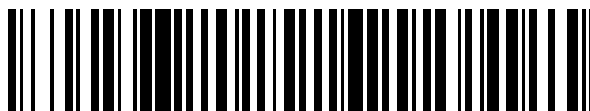


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 520 026**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)	C07H 21/04	(2006.01)
A61K 39/02	(2006.01)		
A61K 39/112	(2006.01)		
A61K 49/00	(2006.01)		
C12P 1/00	(2006.01)		
C12P 21/06	(2006.01)		
C12N 1/00	(2006.01)		
C12N 15/00	(2006.01)		
C12N 15/74	(2006.01)		
C07H 21/02	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2007 E 07842706 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2066339**

54 Título: **Composiciones y métodos para potenciar respuestas inmunitarias**

30 Prioridad:

18.09.2006 US 825983 P

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

11.11.2014

73 Titular/es:

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS (50.0%)
2404 N. University Avenue
Little Rock, AR 72207, US y
THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM (50.0%)

72 Inventor/es:

BOTTJE, WALTER;
HARGIS, BILLY;
BERGHMAN, LUC;
KWON, YOUNG MIN;
COLE, KIMBERLY;
COX, MANDY y
LAYTON, SHERRYLL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 520 026 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

Composiciones y métodos para potenciar respuestas inmunitarias

5 **Solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/825.983, presentada el 18 de septiembre de 2006.

10 **Declaración con respecto a la investigación patrocinada por el gobierno federal**

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno de los Estados Unidos otorgado por la subvención de los Institutos Nacionales de la Salud R21 AI063137. Los Estados Unidos pueden tener ciertos derechos en la presente invención.

15 **Introducción**

La infección por virus de la gripe, particularmente gripe aviar H5N1, constituye una preocupación sanitaria y económica creciente. Las pruebas indican claramente que H5N1 continua circulando entre aves y cerdos susceptibles en regiones crecientes del mundo. Muchos científicos creen que si permanece incontrolada, la gripe aviar H5N1 actual mutará hasta permitir la transmisión entre seres humanos y provocar una pandemia global. Con una tasa de mortalidad de más del 50 %, dicho brote sería devastador. Independientemente de la capacidad del virus para provocar enfermedad humana, la gripe aviar H5N1 ya amenaza tener una repercusión económica enorme debido a la erradicación de poblaciones de aves de corral en áreas afectadas. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de una vacuna para proteger a seres humanos, aves de corral, cerdos y otros animales domesticados de la gripe H5N1. Una vacuna de la gripe que es capaz de proteger contra H5N1 así como otros virus de la gripe sería óptima.

30 VEGA MARIO I ET AL., IMMUNOLOGY, vol. 110, nº 2, octubre de 2003, páginas 206-216 describe una proteína de fusión OmpC de *Salmonella typhi* que expresa la cadena de aminoácidos de CD154 Trp140-Ser149. Los autores indican que la proteína de fusión se une con CD40 y activa una línea de linfocitos B de linfoma.

35 El documento WO2006/1105972 describe un organismo transgénico que expresa un ácido nucleico que codifica CD40L, y usos del mismo como medicamento o como una vacuna. También se desvelan una composición farmacéutica o vacuna que comprende dicho organismo transgénico, métodos para tratar a un sujeto infectado con dicho organismo, y métodos para estimular una respuesta inmunitaria contra una enfermedad o enfermedades provocadas por dicho organismo en un sujeto que lo necesite.

40 **Sumario**

Se desvelan cepas 13A de *Salmonella enteritidis* que tienen los números de depósito de ATCC PTA-7871, PTA-7872 o PTA-7873. También se desvela una composición que comprende una cepa de *Salmonella* atenuada y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 En otro aspecto, se proporcionan métodos para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto administrando un vector de vacuna al sujeto. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de CD 154 capaz de unirse con CD40, teniendo el polipéptido menos de 50 aminoácidos y comprendiendo los aminoácidos 140-149 de SEC ID N°: 26 o un homólogo del mismo. El vector de vacuna se administra al sujeto en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto a la vacuna.

50 En un aspecto adicional, se proporcionan métodos para potenciar la respuesta inmunitaria contra la gripe A en un sujeto administrando al sujeto una bacteria que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de proteína M2e de gripe A en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto a la gripe A.

55 En otro aspecto más, se proporcionan métodos para reducir la morbilidad asociada con la infección por gripe A en un sujeto administrando al sujeto una bacteria que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de proteína M2e de gripe A en una cantidad eficaz para reducir la morbilidad asociada con una infección posterior con gripe A.

60 En otro aspecto más, se proporcionan métodos para generar mutaciones específicas de sitio en una bacteria. Se genera un primer polinucleótido que comprende un marcador de contraselección y un marcador de resistencia a antibióticos flanqueado por polinucleótidos homólogos de las secuencias que flanquean un sitio de mutación en el cromosoma de la bacteria. El primer polinucleótido se introduce después en la bacteria y después de recombinación homóloga y selección de antibióticos se aísla un intermedio. Se genera un segundo polinucleótido que comprende la mutación flanqueada por polinucleótidos homólogos de secuencias que flanquean el sitio de mutación. El segundo polinucleótido se introduce después en el intermedio y el mutante específico de sitio se aísla por contraselección con

respecto a pérdida del marcador de contraselección.

En un aspecto adicional más, se proporcionan métodos para desarrollar vectores de vacuna bacteriana. Se selecciona una bacteria capaz de colonizar un sujeto. La bacteria se atenúa y se incorpora un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un polipéptido de CD 154 capaz de unirse con CD40 en la bacteria.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa el esquema para realizar mutaciones dirigidas en *Salmonella enteritidis*.

La Figura 2 representa el esquema de diseño del método de PCR de extensión solapante usado para generar las inserciones de M2e y M2e-CD154 en el bucle 9 del polinucleótido *lamB*.

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra la cantidad relativa de anticuerpo en suero generado en los puntos temporales indicados en respuesta a la administración del tratamiento indicado.

La Figura 4 es un gráfico de líneas que muestra la cantidad de anticuerpo en suero a lo largo del tiempo después de la administración de los tratamientos indicados.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la morbilidad de pollos después de vacunación con SE HM el día de la eclosión, refuerzo el día 21 e infección de exposición con una gripe A de baja patogenicidad a los 32 días después de la eclosión.

La Figura 6 es un gráfico que muestra difusión viral los días 2 y 4 después de la exposición a una gripe A de baja patogenicidad después de la vacunación con SE HM el día de la eclosión, refuerzo el día 21 e infección de exposición el día 32 después de la eclosión.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la morbilidad de pollos después de vacunación con SE HM el día de la eclosión, refuerzo el día 21 e infección de exposición con una gripe A de alta patogenicidad el día 32 después de la eclosión.

La Figura 8 es un gráfico que muestra difusión viral los días 2 y 4 después de la exposición a una gripe A de alta patogenicidad después de la vacunación con SE HM el día de la eclosión, refuerzo el día 21 e infección de exposición el día 32 después de la eclosión.

