grupo O4 es preferentemente *Salmonella typhimurium*, la *Salmonella* perteneciente al grupo O7 es preferentemente *Salmonella infantis*, y la *Salmonella* perteneciente al grupo O9 es preferentemente *Salmonella enteritidis*.

10 Por lo tanto, una vacuna monovalente de la presente invención incluye:

(A) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígeno O derivado de un solo tipo de *Salmonella*;

15 (B) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígeno O derivado de un solo tipo de *Salmonella* perteneciente al grupo O4;

(C) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígeno O derivado de un solo tipo de *Salmonella* perteneciente al grupo O7;

(D) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígeno O derivado de un solo tipo de *Salmonella* perteneciente al grupo O9;

20 (E) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígeno O derivado de *Salmonella typhimurium*;

(F) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígeno O derivado de *Salmonella infantis*;

25 (G) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígeno O derivado de *Salmonella enteritidis*.

(4) Vacuna polivalente

30 La composición de vacuna de la presente invención incluye una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo la estructura mencionada anteriormente derivada de varios tipos de *Salmonella* (vacuna polivalente).

35 En el caso de una vacuna polivalente, las clases de *Salmonella* de las cuales deriva una estructura que contiene antígeno O son preferiblemente 2 o más, 3 o más, 4 o más, o 5 o más. Preferiblemente son 2 (vacuna bivalente), 3 (vacuna trivalente), 4 (vacuna tetravalente) o 5 (vacuna pentavalente).

Una vacuna trivalente de *Salmonella* comprende preferiblemente las estructuras mencionadas anteriormente derivadas de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis* y *Salmonella enteritidis*.

40 La *Salmonella* es preferiblemente una *Salmonella* perteneciente a los Grupos O4, O7 y O9. La *Salmonella* perteneciente al Grupo O4 es preferentemente *Salmonella typhimurium*, la *Salmonella* perteneciente al Grupo O7 es preferentemente *Salmonella infantis*, y la *Salmonella* perteneciente al Grupo O9 es preferentemente *Salmonella enteritidis*.

45 Por lo tanto, una vacuna polivalente de la presente invención incluye:

(A) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígenos O derivados de dos o más tipos de *Salmonella*;

50 (B) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígenos O derivados de *Salmonella* perteneciente al Grupo O4 y *Salmonella* perteneciente al Grupo O7;

(C) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígenos O derivados de *Salmonella* pertenecientes al Grupo O4 y *Salmonella* perteneciente al Grupo O9;

(D) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígenos O derivados de *Salmonella* perteneciente al Grupo O7 y *Salmonella* perteneciente al Grupo O9;

55 (E) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígenos O derivados de *Salmonella* perteneciente al Grupo O4, *Salmonella* perteneciente al Grupo O7 y *Salmonella* perteneciente al grupo O9;

(F) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígenos O derivados de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella infantis*;

60 (G) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígenos O derivados de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*;

(H) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígenos O derivados de *Salmonella infantis* y *Salmonella enteritidis*;

(I) una composición de vacuna que comprende como ingrediente activo antígenos O derivados de

*Salmonella typhimurium, Salmonella infantis y Salmonella enteritidis.*

## (5) Vacuna mixta

- 5 La composición de vacuna de la presente invención incluye una composición de vacuna que comprende una vacuna monovalente o una vacuna polivalente junto con antígenos diferentes de la estructura mencionada anteriormente (vacuna mixta).

10 Tales antígenos incluyen un patógeno atenuado, un patógeno inactivado, una proteína, un péptido, un ácido nucleico y una partícula similar a un virus. La vacuna monovalente o la vacuna polivalente de la presente invención se pueden utilizar como una vacuna mixta combinadas con al menos una vacuna seleccionada del grupo que consiste en vacunas contra otros virus (p. ej., virus de la bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, virus de la encefalomiелitis aviar, virus del síndrome de la disminución de la puesta, virus de la enfermedad de Newcastle, reovirus aviar, virus de la influenza aviar, virus de la enfermedad de Marek, virus de la laringotraqueitis infecciosa, neumovirus aviar y virus de la viruela aviar), bacterias (p. ej., *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Clostridium septicum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, y *Campylobacter fetus*) y protozoos (p. ej., *Leucocytozoon caulleryi*, *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima*, y *Eimeria necatrix*).

## (6) Concentración y proporción de ingrediente activo.

20 La composición de vacuna de la presente invención comprende como un ingrediente activo una estructura que contiene antígeno O como se ha descrito anteriormente. La concentración de la estructura mencionada anteriormente se determina utilizando la unidad de endotoxina (= UE) como un índice. La UE se mide de acuerdo con la etapa 2-(6) de la medición como se describe a continuación. La concentración de la estructura mencionada anteriormente contenida en una composición de vacuna, en el caso de una vacuna polivalente, puede variar dependiendo de la clase de estructura mencionada anteriormente o puede ser la misma. La concentración de la estructura mencionada anteriormente es preferiblemente de al menos 5.400 UE/mL, y más preferiblemente de 54.000 UE/mL, para la estructura respectiva.