Descripción detallada

Las tecnologías de ADN recombinante permiten una manipulación relativamente fácil de muchas especies bacterianas y virales. Algunas bacterias y virus son levemente patógenos o no patógenos, pero son capaces de generar una respuesta inmunitaria robusta. Estas bacterias y virus hacen atractivos los vectores de vacunas para inducir una respuesta inmunitaria a un antígeno heterólogo o ajeno. Los vectores de vacuna bacteriana o viral pueden imitar la infección natural y producen inmunidad robusta y de larga duración. Los vectores de vacunas son con frecuencia relativamente económicos de producir y administrar. Además, dichos vectores pueden con frecuencia portar más de un antígeno y pueden proporcionar protección contra múltiples agentes infecciosos.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de vectores de Salmonela en la vacunación y generación de respuestas inmunitarias contra Salmonela y otros agentes patógenos. Las cepas de Salmonela son vectores de vacuna adecuados debido a la capacidad de hacer a las bacterias capaces de expresar polipéptidos heterólogos. Además, los genes bacterianos pueden mutarse o atenuarse para crear bacterias con de baja a ninguna patogénesis para el sujeto infectado o inmunizado, manteniendo al mismo tiempo la inmunogenicidad.

La capacidad de la Salmonela para sobrevivir al tracto gastrointestinal del hospedador y dar lugar a una respuesta inmunitaria mucosa está documentada. Las vacunas orales que usan un vector de Salmonela producen una respuesta inmunitaria mucosa robusta y son relativamente fáciles de administrar tanto a animales como a seres humanos. Muchas de las cepas de vacuna de Salmonela actuales no son tan eficaces en la generación de una respuesta inmunitaria protectora fuerte en comparación con sus homólogos más virulentos. Una cepa de Salmonela que pudiera usarse para vacunación mucosa, por ejemplo, oral, eficaz proporcionaría un vector que podría usarse para vacunar fácilmente a un sujeto contra uno o más patógenos, tales como gripe H5N1.

Se describen una cepa de *Salmonella enteritidis* útil como un vector de vacuna y diversos vectores de vacuna recombinantes preparados usando esta cepa. Específicamente, se proporciona un vector de vacuna que porta el epítipo de M2e del virus de la gripe A. Además, se desvelan métodos para desarrollar vectores de vacuna y métodos para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto administrando un vector de vacuna que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de CD154 o un homólogo del mismo que es capaz de unirse con CD40. Los vectores de vacuna pueden usarse para potenciar una respuesta inmunitaria contra la gripe A o para reducir la morbilidad asociada con la infección por gripe A. Finalmente, se proporciona un método para generar mutaciones específicas de sitio en una bacteria usando el sistema de recombinación Red junto con PCR de extensión solapante para generar mutantes que no contienen ADN ajeno.

Se seleccionó un aislado de tipo silvestre de Salmonela, *Salmonella enteritidis* 13A (SE13A) (depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) el 13 de septiembre de 2006, número de depósito PTA-7871), basándose en su capacidad poco habitual para provocar colonización de la mucosa y translocación submucosa en pollos, permitiendo una presentación robusta de antígenos o epítopos asociados en pollos comerciales. Resulta

importante que este aislado de Salmonela de tipo silvestre no provoca ninguna enfermedad clínicamente detectable o pérdida de rendimiento en pollos comerciales, lo que indica poco potencial para provocar enfermedad de la Salmonela de tipo silvestre en animales vertebrados. La capacidad de un organismo para colonizar un sujeto, tal como un pollo, se indica por la capacidad del organismo para replicarse en el sitio de infección. Óptimamente, un candidato a vacuna también puede invadir y propagarse a tejidos más allá del sitio de infección. Como se demuestra en el Ejemplo 4, SE13A tiene capacidad de replicación en las amígdalas cecales después de infección oral y puede aislarse de las amígdalas durante semanas después de la infección. Además, SE13A puede invadir otros tejidos, y se encuentra en el hígado y el bazo hasta un mes después de la infección.

El aislado de SE13A puede atenuarse adicionalmente inactivando al menos un gen necesario para replicación sostenida de las bacterias fuera de las condiciones de laboratorio o fabricación. Se describen posteriormente cepas de Salmonela atenuadas que pueden usarse como vectores de vacuna. SE13A se usó para generar cepas de Salmonela atenuadas para desarrollar vacunas y generar respuestas inmunitarias potenciadas. Como se demuestra en los Ejemplos, SE13A es invasiva, no patógena para las aves de corral y no provoca ninguna morbilidad medible. Estas características dan como resultado una respuesta inmunitaria potenciada en comparación con vectores bacterianos no invasivos. La atenuación de SE13A por mutación de genes que limitan la capacidad de la bacteria para propagarse puede aumentar la seguridad de la vacuna. Como se demuestra en los Ejemplos en la Tabla 4, las cepas de SE13A con mutaciones en *aroA* o *htrA* conservan la capacidad para generar una respuesta inmunitaria, pero tienen replicación limitada en el hospedador. Por lo tanto, la atenuación aumenta la seguridad del vector de vacuna sin comprometer la inmunogenicidad.

Pueden realizarse mutaciones en otros diversos genes de Salmonela incluyendo, pero sin limitación, *cya*, *crp*, *asd*, *cdt*, *phoP*, *phoQ*, *ompR*, proteínas de membrana externa, *dam*, *htrA* u otros genes relacionados con el estrés, *aro*, *pur* y *gua*. Como se muestra en los Ejemplos, se descubrió que las mutaciones en *aroA* y *htrA* atenuaban SE13A. Los genes *aro* son enzimas implicadas en la ruta de la biosíntesis del siquimato o la ruta de la aromataza y los mutantes de *aro* son auxotróficos para los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina. *htrA* es un gen de respuesta a estrés que codifica una proteasa periplásmica que degrada proteínas aberrantes. Los mutantes en *htrA* también están atenuados y presentan sensibilidad aumentada al peróxido de hidrógeno.

Las mutaciones en *aroA* y *htrA* descritas en los Ejemplos son mutaciones de delección, pero las mutaciones pueden realizarse de diversas maneras. Convenientemente, las mutaciones son mutaciones no reversibles que no pueden repararse en una única etapa. Las mutaciones adecuadas incluyen delecciones, inversiones, inserciones y sustituciones. Un vector de vacuna puede incluir más de una mutación, por ejemplo un vector de vacuna puede contener mutaciones tanto en *aroA* como en *htrA*. Se conocen bien en la técnica métodos para realizar dichas mutaciones.

SE13A o los derivados de SE13A recombinantes atenuados pueden usarse como vectores de vacuna. Pueden insertarse polinucleótidos que codifican epítomos polipeptídicos de cualquier variedad de organismos patógenos en las bacterias y expresarse por las bacterias para generar polipéptidos antigénicos. Los polinucleótidos pueden insertarse en el cromosoma de las bacterias o codificarse en plásmidos u otro ADN extracromosómico. Convenientemente, se insertan polinucleótidos que codifican epítomos en un polinucleótido bacteriano que se expresa. Convenientemente, el polinucleótido bacteriano codifica una proteína transmembrana, y el polinucleótido que codifica el epítomo se inserta en la secuencia polinucleotídica bacteriana para permitir la expresión del epítomo en la superficie de las bacterias. Por ejemplo, el polinucleótido que codifica el epítomo puede insertarse en fase en el polinucleótido bacteriano en una región que codifica una región de bucle externo de una proteína transmembrana de modo que la secuencia polinucleotídica bacteriana permanece en fase. Véase Ejemplo 1.

Como alternativa, el polinucleótido que codifica el epítomo puede insertarse en un polipéptido secretado. Los expertos en la materia apreciarán que el polinucleótido que codifica el epítomo podría insertarse en una amplia diversidad de polinucleótidos bacterianos para proporcionar la expresión y presentación del epítomo a las células inmunitarias de un sujeto tratado con el vector de vacuna bacteriana. En los Ejemplos, se insertó un epítomo de M2e de virus de la gripe A en el bucle 9 del gen *lamB* de SE13A y se confirmó la expresión en superficie del epítomo por precipitación mediada por anticuerpos. El polinucleótido que codifica un epítomo puede incluirse en una única copia o más de una copia. En los Ejemplos, se describe un vector de vacuna bacteriana que contiene múltiples copias del epítomo de M2e insertado en el bucle 9 de *lamB*. Como alternativa, pueden insertarse múltiples copias de un epítomo en el vector de vacuna bacteriana en más de una localización.

También pueden insertarse polinucleótidos que codifican polipéptidos que son homólogos de proteínas del sujeto y capaces de estimular el sistema inmunitario para responder al epítomo ajeno en un vector de vacuna. Como se describe en más detalle posteriormente, un vector de vacuna puede incluir un polipéptido de CD154 que es capaz de unirse con CD40 en el sujeto y estimular al sujeto para responder al vector de vacuna y su epítomo ajeno asociado. Como se ha descrito anteriormente con respecto a epítomos, estos polinucleótidos pueden insertarse en el cromosoma del vector de vacuna o mantenerse de forma extracromosómica. Un experto en la materia apreciará que estos polipéptidos pueden insertarse en diversos polinucleótidos y expresarse en partes diferentes del vector de vacuna o pueden secretarse. El polinucleótido que codifica un polipéptido de CD 154 capaz de potenciar la respuesta inmunitaria a un epítomo ajeno también puede codificar el epítomo ajeno. El polinucleótido que codifica un

polipéptido de CD 154 puede estar unido con el polinucleótido que codifica el epítipo, de modo que en el vector de vacuna el polipéptido de CD 154 y el epítipo ajeno están presentes en el mismo polinucleótido. En los ejemplos, un polinucleótido que codifica un polipéptido de CD 154 que es capaz de unirse con CD40 también codifica el epítipo de M2e de la gripe A. Véase SEC ID N°: 8 y 9 en el listado de secuencias adjunto. En los ejemplos, el polinucleótido que codifica el epítipo de M2e y el polinucleótido que codifica el polipéptido de CD 154 se insertan ambos en el bucle 9 del gen *lamB*. Los expertos en la materia apreciarán que también pueden usarse polinucleótidos bacterianos que codifican otras proteínas transmembrana y otros bucles del gen *lamB*.

Las bacterias SE13A pueden incluir un polinucleótido que codifica un polipéptido de la proteína M2 de la gripe. El ectodominio de la proteína M2 del virus de la gripe A, conocido como M2e, protruye de la superficie del virus. La parte M2e de la proteína M2 contiene aproximadamente 24 aminoácidos. El polipéptido M2e varía poco de un aislado al siguiente dentro de una especie dada. De hecho, solamente algunas mutaciones de origen natural en M2e se han aislado de seres humanos infectados desde la epidemia de gripe de 1918. Además, los virus de la gripe aislados de huéspedes aviares y porcinos tienen secuencias de M2e diferentes, pero aún conservadas. Para revisiones de las secuencias del polipéptido M2e aisladas de hospedadores humanos, aviares y porcinos véase Liu *et al.*, *Microbes and Infection* 7: 171-177 (2005) y Reid *et al.*, *J. Virol.* 76: 10717-10723 (2002). Véase también SEC ID N°: 1-4 en el listado de secuencias adjunto.

Convenientemente puede insertarse un polinucleótido que codifica el polipéptido M2e completo en el vector de vacuna o puede usarse solamente una parte. En los Ejemplos, se incorporó un polipéptido de ocho aminoácidos (LM2 que tiene la secuencia de aminoácidos: EVETPIRN, SEC ID N°: 5 o su variante M2eA que tiene la secuencia de aminoácidos EVETPTRN, SEC ID N°: 20) en SE13A y se demostró que producía una respuesta de anticuerpo después de la administración a pollos. Convenientemente, la parte del polipéptido M2e insertada en el vector de vacuna es inmunogénica. Un fragmento inmunogénico es un péptido o polipéptido capaz de inducir una respuesta inmunitaria celular o humoral. Convenientemente, un fragmento inmunogénico de M2e puede ser el polipéptido M2e de longitud completa, o convenientemente puede ser 20 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos u 8 o más aminoácidos de la secuencia de longitud completa.

Otros epítipos adecuados para inclusión en un vector de vacuna de gripe A incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos que codifican polipéptidos de la hemaglutinina o la proteína nuclear de la gripe A. Por ejemplo, pueden incluirse polinucleótidos que codifican SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 22, SEC ID N°: 23 o SEC ID N°: 24 en un vector de vacuna. Un experto en la materia apreciará que puede usarse cualquiera de estas secuencias en combinación con cualquier otro epítipo y también puede usarse junto con polipéptidos que codifican péptidos inmunoestimuladores tales como un polipéptido de CD154.

Como se ha analizado anteriormente, puede incluirse en el vector de vacuna un polinucleótido que codifica un polipéptido homólogo de una proteína del sujeto que es capaz de potenciar la respuesta inmunitaria al epítipo. En los Ejemplos, se demostró que las cepas de SE13A que incluían un polinucleótido que codificaba un polipéptido de CD154 capaz de unirse con CD40 potenciaban la respuesta inmunitaria al epítipo de M2e como se mide por producción de anticuerpos aumentada en respuesta a la vacunación. Convenientemente, el polipéptido de CD154 es de menos de 50 aminoácidos de longitud, más convenientemente menos de 40, menos de 30 o menos de 20 aminoácidos de longitud. El polipéptido puede ser de entre 10 y 15 aminoácidos, entre 10 y 20 aminoácidos o entre 10 y 25 aminoácidos de longitud. La secuencia de CD154 y región de unión a CD40 no están altamente conservadas entre las diversas especies. Las secuencias de CD 154 de pollo y ser humano se proporcionan en SEC ID N°: 25 y SEC ID N°: 26, respectivamente.

Las regiones de unión a CD40 de CD 154 se han determinado para varias especies, incluyendo ser humano, pollo, pato, ratón y vaca y se muestran en SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 27, SEC ID N°: 28, SEC ID N°: 29, respectivamente. Aunque hay variabilidad en las secuencias en la región de unión a CD40 entre especies, los ejemplos posteriores indican que el polipéptido de CD 154 humano era capaz de potenciar la respuesta inmunitaria en pollos. Por lo tanto, se pueden usar polipéptidos de CD154 específicos de especie o un polipéptido de CD154 heterólogo.

En los Ejemplos, se generaron varias bacterias recombinantes SE13A. En cada una de las cepas de SE13A el polipéptido M2e y el polipéptido de CD154 estaban codificados en el mismo polinucleótido y estaban en fase entre sí y con el polinucleótido de *Salmonella* en el que se insertaron. En realizaciones alternativas, el polipéptido de CD 154 y el polipéptido M2e pueden codificarse por polinucleótidos distintos. SE13A *aroA* M2e contiene una delección en *aroA* y el epítipo LM2-M2e (SEC ID N°: 5) insertado en el bucle 9 de *lamB*. SE13A *aroA* M2e-CD154 es el mismo que SE13A *aroA* M2e, pero también contiene el péptido CD154 (SEC ID N°: 6) insertado en el bucle 9 de *lamB* con el epítipo de M2e (véase SEC ID N°: 8). Esta cepa está depositada en la ATCC con el número de depósito PTA-7872.