30 En el caso de una vacuna polivalente, la proporción de la estructura antes mencionada (proporción de UE) puede ser igual o diferente. En el caso de una vacuna trivalente que comprende como ingrediente activo la estructura mencionada anteriormente derivada de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*, o *Salmonella enteritidis*, la razón de la estructura mencionada es preferiblemente de *Salmonella typhimurium* : *Salmonella infantis* : *Salmonella enteritidis* (1:1:1).

## (7) Sujeto de administración

40 De acuerdo con la presente invención, el desprendimiento de células en los excrementos cecales en pollos inmunizados con una vacuna trivalente se redujo como en el Ejemplo 1. De este modo, la composición de la vacuna de la presente invención se puede utilizar para aves. Las aves incluyen las criadas con fines comerciales y no comerciales. Los ejemplos de aves incluyen *Galliformes* (p. ej., pollo, codornices y pavo), *Anseriformes* (p. ej., pato y ganso), *Charadriiformes* (p. ej., gaviota, codorniz barrada y chorlo), *Columbiformes* (p. ej., paloma), *Struthioniformes* (p. ej., avestruz), *Falconiformes* (p. ej., cuervo, pinzón, gorrión, estornino y golondrina), *Psittaciformes* (p. ej., loro), *Falconiformes* (p. ej., águila y halcón), *Strigiformes* (p. ej., búho), *Sphenisciformes* (p. ej., pingüino), y *Psittaciformes* (p. ej., periquito y loro), preferiblemente pollo.

## (8) Ruta de administración

50 La composición de vacuna de la presente invención produce una inflamación en el sitio de administración restringida a un nivel aceptable como una vacuna. Por lo tanto, se puede concebir una variedad de rutas de administración para la composición de vacuna de la presente invención, incluyendo, p. ej., la administración en la pata, el pecho, el cuello uterino, la administración oral, percutánea, entérica, la inyección intramuscular, intramuscular, subcutánea, intramedular, la inyección directa intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, intranasal e intraocular. La pata es una ruta de administración conveniente de una composición de vacuna. Por lo tanto, una ruta de administración preferible es la pata.

## (9) Portador

60 La composición de vacuna de la presente invención puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable. Para un portador farmacéuticamente aceptable, se puede utilizar sin limitación cualquier portador utilizado para la producción de una vacuna. Específicamente, un portador incluye solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, tampón acuoso isotónico y una combinación de los mismos. Además de esto, la composición de vacuna de la presente invención puede comprender adicionalmente un agente emulsionante, un agente conservante (p. ej., timerosal), un agente isotónico, un ajustador de pH, un agente inactivante (p. ej.,

formalina) y un coadyuvante. El coadyuvante es preferiblemente un coadyuvante oleoso.

(10) Proteína transportadora

5 Una estructura que contiene antígeno O se puede unir opcionalmente a una proteína portadora con el fin de mejorar la reacción de inmunización cuando se administre. Tal proteína portadora incluye toxoide diftérico (DT), toxoide tetánico (TT), toxina del cólera (CT) y CRM197. La unión a una proteína portadora se puede realizar a través de un conector (p. ej., SPDP o ADH) o la estructura se puede unir directamente a una proteína portadora. Como ejemplo, se describe la unión a una proteína portadora (DT/TT/CT) a través de SPDP o ADH utilizando bromuro de cianógeno (Referencia no relacionada con patentes 1).

2. Procedimiento para la preparación de la composición de vacuna.

15 La presente invención también describe un procedimiento para la preparación de una composición de vacuna para aves que comprende como ingrediente activo una estructura que contiene antígeno O derivado de *Salmonella* como se describió anteriormente.

Dicho procedimiento comprende una etapa de cultivo de bacterias Gram negativas (etapa de cultivo); una etapa de liberación de la estructura mencionada anteriormente a partir de células contenidas en la solución después de dicho cultivo (etapa de liberación); una etapa para recoger la estructura mencionada anteriormente de la solución después de dicha liberación (etapa de recogida), y una etapa para preparar la solución después de dicha recogida para obtener una composición de vacuna (etapa de preparación). Además de las etapas anteriores, el procedimiento puede comprender adicionalmente una etapa de inactivación de células (etapa de inactivación) y/o una etapa de emulsificación de la estructura mencionada anteriormente (etapa de emulsificación). Preferiblemente, la etapa de inactivación se lleva a cabo después de la etapa de cultivo y la etapa de emulsificación se lleva a cabo después de la etapa de recogida. Además, el procedimiento comprende preferiblemente una etapa de medición de una cantidad de la estructura mencionada anteriormente (etapa de medición) después de la etapa de recogida.

30 Cada una de las etapas respectivas se explica a continuación. Según lo requiera la ocasión, las etapas respectivas no se llevan a cabo necesariamente en el orden indicado a continuación, algunas etapas se pueden omitirse o algunas etapas se pueden llevar a cabo repetidamente. Por ejemplo, no es necesario realizar la etapa de emulsificación cuando no se utiliza un coadyuvante oleoso. La etapa de inactivación y la etapa de liberación se pueden llevar a cabo simultáneamente (p. ej., el tratamiento de sonicación y el tratamiento con formalina se realizan en ambas etapas).