SE13A *htrA* M2E contiene una delección en *htrA* y tiene el epítipo M2e-LM2 insertado en el bucle 9 de *lamB*. SE13A *htrA* M2E-CD154 tiene el péptido CD154 insertado en el bucle 9 de *lamB* con el epítipo de M2e (SEC ID N°: 8) y está depositado en la ATCC como la cepa PTA-7873.

La cepa designada SE13A HM contiene SEC ID N°: 9 insertada en el bucle 9 de *lamB*. Esta cepa contiene múltiples copias de dos epítomos de M2e, denominados M2e-LM2 (SEC ID N°: 5) y M2eA (SEC ID N°: 20) y el polipéptido de CD154 (SEC ID N°: 6).

5 En los Ejemplos, se mostró que las cepas de Salmonela recombinantes anteriormente descritas producían títulos de anticuerpos altos, potencialmente protectores contra el epítomo de M2e de virus de la gripe. Además, se mostró que la expresión de la molécula inmunoestimuladora aumentaba adicionalmente los títulos de anticuerpo, confirmando la funcionalidad de este concepto y estos vectores de vacuna bacteriana particulares.

10 También se proporcionan composiciones que comprenden una cepa de Salmonela atenuada y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es cualquier vehículo adecuado para administración *in vivo*. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir agua, soluciones tamponadas, soluciones de glucosa o líquidos de cultivo bacteriano. Los componentes adicionales de las composiciones pueden incluir convenientemente excipientes tales como estabilizadores, conservantes, diluyentes, emulsionantes y lubricantes. Los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen estabilizadores tales como carbohidratos (por ejemplo, sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas tales como albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas tales como suero bovino o leche desnatada y tampones (por ejemplo, tampón de fosfato). Especialmente cuando se añaden dichos estabilizadores a las composiciones, la composición es adecuada para liofilización o secado por pulverización.

20 También se proporcionan métodos para potenciar respuestas inmunitarias en un sujeto administrando un vector de vacuna que contiene un polipéptido de CD 154 capaz de unirse con CD40 y activar CD40. El vector de vacuna que comprende el polinucleótido que codifica un polipéptido de CD154 capaz de unirse con CD40 se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto a la vacuna. Convenientemente, el vector de vacuna contiene un polinucleótido que codifica un polipéptido que incluye los aminoácidos 140-149 del polipéptido de CD 154 humano (SEC ID N°: 26) o un homólogo del mismo. Se identifican en el presente documento varios polipéptidos adecuados. Convenientemente, el polinucleótido codifica un polipéptido de CD154 de la misma especie que el sujeto. Convenientemente, se usa un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 6 en sujetos humanos, se usa un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 7 en pollos, se usa un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 27 en patos, se usa un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 28 en ratones y se usa un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEC ID N°: 29 en vacas. En los Ejemplos, se usa el polipéptido de CD154 humano (SEC ID N°: 6) en un vector de vacuna de pollo y se demuestra que potencia la respuesta inmunitaria a un antígeno ajeno. Por lo tanto, otras combinaciones heterólogas de polipéptidos de CD 154 y sujetos pueden ser útiles en los métodos. El polipéptido de CD154 puede usarse para potenciar la respuesta inmunitaria en el sujeto a cualquier antígeno o polipéptido antigénico ajeno presente en el vector de vacuna. Un experto en la materia apreciará que el polipéptido de CD154 podría usarse para potenciar la respuesta inmunitaria a más de un polipéptido antigénico presente en un vector de vacuna.

40 El polipéptido de CD154 estimula una respuesta inmunitaria al menos en parte uniéndose con su receptor, CD40. En los Ejemplos, se utilizó un polipéptido homólogo del CD154 expresado en células inmunitarias del sujeto y que es capaz de unirse con el receptor de CD40 en macrófagos y otras células presentadoras de antígenos. La unión de este complejo ligando-receptor estimula que los macrófagos (y células de linaje de macrófagos tales como células dendríticas) potencien la fagocitosis y presentación de antígenos aumentando a la vez las secreciones de citocinas que se sabe que activan otras células inmunitarias locales (tales como linfocitos B). Como tales, las moléculas asociadas con el péptido de CD 154 son dianas preferentes para la respuesta inmunitaria y producción de anticuerpos expandida.

50 Los vectores de vacuna potenciales para su uso en los métodos incluyen, pero sin limitación, *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*), *Shigella*, *Escherichia* (*E. coli*), *Yersinia*, *Bordetella*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* (*Vibrio cholerae*), *Listeria*, adenovirus, poxvirus, herpesvirus, alfavirus y virus adenoasociados.

Además, se desvelan métodos para potenciar una respuesta inmunitaria contra gripe A y métodos para reducir la morbilidad asociada con la infección por gripe A posterior. Brevemente, los métodos comprenden administrar a un sujeto una bacteria que comprende una secuencia polinucleotídica de M2e de gripe A que codifica un polipéptido M2e de gripe A en una cantidad eficaz. Los polipéptidos de M2e incluyen SEC ID N°: 1-5 y 20. La inserción de los polipéptidos de M2e en la bacteria puede conseguirse de diversas maneras conocidas por los expertos en la materia, incluyendo pero sin limitación el sistema de mutación dirigida sin cicatrices descrito en el presente documento. La bacteria también puede modificarse por ingeniería genética para expresar los polipéptidos de M2e junto con polinucleótidos capaces de potenciar la respuesta inmunitaria como se ha analizado anteriormente, tales como en SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 9. En particular, un polipéptido de CD 154 capaz de unirse con CD40 puede expresarse por la bacteria para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto al polipéptido M2e.

65 La dosificación útil para administrar variará dependiendo de la edad, peso y especie del sujeto, el modo y vía de administración y el tipo de patógeno contra el que se busca una respuesta inmunitaria. La composición puede administrarse en cualquier dosis de bacterias suficiente para inducir una respuesta inmunitaria. Se prevé que son adecuadas dosis que varían de 10^3 a 10^{10} bacterias, de 10^4 a 10^9 bacterias o de 10^5 a 10^7 bacterias. La composición

puede administrarse solamente una vez o puede administrarse dos o más veces para aumentar la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la composición puede administrarse dos o más veces separadas por una semana, dos semanas o tres o más semanas. Las bacterias son viables convenientemente antes de la administración, pero en algunas realizaciones las bacterias pueden destruirse antes de la administración. En algunas realizaciones, las bacterias pueden ser capaces de replicarse en el sujeto, mientras que en otras realizaciones las bacterias pueden no ser capaces de replicarse en el sujeto.

Para la administración a animales o seres humanos, las composiciones pueden administrarse por diversos medios incluyendo, pero sin limitación, por vía intranasal, por vía mucosa, por pulverización, por vía intradérmica, por vía parenteral, por vía subcutánea, por vía oral, por aerosol o por vía intramuscular. Son adicionalmente adecuadas la administración por colirio o la adición a agua para beber o alimentos. Para los pollos, las composiciones pueden administrarse en el huevo.

Algunas realizaciones proporcionan métodos para potenciar respuestas inmunitarias en un sujeto. Un sujeto incluye, pero sin limitación, un vertebrado, convenientemente un mamífero, convenientemente un ser humano, o aves, convenientemente aves de corral tales como pollos. También pueden usarse otros modelos animales de infección. La potenciación de una respuesta inmunitaria incluye, pero sin limitación, inducir un efecto terapéutico o profiláctico que está mediado por el sistema inmunitario del sujeto. Específicamente, la potenciación de una respuesta inmunitaria puede incluir producción potenciada de anticuerpos, tal como se demuestra en la Figura 3 y la Figura 4, cambio de clase potenciada de cadenas pesadas de anticuerpo, maduración de células presentadoras de antígenos, estimulación de linfocitos T auxiliares, estimulación de linfocitos T citolíticos o inducción de linfocitos T y B de memoria.