35 (1) Etapa de cultivo

La etapa de cultivo se puede modificar adecuadamente para la clase de medio de cultivo y las condiciones de crecimiento (tiempo, temperatura, concentración de oxígeno, concentración de dióxido de carbono, pH y concentración de sal) dependiendo de la clase de bacterias Gram negativas. En el caso de la *Salmonella*, las células se cultivan en cultivo de TPB de 35° a 43°C (preferiblemente a 37°C) durante 8 a 24 horas (preferiblemente 16 horas). En el caso de *E. coli*, las células se cultivan en cultivo de LB a una temperatura de 30°C a 43°C (preferiblemente a 37°C) durante 8 a 24 horas (preferiblemente 16 horas).

45 (2) Etapa de inactivación.

La etapa de inactivación se puede modificar adecuadamente dependiendo de la clase de bacterias Gram negativas. Por ejemplo, se puede realizar con tratamiento físico (p. ej., radiación de rayos X, tratamiento térmico o sonicación) o tratamiento químico (p. ej., tratamiento con formalina, tratamiento con mercurio, tratamiento con alcohol o tratamiento con hidrógeno). Cualquiera de estos tratamientos se puede realizar solo o en forma de una combinación de los mismos. Es preferible el tratamiento con formalina.

(3) Etapa de liberación

55 La etapa de liberación puede ser cualquier procedimiento que permita la conservación de la antigenicidad de la estructura mencionada anteriormente. Los procedimientos y las condiciones pueden seleccionarse adecuadamente dependiendo de las bacterias Gram negativas o de las propiedades de la estructura mencionada anteriormente. Por ejemplo, incluye sonicación, tratamiento con fenol, tratamiento mecánico, congelación y descongelación, compresión y descompresión, presión osmótica, descomposición de la pared celular (p. ej., tratamiento con lisozima descrito en la Referencia no relacionada con patentes 1 y la Referencia no relacionada con patentes 2) y tratamiento con tensioactivo, ya sea solo o en forma de una combinación de los mismos, preferiblemente descomposición de la pared celular, sonicación o tratamiento con fenol.

La sonicación se puede llevar a cabo bajo cualquier condición que permita la conservación de la antigenicidad de la

estructura mencionada. Por ejemplo, se puede realizar a 25°C o menos, preferiblemente en agua con hielo, durante 5 a 30 minutos, preferiblemente durante 15 minutos. La solución después de la sonicación se puede someter a centrifugación para eliminar las impurezas.

5 El tratamiento con fenol se puede llevar a cabo en cualquier condición que permita conservar la antigenicidad de la estructura mencionada. Por ejemplo, se puede realizar con fenol de 45 a 100%, preferiblemente 100%, de 4 a 80°C, preferiblemente a 68°C durante 5 a 30 minutos, preferiblemente durante 15 minutos. Durante el procedimiento, el recipiente se puede agitar a intervalos de tiempo regulares. Después de la reacción la solución se puede someter a centrifugación para eliminar las impurezas. Después del tratamiento con fenol la solución se puede someter a diálisis con un tampón adecuado (p. ej., PBS).

10 El tratamiento nucleolítico (p. ej., el tratamiento con ADNasa o el tratamiento con ARNasa) o el tratamiento proteolítico (tratamiento con proteasa) se puede realizar después de la etapa de liberación, como se describe en la Referencia no relacionada con patentes 1 y la Referencia no relacionada con patentes 2. Los ácidos nucleicos se pueden eliminar mediante fraccionamiento con etanol. La eliminación de proteínas y la eliminación de la cadena lateral del ácido graso del Lípido A se puede realizar mediante tratamiento con ácido acético.

#### (4) Etapa de recogida

20 La etapa de recogida se puede modificar adecuadamente dependiendo de las propiedades de la estructura mencionada anteriormente. Por ejemplo, el lipopolisacárido está cargado negativamente en conjunto, ya que comprende una gran cantidad de grupos fosfato y, por lo tanto, se adsorbe fácilmente a una sustancia cargada positivamente. Por lo tanto, la estructura mencionada anteriormente se puede recoger por adsorción utilizando tales propiedades, por ejemplo, cromatografía de afinidad y adsorción con una membrana cargada positivamente. Por ejemplo, se pueden concebir esferas de Polimixina B, histidina, histamina, lisina, poli(ácido  $\gamma$ -metil-L-glutámico) aminado y una membrana cargada positivamente con grupos de amonio introducidos para una sustancia cargada positivamente.

30 Alternativamente, la estructura mencionada anteriormente se puede recoger utilizando el carácter hidrófobo del Lípido A. La sustancia hidrófoba incluye polipropileno, polietileno, poliestireno y membrana de PTEE. Para recoger la estructura mencionada anteriormente, también se concibe utilizar una sustancia que se una al lipopolisacárido, incluido un anticuerpo anti-LPS, un factor anti-LPS de *Limulus polyphemus*, proteína BPI (aumento de la permeabilidad bactericida), CAP18 (proteína antibacteriana catiónica de 18 kDa), y LBP (Proteína de Unión a LPS). Se puede utilizar la cromatografía con un portador al que se una dicha sustancia.

35 La recogida de la estructura mencionada anteriormente se puede lograr utilizando productos disponibles en el mercado. Por ejemplo, puede usarse ET-clean (marca registrada; Chisso Corporation). La recogida también se puede realizar mediante ultracentrifugación como se describe en la Referencia no relacionada con patentes 1.