Se prevé que pueden administrarse varios epítomos o antígenos del mismo o diferentes patógenos en combinación en un único vector de vacuna para generar una respuesta inmunitaria potenciada contra múltiples antígenos. Los vectores de vacuna recombinantes pueden codificar antígenos de múltiples microorganismos patógenos, virus o antígenos asociados con tumores. La administración de vectores de vacuna capaces de expresar múltiples antígenos tiene la ventaja de inducir inmunidad contra dos o más enfermedades al mismo tiempo. Por ejemplo, las bacterias atenuadas vivas, tales como *Salmonella enteritidis* 13A, proporcionan un vector de vacuna adecuado para inducir una respuesta inmunitaria contra múltiples antígenos.

Pueden insertarse polinucleótidos heterólogos que codifican antígenos en el genoma bacteriano en cualquier sitio no esencial o como alternativa puede llevarse a cabo en un plásmido usando métodos bien conocidos en la técnica. Un sitio adecuado para la inserción de polinucleótidos está dentro de partes externas de proteínas transmembrana o acoplado con secuencias que dirigen el polinucleótido heterólogo para rutas secretoras. Un ejemplo de una proteína transmembrana adecuada para inserción de polinucleótidos es el gen *lamB*. En los Ejemplos, se insertaron polinucleótidos de CD 154 y M2e en el bucle 9 de la secuencia de *lamB*.

Los polinucleótidos heterólogos incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos que codifican antígenos seleccionados de microorganismos patógenos o virus distintos del vector de vacuna. Dichos polinucleótidos pueden derivar de virus patógenos tales como gripe (por ejemplo, M2e, hemaglutinina o neuraminidasa), herpesvirus (por ejemplo, los genes que codifican las proteínas estructurales de herpesvirus), retrovirus (por ejemplo, la proteína de envoltura gp160), adenovirus, paramixovirus, coronavirus y similares. También pueden obtenerse polinucleótidos heterólogos a partir de bacterias patógenas, por ejemplo, genes que codifican proteínas bacterianas tales como toxinas, y proteínas de membrana externa. Además, los polinucleótidos heterólogos de parásitos, tales como *Eimeria* son candidatos atractivos para el uso de una vacuna de vector.

También pueden incluirse polinucleótidos que codifican polipéptidos implicados en el desencadenamiento del sistema inmunitario en un vector de vacuna, tal como una vacuna de *Salmonella* atenuada viva. Los polinucleótidos pueden codificar moléculas del sistema inmunitario conocidas por sus efectos estimuladores, tales como una interleucina, Factor de Necrosis Tumoral o un interferón, u otro polinucleótido implicado en la regulación inmunitaria. El vector de vacuna también puede incluir polinucleótidos que codifican péptidos que se sabe que estimulan una respuesta inmunitaria, tal como el polipéptido de CD 154 descrito en el presente documento.

Se proporciona un método para generar mutaciones específicas de sitio en una bacteria que es un miembro de la familia Enterobacteriaceae. El método como se ejemplifica hace uso de PCR de extensión solapante, el sistema de recombinasa Red, y una inserción intermediaria del sitio de reconocimiento de endonucleasa I-SceI como un marcador de contraselección. Como alternativa, también puede usarse *sacB* como un marcador de contraselección. La estrategia general se muestra en la Figura 1. Se usó PCR de extensión solapante para producir ADN lineal con homología flanqueante larga con el genoma de SE13A. Se usó el sistema de recombinasa Red para mediar en la recombinación entre ADN lineal entrante, generado por PCR, con el genoma bacteriano. En el proceso de mutación de dos etapas, se insertó en primer lugar el casete de sitio I-SceI/Km^r en el cromosoma en el gen *lamB* por recombinación homóloga. Después, esta mutación se reemplazó con las secuencias de inserción deseadas (LM2-M2e, CD154s o secuencias de combinación). Para realizar el reemplazo, se añadió un producto de PCR que portaba la secuencia de inserción deseada simultáneamente con un plásmido que codificaba la enzima endonucleasa I-SceI usada para contraselección entre la primera y segunda mutaciones.

El procedimiento para generar mutantes dirigidos puede usarse en cualquier miembro de la familia Enterobacteriaceae. La familia Enterobacteriaceae incluye, pero sin limitación, miembros de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* y *Yersinia*. Un mutante dirigido incluye pero sin limitación mutaciones de inserción, delección, sustitución y reemplazo dirigidas a una localización específica en el cromosoma de las bacterias. La ventaja del sistema actual es que da como resultado una mutación “sin cicatriz” o una mutación que no contiene ninguna secuencia ajena. Por lo tanto, la mutagénesis dirigida desvelada en el presente documento puede usarse para generar bacterias autólogas en las que se suprime un único gen o incluso un único aminoácido o nucleótido.

En los Ejemplos, los polinucleótidos se generaron por PCR de extensión solapante, pero un experto en la materia apreciará que están disponibles y podrían utilizarse otros métodos para generar polinucleótidos lineales. El primer y segundo polinucleótidos lineales deben contener alguna secuencia homóloga de la secuencia flanqueante del sitio de mutación para permitir la recombinación mediada por Red. La cantidad de secuencia homóloga puede comprender menos de 300 pares de bases en uno de los lados del sitio de mutación. Convenientemente la secuencia homóloga es de menos de 200 pares de bases. Los polinucleótidos pueden introducirse en las bacterias por cualquier método conocido por los expertos en la materia. En los ejemplos, los polinucleótidos lineales se introdujeron por electroporación en las bacterias.

También se proporcionan métodos para desarrollar un vector de vacuna bacteriana. En primer lugar, se selecciona una bacteria capaz de colonizar un sujeto. Después, la bacteria se atenúa para generar una bacteria atenuada. La atenuación puede realizarse por diversos métodos conocidos por los expertos en la materia. Finalmente, se incorpora una secuencia polinucleotídica de CD154 que codifica un polipéptido de CD154 capaz de unirse con CD40 en la bacteria atenuada para generar un vector de vacuna. El polipéptido de CD154 puede ser de menos de 50 aminoácidos de longitud y comprenderá los aminoácidos 140-149 de CD154, SEC ID N°: 26 o un homólogo del mismo. El vector de vacuna bacteriana también puede incorporar una segunda secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido antigénico. En una realización, el polipéptido de CD 154 y el polipéptido antigénico están codificados en la misma secuencia polinucleotídica.

Se pretende que los siguientes ejemplos sean solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitaciones del alcance de la invención o de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de insertos de M2e y M2e/CD154.

Cepas y condiciones de cultivo

Todos los plásmidos se mantuvieron en primer lugar en células *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) a no ser que se describa de otro modo. Se usó *Salmonella enteritidis* 13A para introducción de mutaciones. La cepa de *Salmonella enteritidis* 13A era un aislado de campo disponible de USDA/APHIS/NVSL y depositado en la ATCC con el número de depósito PTA-7871. Se cultivaron bacterias que portaban el plásmido pKD46 a 30 °C. Se cultivaron otras bacterias a 37 °C. Se realizó curación de plásmidos a 37 °C.

Se usó medio Luria-Bertani (LB) para cultivo rutinario de células, y se usó medio SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para expresión fenotípica después de la electroporación. Cuando fue apropiado, se añadieron los siguientes antibióticos al medio: ampicilina (Amp) a 100 µg/ml, kanamicina (Km) a 50 µg/ml y cloranfenicol (Cm) a 25 µg/ml.