#### 40 (5) Etapa de medición

Se puede llevar a cabo un procedimiento ilustrativo para medir lipopolisacáridos como se describe a continuación. Se añaden a una microplaca una solución de las estructuras antes mencionadas diluidas con agua destilada y un patrón de referencia del CSE-L Set (*E. coli* O113: endotoxina derivada de H10). Se añade el reactivo LAL de Endospecy ES-50M Set (SEIKAGAKU BIOBUSINESS CORPORATION). La placa se cubre para la reacción a 37°C durante 30 minutos. Se añaden una mezcla de nitrito de sodio/ácido clorhídrico, una solución de sulfamato de amonio y una mezcla de dihidrocloruro de N-(1-naftil)etilendiamina/N-metil-2-pirrolidona en Toxicolor System DIA Set (SEIKAGAKU BIOBUSINESS CORPORATION) y la microplaca se agita bien. La absorbancia se mide a dos longitudes de onda de 545 nm y 630 nm (Molecular Devices Japan, VersaMax) para determinar la endotoxina.

#### 50 (6) Etapa de emulsificación.

La etapa de emulsificación es un procedimiento de mezclado de una solución que contiene la estructura mencionada anteriormente, aceite y un agente emulsionante. El agente emulsionante incluye Tween 80 (marca registrada), Tween 60 (marca registrada), Brij 721 (marca registrada), Eumulgin B2 (marca registrada), Arlacel 165 FL (marca registrada), Tefose 1500 (marca registrada), Glucamate SSE20 (marca registrada), Surfhope C-1216 (marca registrada), Surfhope C-1811 (marca registrada), Surfhope SE Pharma D-1816 (marca registrada), Surfhope SE Pharma D-1616 (marca registrada), Span 60 (marca registrada), Olepal isoesteárico (marca registrada), Glucate SS (marca registrada) y Surfhope C-1205 (marca registrada), preferiblemente monooleato de sorbitán. El aceite incluye aceite vegetal, aceite mineral, aceite animal, aceite sintético y aceite de silicona, preferiblemente parafina líquida ligera.

#### 60 (7) Etapa de preparación

La etapa de preparación es, en el caso de una vacuna polivalente, un procedimiento de mezclado de composiciones que comprenden las respectivas estructuras mencionadas anteriormente derivadas de las células microbianas específicas que se obtuvieron en las etapas anteriores. Por ejemplo, en el caso de una vacuna trivalente que comprende como ingrediente activo las estructuras mencionadas anteriormente derivadas de *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis* y *Salmonella enteritidis*, se mezclan entre sí una composición que comprende la estructura mencionada anteriormente derivada de *Salmonella typhimurium*, una composición que comprende la estructura mencionada anteriormente derivada de *Salmonella Infantis* y una composición que comprende la estructura mencionada anteriormente derivada de *Salmonella enteritidis*.

La vacuna obtenida se puede utilizar sola como una vacuna contra la salmonela para aves o se puede utilizar como una vacuna mixta combinada con al menos una vacuna seleccionada del grupo que consiste en vacunas contra otros virus (p. ej., virus de la bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, virus de la encefalomiелitis aviar, virus del síndrome de la disminución de la puesta, virus de la enfermedad de Newcastle, reovirus aviar, virus de la influenza aviar, virus de la enfermedad de Marek, virus de la laringotraqueitis infecciosa, neumovirus aviar y virus de la viruela aviar), bacterias (p. ej., *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Clostridium septicum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, y *Campylobacter fetus*) y protozoos (p. ej., *Leucocytozoon caulleryi*, *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima*, y *Eimeria necatrix*).

En el caso de una vacuna polivalente y una vacuna mixta, la proporción de las composiciones respectivas que comprenden la estructura mencionada anteriormente (proporción de UE) puede ser igual o la proporción de una composición específica puede aumentar o disminuir.

La presente invención se explica con más detalle por medio de los siguientes Ejemplos, pero no se limita a los mismos.

Ejemplo 1

(1) Preparación de antígeno

1) Etapa de cultivo

Se cultivaron (37°C, 16 a 24 horas, 4 X 10<sup>8</sup> a 4 x 10<sup>9</sup> UFC/mL) *Salmonella enteritidis* (en lo sucesivo referida como "SE"), *Salmonella infantis* (en lo sucesivo referida como "SI"), y *Salmonella typhimurium* (en lo sucesivo referida como "ST") en 50 mL de medio LB (que comprendía 10 g de cloruro de sodio, 10 g de triptona Bact, 5 g de extracto de levadura Bact en 1.000 ml de medio de cultivo),.

2) Etapa de inactivación.

Se añadió formalina al cultivo respectivo en formalina al 0,4% para el tratamiento a 37°C durante 16 horas para inactivar las células.

3) Etapa de liberación

Las células inactivadas se sometieron a trituración ultrasónica o se trataron con fenol para liberar lipopolisacárido.

La trituración ultrasónica (Branson, Sonifier 350) de las células se llevó a cabo en agua helada durante 15 minutos. Después, se realizó la centrifugación (TOMY SEIKO Co, Ltd., 10.000 X g, 15 minutos) y se utilizó el sobrenadante en la etapa de recogida.

El tratamiento con fenol de las células se llevó a cabo mezclando 20 mL de la solución celular después de la inactivación con formalina con un volumen equivalente de una solución saturada de fenol y calentando la mezcla a 68°C durante 15 minutos mientras se agitaba cada 3 minutos. A continuación, una vez que la mezcla se dejó en reposo a 4°C durante 1 día, se realizó una centrifugación (TOMY SEIKO Co, Ltd., 10.000 X g, 15 minutos). Para eliminar más las impurezas, se centrifugó el sobrenadante (TOMY SEIKO Co, Ltd., 10.000 X g, 15 minutos). Después de eso, el sobrenadante se sometió a diálisis con PBS durante 3 días y se utilizó en la etapa de recogida.

4) Etapa de recogida

Se añadieron 30 mL de cada sobrenadante a la columna ET-clean L (Chisso Corporation, número de catálogo 20015). Después del lavado de la columna con un tampón de fosfato que contenía NaCl 0,15 M (NaCl 8,76 g en 1.000 mL de solución), el lipopolisacárido se hizo eluir con un tampón de fosfato que contenía NaCl 2 M (NaCl 117,54 g en 1.000 ml de solución).

(2) Determinación de endotoxinas.

Se añadieron una solución de los antígenos respectivos diluidos con agua destilada y patrón de referencia del CSE-L Set (*E. coli* O113: endotoxina derivada de H10) a una microplaca. Se añadió el reactivo LAL de Endospecy ES-50M Set (SEIKAGAKU BIOBUSINESS CORPORATION). La placa se cubrió para la reacción a 37°C durante 30 minutos. Se añadieron una mezcla de nitrito de sodio/ácido clorhídrico, una solución de sulfamato de amonio y una mezcla de hidrocloreuro de N-(1-naftil)etilendiamina/N-metil-2-pirrolidona a DIA Toxicolor System Set (SEIKAGAKU BIOBUSINESS CORPORATION) y la microplaca se agitó bien. La absorbancia se midió a dos longitudes de onda de 545 nm y 630 nm (Molecular Devices Japan, VersaMax) para determinar las unidades de endotoxina.

### (3) Etapa de emulsificación y etapa de preparación.

Se mezclaron 3,6 mL de cada solución de antígeno y se emulsionaron con 14,4 mL de coadyuvante oleoso (una mezcla de parafina líquida ligera, monooleato de sorbitán y polisorbato 80). Se mezcló una cantidad equivalente de las respectivas vacunas para preparar una vacuna contra la salmonela que comprendía tres tipos de lipopolisacáridos (vacuna de LPS trivalente). Para dicha vacuna, se preparó una vacuna que comprendían 54.000 UE/mL, una vacuna que comprendía 5.400 UE/mL y una vacuna que comprendía 540 UE/mL de lipopolisacáridos derivados de SE, ST o SI.

### (4) Prueba de inmunización

Se administraron 0,5 mL de cada una de las vacunas respectivas a pollos SPF de 5 semanas de edad en el músculo del muslo inferior. Como control, se utilizó una vacuna de células completas mixta trivalente que comprendía células completas inactivadas de SE, ST y SI. La vacuna de células completas trivalente mixta se preparó cultivando las células respectivas, inactivando las células, diluyendo las células con PBS a 54.000 UE/mL de lipopolisacárido, y mezclando y emulsionando las células inactivadas con coadyuvante oleoso. También se proporcionó un grupo sin administración de vacuna. El sitio de administración se observó hasta 10 semanas después de la administración y se evaluó la seguridad. Cuatro semanas después de la inmunización, los pollos fueron sensibilizados por vía oral con *Salmonella* SE ( $9,1 \times 10^9$  UFC/pollo), SI ( $2,3 \times 10^9$  UFC/pollo), o ST ( $1,2 \times 10^9$  UFC/pollo) para investigar la eficacia. Para evaluar la eficacia, se recogieron las heces a los 1, 4, 7, 10 y 14 días de la sensibilización y se midió el número de células que se desprenden en la caída de cecal mediante el método que se describe a continuación.

### (5) Medición del número de células.

Las heces recogidas se diluyeron con medio HTT en emulsión al 20% y se aplicaron 50 µL de la emulsión a una placa de agar DHL para cultivo (37°C, 16 a 24 horas). Al día siguiente, se contó el número de colonias emergidas para medir el número de células en las heces del ciego (UFC/g). Para aquellas muestras que no proporcionaron ninguna colonia después de este cultivo directo, se llevó a cabo el cultivo de enriquecimiento durante 1 día y se determinó el número de células por la presencia de colonias (aquellas muestras que proporcionaron colonias después de este cultivo tenían un número de células de 50 UFC/g). Para aquellas muestras que no proporcionaron ninguna colonia después del cultivo de enriquecimiento durante 1 día, se realizó un cultivo secundario diferido y el número de células se determinó por la presencia de colonias (aquellas muestras que proporcionaron colonias después de este cultivo tenían un número de células de 10 UFC/g) y aquellas muestras que no dieron colonias incluso después de este cultivo tenían un número de células de 0 CFU/g).