Plásmidos

Los plásmidos pKD46, pKD13 y pBC-I-SceI se han descrito previamente (Datsenko y Wanner, PNAS 2000, 97: 6640-6645 y Kang *et al.*, J Bacteriol 2004, 186: 4921-4930). El plásmido pKD46 codifica enzimas recombinasas Red que median en la recombinación homóloga del ADN lineal entrante con ADN cromosómico. Este plásmido también contiene el gen de resistencia a Ampicilina y es sensible a temperatura de modo que requiere 30 °C para su mantenimiento en la célula. El plásmido pKD13 actuó como un molde para amplificación del gen de resistencia a Km (Km^r) usado en PCR solapante. El plásmido pBC-I-SceI, que se mantiene en la célula a 37 °C, produce la enzima I-SceI, que escinde la siguiente secuencia de reconocimiento poco común, de 18 pares de bases: 5'-TAGGGATAACAGGGTAAT-3' (SEC ID N°: 30). El plásmido pBC-I-SceI también contiene el gen de resistencia a cloranfenicol (Cm^r).

PCR

Todos los cebadores usados para PCR están enumerados en la Tabla 1. Normalmente, se realizó PCR usando aproximadamente 0,1 µg de ADN purificado genómico, plasmídico o generado por PCR (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos), tampón de polimerasa *Pfu* clonado 1x, polimerasa *Pfu* 5U (Stratagene La Jolla, CA, Estados Unidos), dNTP 1 mM (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ), y 1,2 µM de cada cebador en un

5 volumen total de 50 μ l. Se usó el termociclador DNA engine (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) con las siguientes condiciones de amplificación: 94 $^{\circ}$ C durante 2 minutos; 30 ciclos de 94 $^{\circ}$ C durante 30 segundos, 58 $^{\circ}$ C durante 60 segundos, 72 $^{\circ}$ C durante 90 segundos por cada 1 kb; y 72 $^{\circ}$ C durante 10 minutos para la extensión final. Cada producto de PCR se purificó en gel (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos) y se eluyó en 25 μ l de tampón EB para la preparación de moldes usados en PCR de extensión solapante o en 50 μ l de tampón EB, se precipitó con etanol y se suspendió en 5 μ l de ddH₂O para electroporación en *S. enteritidis*.

Tabla 1. Secuencias de cebadores

Cebador	Región amplificada	Secuencia de cebador
lam-up-f	bucle 9 arriba	5'TGTACAAGTGGACGCCAATC3'
lam-up-r		5'GTTATCGCCGCTTTGATATAGCC 3'
lam-dh-f	bucle 9 abajo	5'ATTTCCCGTTATGCCGCAGC 3'
lam-dh-r		5'GTTAAACAGAGGGCGACGAG 3'
Km-f	gen l-Scel/Km ^r	<u>5'GCTATATCAAAGACGGCGAACTAACTATAACGGTCTTAAGGTAGCGAATTTCC</u> GGGATCCGTCGA 3'
Km-r		5'GCTGGGCA TAACGGGAAATTGJAGGCJGGAGCJGCJCG3'
Kan4f	dentro del gen Km ^r : secuenciación	5'CAAAAGCGCTCTGAAGTTCC 3'
Kan4r		5'GCGTGAGGGGATCTTGAAGT 3'
lam-i1	M2e/ bucle 9 abajo	<u>5'GCTATATCAAAGACGGCGATAACGAAAGTTGAAACCCCGATTCTGTAACATTTCC</u> CGTTATGCCGCAGG 3'
lam-i2	CD154s/bucle 9 abajo	<u>5'GCTATATCAAAGACGGCGATAACTGGGCAGAAAAAAGTTATTATACCATGTCI</u> ATTTCCCGTTATGCCGCAGC 3'
i2-ilh-f	CD154s-(Gly) ₃ -LM2-(Gly) ₃ -bucle 9 abajo	<u>5'IGGCAGAAAAAGGTTATTATACCATGTCCTCCCTCCCGAAGTTGAAACCC</u> <u>CGATTTCGTAACGGTGGTGGIATTTCCCGTTATGCCGCAGC 3'</u>
i2-i1-r	CD154s-(Gly) ₃ -bucle 9 arriba	<u>5'AGACATGGTATAATAACCTTTTCTGCCCAACCACCACCGTTATCGCCGCTTTT</u> GATATAGCC 3'
TJ1-f	CD154-(Ser) ₄ -LM2-(Ser) ₄ -LM2-(Ser) ₄ -bucle 9 abajo	<u>5'IGGCAGAAAAAGGTTATTATACCATGTCCTCCCTCCCGAAGTTGAAAC</u> <u>CCCGATTTCGTAACCTCCCTCCCTCCCGAAGTTGAAACCCCGATTTCGTAACCTCT</u> <u>CCTCCCTCAATTTCCCGTTATGCCGCAGC 3'</u>
TJ1-r	CD154-(Ser) ₄ -M2eA-(Ser) ₄ -M2eA-(Ser) ₄ -bucle arriba	9 <u>5'AGACATGGTATAATAACCTTTnCTGCCCAGGAGGAGGAGGAGHACGGGTCCG</u> <u>GGTTCAACTTCGGAGGAGGAGGAGTTACGGGTCGGGGTTTCAACTTCGGGA</u> <u>GGAGGAGGAGTTATCGCCGCTTTGATATAGCC 3'</u>
lam 3f	regiones externas de bucle 9: secuenciación	5'GCCATCTCGCTTGGTGATAA 3'
lam 3r		5'CGCTGGTATTTGGGGTACA 3'

En la Tabla 1 los nucleótidos en cursiva son complementarios de uno de los lados del sitio de inserción del bucle 9 del gen *lamB*, que corresponde al nucleótido 1257 usando *S. typhimurium* como un genoma de referencia anotado. Los nucleótidos de letra en negrita representan el sitio de reconocimiento de I-SceI en el cebador Km-f. Todas las otras secuencias de inserción se muestran subrayadas.

5

Electroporación

La transformación de pKD46 en *S. enteritidis* fue la primera etapa llevada a cabo de modo que las enzimas recombinasas Red pudieran usarse para mediar en la recombinación de mutaciones posteriores. Se recogió plásmido pKD46 de *E. coli* BW25113 (Datsenko y Wanner, PNAS 2000, 97: 6640-6645) usando un kit de preparación de plásmidos (Qiagen Valencia, CA, Estados Unidos). Después se usaron 0,5 µl de ADN de pKD46 para transformación en *S. enteritidis* 13A que se había preparado para electroporación. (Datsenko y Wanner, PNAS 2000, 97: 6640-6645). Brevemente, las células se inocularon en 10-15 ml de caldo YT 2X y se cultivaron a 37 °C durante una noche. Después se volvieron a inocular 100 µl de cultivo de una noche en 10 ml de caldo YT 2X nuevo a 37 °C durante 3-4 horas. Las células para transformar con plásmido pKD46 se calentaron a 50 °C durante 25 minutos para ayudar a inactivar la restricción de los hospedadores. Las células se lavaron cinco veces en agua ddH₂O y se resuspendieron en 60 µl de glicerol al 10 %. Las células se sometieron después a pulsos a 2400-2450 kV durante 1-6 ms, se incubaron en SOC durante 2-3 horas a 30 °C y se sembraron en placas en medio LB con antibióticos apropiados. Se mantuvieron transformantes de *S. enteritidis* con pKD46 a 30 °C. Cuando estos transformantes se prepararon para reacciones de electroporación adicionales, todas las etapas fueron iguales excepto que se añadió arabinosa al 15 % para inducir enzimas recombinasas Red una hora antes de lavar, y las células no se sometieron a la etapa de calentamiento a 50 °C.