### (6) Método de valoración del edema en las patas.

El sitio de administración se observó durante 10 semanas y la seguridad se evaluó con la puntuación de la hinchazón de las patas. Para la puntuación de la hinchazón, la Puntuación 1 representaba leve hinchazón (hinchazón en una porción de la parte inferior del muslo) en el sitio de administración, la Puntuación 2 representaba una inflamación moderada (hinchazón en la totalidad de la parte inferior del muslo) y la Puntuación 3 representaba una inflamación severa (además de hinchazón en la totalidad de la parte inferior del muslo, se detectaba hidropesía por palpación). La puntuación se decidió por observación visual y palpación.

### (7) Resultados

Los resultados de la observación de la hinchazón en las patas se muestran en la Fig. 1. Los resultados obtenidos después de la sensibilización con ST se muestran en la Fig. 2. Los resultados obtenidos después de la sensibilización con SE se muestran en la Fig. 3. Los resultados obtenidos después de la sensibilización con SI se muestran en la Fig. 4. Como se muestra en la Fig. 1, se comprobó el alivio de la hinchazón de las patas para la vacuna de LPS trivalente en comparación con la vacuna trivalente mixta de células enteras. La hinchazón en las patas se alivió aún más para la vacuna de LPS trivalente en la que las impurezas como las proteínas se eliminaron aún más mediante la etapa de extracción con fenol. Con respecto a la eficacia, el desprendimiento de células se redujo significativamente en todas las pruebas de sensibilización con ST, SE y SI para el grupo de administración de la vacuna de LPS trivalente como se muestra en la Fig. 3, la Fig. 4 y la Fig. 5 para afirmar la eficacia de la vacuna de LPS trivalente. El desprendimiento de células también se redujo en el grupo de administración de la vacuna de LPS

trivalente con extracción con fenol para probar que una estructura que contenía antígeno O (específicamente, lipopolisacárido) era útil como antígeno para una vacuna contra salmonela.

Ejemplo 2

5 (1) Preparación de antígeno

10 La vacuna preparada en el Ejemplo 1 que comprende 54.000 UE/mL de lipopolisacáridos derivados de cada una de SE, ST o SI se mezcló con OILVAX 7 (marca registrada; The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute; que comprende la cepa Nerima del virus de la bronquitis infecciosa, la cepa TM de *Mycoplasma gallisepticum*, virus del síndrome de la disminución de la puesta, y coriza infecciosa A y C (antígeno recombinante)). La mezcla resultante fue una vacuna de LPS mixta decavalente que comprendía 7.200 UE/mL de lipopolisacáridos derivados de cada una de SE, ST o SI,  $10^{8.4}$  DIH<sub>50</sub>/mL o más del virus de la enfermedad de Newcastle,  $10^{6.4}$  DIH<sub>50</sub>/mL o más de la cepa Nerima del virus de la bronquitis infecciosa,  $10^{6.4}$  DIH<sub>50</sub>/mL o más de la cepa TM,  $10^{7.4}$  DIH<sub>50</sub>/mL o más de *Mycoplasma gallisepticum*,  $10^{6.7}$  DIH<sub>50</sub>/mL o más del virus del síndrome de la disminución de la puesta, y 2,4 pg/mL o más de coriza A y C infecciosa (antígeno recombinante).

(2) Prueba de inmunización

20 Se administraron 0,5 mL de cada vacuna de LPS mixta decavalente preparada anteriormente a pollos SPF de 5 semanas de edad en el músculo del muslo inferior. Como control, se proporcionaron el grupo de administración de OILVAX 7 o la vacuna de LPS trivalente (5.400 UE/mL de lipopolisacárido de cada una de SE, ST y SI) y un grupo sin administración de vacuna. Se observó hinchazón en las patas hasta 10 semanas después de la administración para evaluar la seguridad. Cuatro semanas después de la inmunización, los pollos fueron sensibilizados por vía oral con *Salmonella* SE ( $9.1 \times 10^9$  UFC/pollo), o SI ( $2.3 \times 10^9$  UFC/pollo) para investigar la eficacia. Para evaluar la eficacia, se recogieron heces a los 1, 4, 7, 10 y 14 días de la exposición y se midió el número de desprendimientos de células en las heces cecales por medio del método de medición del número de células descrito en el Ejemplo 1. El grado de hinchazón se evaluó como se describe en el Ejemplo 1.

30 (3) Resultados

35 Los resultados de la observación de la hinchazón en las patas se muestran en la Fig. 1. Los resultados obtenidos después de la sensibilización con SE se muestran en la Fig. 5. Los resultados obtenidos después de la sensibilización con SI se muestran en la Fig. 6. Como se muestra en la Fig. 1, se comprobó el alivio de la hinchazón en las patas para la vacuna de LPS mixta decavalente cuando el lipopolisacárido se purificó aún más agregando la etapa de extracción con fenol. Como resultado de la observación del sitio de inyección hasta 10 semanas después de la inmunización; no se observó hinchazón problemática en el campo que causara distasia (Puntuación 3) para la vacuna de LPS mixta decavalente que comprendía lipopolisacárido no tratado con fenol para afirmar la seguridad de la vacuna de LPS mixta decavalente. Con respecto a la eficacia, se observó una reducción en el desprendimiento de células equivalente a la vacuna de LPS trivalente en las pruebas de sensibilización con SE o SI para afirmar la eficacia de la vacuna de LPS mixta decavalente.

**Aplicabilidad industrial**

45 Una vacuna contra la salmonela como se describe anteriormente permite la reducción de los efectos secundarios en el lugar de la inyección. Además, al mezclar las estructuras mencionadas anteriormente derivadas de una pluralidad de bacterias Gram negativas, es posible fabricar una vacuna polivalente y una vacuna mixta sin aumentar la cantidad de inyección.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición de vacuna contra la salmonela para su uso en la inmunización de aves contra la salmonela que comprende como ingrediente activo una estructura que contiene antígeno O derivado de *Salmonella*, siempre que dicha estructura no contenga una célula completa, en donde dicha estructura contiene lípido A.
- 10 2. La composición de vacuna contra la salmonela para su uso según la reivindicación 1, en donde la estructura que contiene antígeno O es lipopolisacárido.
- 15 3. La composición de vacuna contra la salmonela para su uso según la reivindicación 1, en donde la *Salmonella* es una o más seleccionada del grupo que consiste en los Grupos 04, 07 y 09.
- 20 4. La composición de vacuna contra la salmonela para su uso según la reivindicación 1 o 3, en donde la *Salmonella* es una o más seleccionada del grupo que consiste en *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella infantis*.
- 25 5. La composición de vacuna contra la salmonela para su uso según la reivindicación 1 o 3, en donde la estructura que contiene antígeno O derivado *Salmonella* es una mezcla de estructuras que contienen antígeno O derivado de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella infantis*.
- 30 6. La composición de vacuna contra la salmonela para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la estructura que contiene antígeno O es una estructura que contiene antígeno O que contiene al menos 5.400 UE/mL de cada *Salmonella* en la composición de vacuna contra la salmonela.
7. La composición de vacuna contra la salmonela para uso su según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición de vacuna comprende además un antígeno derivado de uno o más patógenos seleccionados del grupo que consiste en virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la bronquitis infecciosa aviar, *Mycoplasma gallisepticum*, Virus del síndrome de la disminución de la puesta y *Haemophilus paragallinarum*.

Fig. 1

Vacunas	Cantidad de LPS UE/mL	Extracción con fenol	Semanas después de la administración de la vacuna						En total (2-10 W)
			2	3	4	6	8	10	
Vacuna células completas trivalente mixta	54.000	-	0,4	1,1	0,7	0,4	0,1	0	2,7
Vacuna de LPS trivalente	54.000	-	0,5	0,7	0,5	0,2	0	0	1,9
	54.000	+	0	0,3	0,2	0	0	0	0,5
	5.400	-	0,1	0,3	0,2	0,2	0	0	0,8
Vacuna de LPS decavalente mixta	7.200	-	0,4	0,9	0,7	0,2	0,1	0	2,3
	7.200	+	0	0,4	0,4	0	0	0	0,8
OILVAX 7	-	-	0	0	0	0,2	0	0	0,2
Sin vacuna	-	-	0	0	0	0	0	0	0