10

15

20

Construcción de bucle 9 arriba-I-SceI/ Km^r-bucle 9 abajo

25

30

35

40

45

Construcción de Bucle 9 arriba- LM2 o CD154s o secuencia de combinación-bucle 9 abajo

50

55

60

65

Reemplazo genómico de I-SceI/Km^r con LM2 o CD154s o secuencias de combinación

Se introdujeron productos de PCR-B por electroporación en células *S. enteritidis* junto con el plásmido pBC-I-SceI a una relación molar de aproximadamente 40:1 (Kang *et al.*, J Bacteriol 2004, 186: 4921-4930). Se eligieron clones para cada mutación de recombinación de PCR-B de acuerdo con la capacidad para crecer en placas Cm pero no en placas Km, debido al reemplazo por PCR-B de la secuencia de PCR-A que codifica Km^r. Se amplificaron por PCR regiones modificadas en los clones seleccionados, y se determinaron las secuencias de ADN usando los cebadores lam3f y lam3r localizados fuera de las regiones amplificadas de bucle 9 abajo y arriba.

Mutación de inserción de sitio I-SceI/Km^r

La primera etapa de mutación implicaba diseñar un fragmento de PCR, PCR-A, que actuaría como el vehículo del casete de sitio I-SceI/Km^r para insertar en el sitio *lamB*. PCR-A consistió en el sitio de reconocimiento de la enzima I-SceI adyacente al gen de Km^r con aproximadamente 200-300 pb de ADN flanqueante en cada extremo homólogo de la regiones cadena arriba y cadena abajo del sitio de inserción de bucle 9 de *lamB* (bucle 9 arriba y bucle 9 abajo, respectivamente). El fragmento se introdujo en células *S. enteritidis* que expresan enzimas recombinasas Red y se seleccionaron colonias Km^r. Después de explorar algunas colonias por PCR de colonia, se secuenciaron clones positivos con respecto a la secuencia deseada insertada de sitio I-SceI/Km^r, y el mutante identificado se designó SE164.

Reemplazo genómico de I-SceI/Km^r con LM2 o CD154s o secuencias de combinación

La segunda etapa de mutación requería construcción de un fragmento de PCR, denominado PCR-B y mostrado en la Figura 2B, consistente en la secuencia de inserción final, LM2 o CD 154 o secuencias de combinación, flanqueadas por fragmentos homólogos de *lamB*. Los amplicones de PCR-B no tienen marcador de selección y deben contraseleccionarse después de reemplazo de la mutación de sitio I-SceI/Km^r previa en SE164. El plásmido pBC-I-SceI codifica el gen Cm^r y la enzima I-SceI, que cortará el genoma en el sitio I-SceI de SE164. Por lo tanto, pBC-I-SceI se introdujo por electroporación en SE164 junto con PCR-B. Después de la recombinación de PCR-B para reemplazar PCR-A, se seleccionaron clones positivos basándose en la capacidad para crecer en Cm pero no en Km. Después de secuenciar el ADN de mutantes para confirmar la recombinación exitosa de PCR-B, las cepas se designaron SE172, SE173, SE180 y SE189 para las secuencias de inserto LM2, CD154s, (Gly)₃-CD154s-(Gly)₃-LM2-(Gly)₃ y (Ser)₄-M2eA-(Ser)₄-M2eA-(Ser)₄-CD154-(Ser)₄-LM2-(Ser)₄-LM2-(Ser)₄, respectivamente. Se usaron diez clones aleatorios para cada una de las inserciones de LM2 y CD154s para PCR con lam 3f y lam 3r, después se digirieron usando sitios de enzimas de restricción únicos para cada secuencia de inserción y el 100 % de los clones ensayados por digestión fueron positivos para la secuencia de mutación deseada. Los resultados de secuenciación demostraron que la inserción de LM2 o CD154s o secuencias de combinación era exactamente en la región de bucle 9 sin la adición de nucleótidos ajenos.

Ejemplo 2. Atenuación de mutantes/insertos de M2e o M2e/CD154.

Se consiguió atenuación de SE13A por mutación de delección del gen *aroA* y/o el gen *htrA*. La mutación del gen *aroA*, un gen clave en la ruta del ácido corísmico de las bacterias, dio como resultado una deficiencia metabólica grave que afecta a siete rutas bioquímicas separadas. La mutación del gen *htrA* reduce la capacidad de la célula para soportar exposición a temperaturas altas y bajas, bajo pH y agentes oxidativos y nocivos para el ADN y reduce la virulencia de las bacterias.

Para conseguir mutaciones de delección en SE13A, la secuencia génica diana en el genoma bacteriano de *S. enteritidis* se reemplazó con la secuencia del gen resistente a Km. Esto se completó usando PCR de extensión solapante y electroporación de los productos de PCR como se ha descrito anteriormente. El gen de resistencia a Km se dirigió a la región genómica que contenía los genes de interés (*aroA* o *htrA*) flanqueando el gen de resistencia a Km con 200-300 pares de bases de secuencias homólogas de los genes de interés. Una vez que se obtuvieron mutantes resistentes a Km, se confirmaron las mutaciones de delección de *aroA* o *htrA* por secuenciación de ADN. Las cepas de Salmonela *aroA*- y *htrA*- resultantes se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 13 de septiembre de 2006 (Nº de Depósito PTA-7872 y Nº de Depósito PTA-7873, respectivamente). Las cepas atenuadas también se ensayaron *in vivo* con respecto al tiempo de eliminación. Ambas cepas atenuadas tuvieron tiempos de eliminación más rápidos que la cepa 13A de tipo silvestre, pero ambas fueron capaces de colonizar el hígado, el bazo y las amígdalas cecales de pollos después de infección oral. Además, se aisló también una cepa atenuada que carecía de tanto *aroA* como de *htrA*.

Ejemplo 3. Confirmación de la expresión en superficie celular de M2e y CD154.

Se confirmó la expresión en superficie celular de los insertos de M2e y CD154 con una reacción de precipitación de anticuerpo/antígeno sencilla. Brevemente, se prepararon anticuerpos policlonales contra las secuencias de aminoácidos tanto de M2E-LM2 (EVETPIRN; SEC ID N°: 5) como de CD154 (WAEKGYTMS; SEC ID N°: 6) conjugadas con una proteína vehículo (KLH). Los anticuerpos resultantes se incubaron después con SE13A de tipo silvestre (sin insertos) o SE13A con el inserto de M2e-LM2, el CD154 o el combinado de M2e-LM2 y CD154 en una

5 placa de vidrio a temperatura ambiente y se permitió que se incubara durante 30 segundos. La expresión en superficie celular se determinó por la presencia de un precipitado. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Se indica una reacción de precipitación positiva por un signo (+) y se indica una reacción de precipitación negativa por un signo (-). Los resultados demuestran que el SE13A de tipo silvestre no reaccionó con los anticuerpos peptídicos de M2e y CD 154, mientras que las Cepas que expresaban M2e, CD 154 o M2e y CD 154 reaccionaron con los anticuerpos apropiados. Por lo tanto, se expresan péptidos M2e y CD 154 en la superficie de las bacterias.