Fig. 2

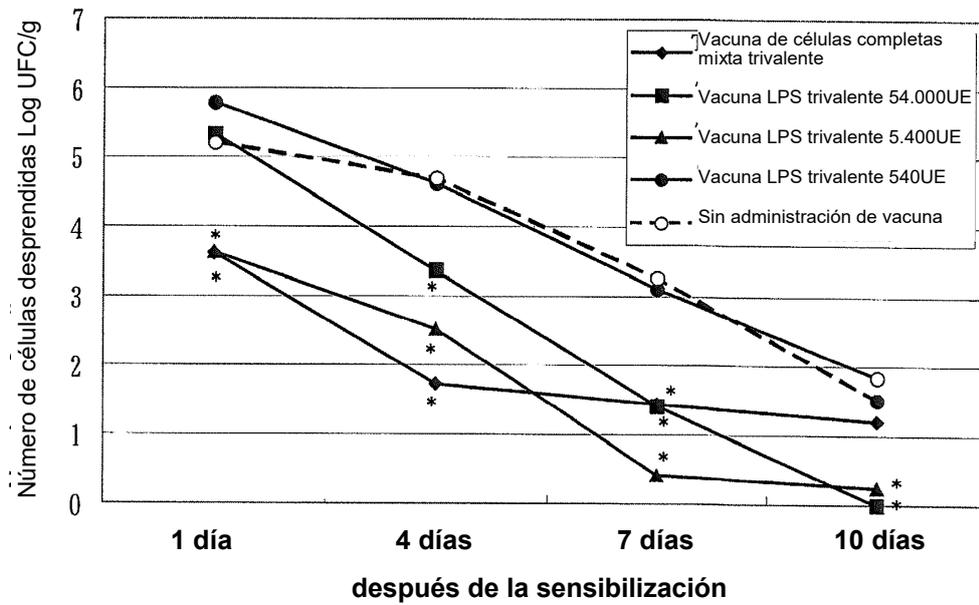


Fig. 3

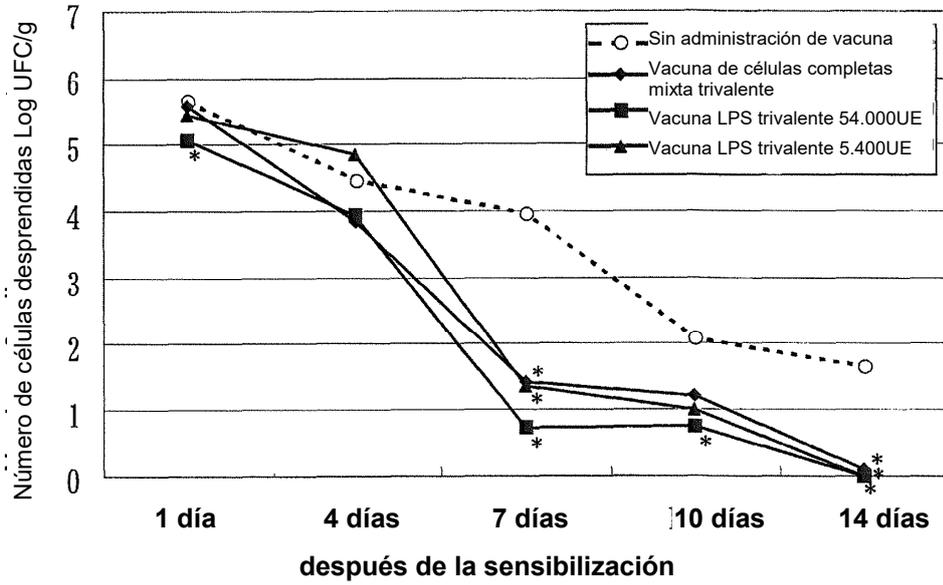


Fig. 4

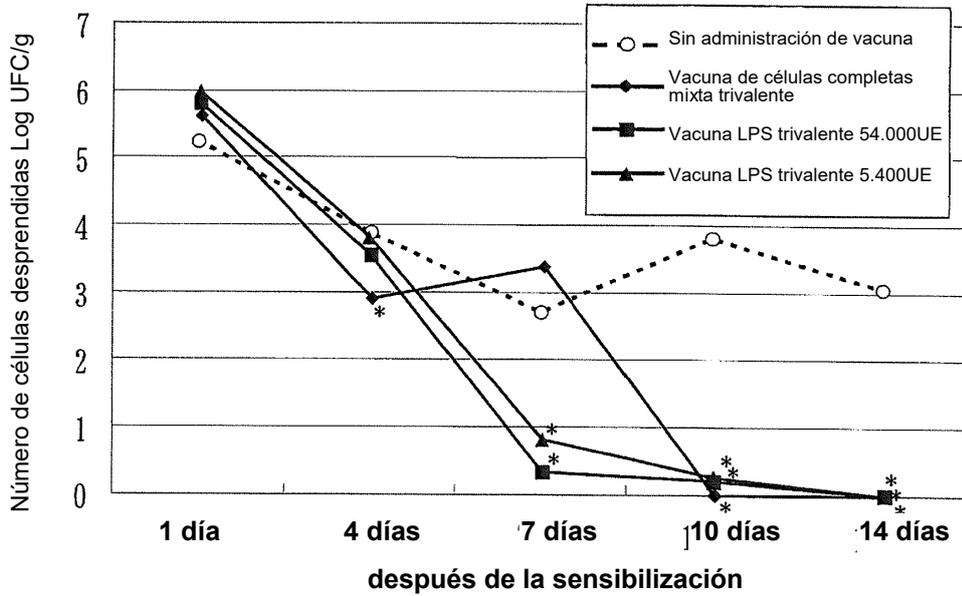


Fig. 5

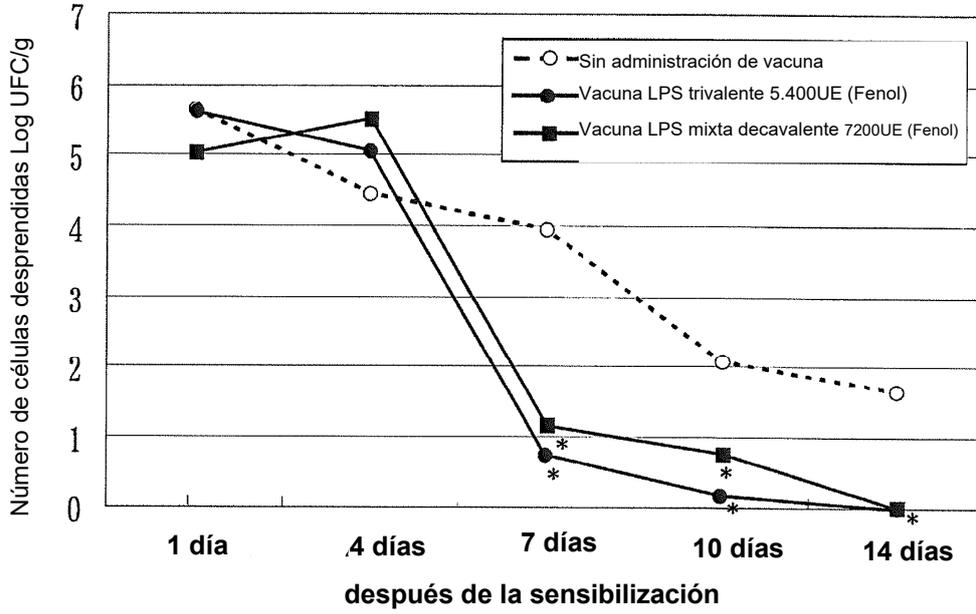


Fig. 6