Tabla 2. Reacción de precipitación

	SE13A	SE13A-M2E	SE13A-CD154	SE13A-M2E-CD154
anticuerpo de M2E	-	+	No ensayado	+
anticuerpo de CD 154	-	No ensayado	+	+

10 **Ejemplo 4. Estudio de vacunación**

Se obtuvieron polluelos de día de eclosión (día 0) de un criadero comercial local y se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento (n=55/grupo de tratamiento). Se marcaron y numeraron quince pollos de los posibles 55 en cada grupo de tratamiento. Los pollos se infectaron por vía oral por lavado con 0,25 ml de 10⁴, 10⁵ o 10⁷ (datos no mostrados) ufc/ml de los diversos tratamientos de SE13A como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Dosis de exposición para cada grupo de tratamiento.

Grupo de Tratamiento	Dosis de Exposición
SE13A-M2E	10 ⁵ ufc/ml
SE13A-M2E-CD154	10 ⁵ ufc/ml
SE13A-M2E aroA	10 ⁴ ufc/ml
SE13A-M2E-CD154 aroA	10 ⁴ ufc/ml
SE13A-M2E htrA	10 ⁵ ufc/ml
SE13A-M2E-CD154 htrA	10 ⁵ ufc/ml

20 Cada grupo de tratamiento se alojó en una jaula de suelo individual sobre tierra de pino nueva y se les proporcionó agua y alimento a voluntad. Los días 7, 14, 21 y 28 después de la eclosión, se recogió aproximadamente 1 ml de sangre de cada una de las quince aves marcadas y el suero se retiró para su uso posterior en la determinación de los títulos de anticuerpo. Los mismos días, se sacrificaron diez aves de cada grupo de tratamiento, se retiraron de forma aséptica su hígado, bazo y amígdalas cecales para la determinación de la colonización bacteriana (amígdalas cecales) e invasión bacteriana (hígado y bazo). Se preenriquecieron muestras individuales de hígado, bazo y amígdalas cecales en caldo de cultivo de tetracionato durante una noche a 37 °C. Al día siguiente se sembraron en estrías asas cargadas de cada cultivo en caldo en placas de agar XLD complementadas con Novabicina y Ácido Naladixico y se incubó durante una noche a 37 °C. A la mañana siguiente las placas se leyeron con respecto a la presencia o ausencia de colonias de Salmonela. Se presentan datos de colonización e invasión bacteriana en la Tabla 4 por grupo de tratamiento. Cada relación presentada en la Tabla 4 representa el número de aves de las que se recuperaron aislados positivos para Salmonela de las posibles diez aves que se cultivaron los días 7, 14, 21 y 28 después de la exposición.

Tabla 4. Colonización e invasión bacteriana.

Grupos de Tratamiento	Colonización (Amígdalas Cecales)				Invasión (Hígado/Bazo)			
	D7	D14	D21	D28	D7	D14	D21	D28
SE13A	9/10	3/10	5/10	2/10	8/10	8/10	2/10	4/10
SE13A-M2E-CD154	9/10	7/10	6/10	9/10	8/10	1/10	5/10	4/10
SE13A-M2E aroA	10/10	4/10	0/10	3/10	9/10	4/10	0/10	3/10
SE13A-M2E-CD154 aroA	4/10	1/10	1/10	3/10	4/10	0/10	0/10	3/10
SE13A-M2E htrA	5/10	1/10	0/10	1/10	4/10	2/10	0/10	2/10
SE13A-M2E-CD154 htrA	4/10	1/10	0/10	0/10	6/10	0/10	0/10	0/10

Se sometieron aislados bacterianos de *Salmonella* positivos recuperados de aves en cada grupo de tratamiento a análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores específicos para cada inserto desvelado en la Tabla 1 para verificar el inserto de M2e y/o CD 154. Esta técnica se utilizó para asegurar que la cepa que se proporcionó originalmente a las aves era equivalente a la cepa recuperada. En cada grupo de tratamiento, la PCR confirmó que las cepas recuperadas eran iguales que las cepas con las que se infectaron las aves. Los resultados indicaron colonización aceptable de tejidos con las diversas cepas de *Salmonella* ensayadas.

Ejemplo 5. Producción de anticuerpos de M2e.

Se usó el suero recogido de las aves marcadas en cada grupo de tratamiento en un ELISA de captura de antígenos para calcular los niveles de anticuerpos de M2e. Brevemente, se recubrieron pocillos individuales de una placa de 96 pocillos con 5 µg/ml del epítipo de M2e-LM2 (EVETPIRN: SEC ID N°: 5) conjugado con BSA. Se permitió que se produjera la adhesión de antígenos durante una noche a 4 °C. Las placas se aclararon con PBS + Tween 20 0,05 % y se incubaron durante 2 horas con el suero previamente recogido de las aves en cada uno de los seis grupos de tratamiento descritos anteriormente. Las placas se aclararon con PBS + Tween 20 0,05 % seguido de incubación con anticuerpo secundario de Cabra anti IgY de Pollo conjugado con peroxidasa (dilución 1:10.000) obtenido de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) durante una hora adicional. Después de aclarar posteriormente, las placas se desarrollaron usando un kit de sustrato de peroxidasa obtenido de Fisher Scientific y las absorbancias se leyeron en un espectrofotómetro a 450 nm y 405 nm.

Cada placa contenía también un control positivo y un control negativo en los que el anticuerpo policlonal de M2e descrito anteriormente y el suero de pollo de un ave no tratada reemplazaban respectivamente el suero de los grupos de tratamiento. Las absorbancias obtenidas para el control positivo, control negativo y las muestras experimentales se usaron para calcular las relaciones de Muestra y control Positivo (relaciones S/P) usando el siguiente cálculo:

$$\text{cálculo de relación S/P: } \frac{\text{media de la muestra} - \text{media del control negativo}}{\text{media del control positivo} - \text{media del control negativo}}$$

Las relaciones S/P calculadas para cada grupo se muestran en la Figura 3 y 4. Como se muestra, los niveles de anticuerpo específico de M2e para cada grupo que expresa M2e-CD154 produjeron una señal de ELISA que era de media más del 30 % mayor en comparación con su grupo respectivo que solamente expresa M2e. Los datos demuestran que SE13A-M2e y SE13A-M2e-CD154 son ambos capaces de inducir una respuesta de anticuerpos robusta a M2e. Esta respuesta se aumentó claramente por la adición del péptido de CD154. Además, se generaron respuestas similares cuando se utilizaron las cepas SE13A auxotróficas bien para *aroA* o bien para *htrA*. Estas cepas pueden proporcionar vectores de vacuna con mayor seguridad para su uso clínico sin sacrificar la generación de una respuesta inmunitaria robusta.

Ejemplo 6. Neutralización de virus.

Se sometieron los antisueros (recogidos 2 semanas después de la inmunización de refuerzo en cada experimento) generados contra los vectores de SE recombinantes descritos anteriormente a ensayo de neutralización de virus usando gripe H9N2 (Charles River Laboratories, Franklin, CT) usando protocolos convencionales (Charles River Laboratories). Véase Tabla 5. Los índices de neutralización indican que los antisueros de pollos vacunados eran eficaces en la neutralización de la gripe aviar y por lo tanto en la protección de embriones del virus (los títulos de VN variaron de 6,3 a 8,8 en dos estudios). Se usó suero hiperinmunitario inducido contra péptido M2e sintético como un control positivo.

Tabla 5. Neutralización de virus

Cepa de SE	Índice de Neutralización
SE aroA M2E	7,5
SE aroA M2E-CD154	8,3
SE aroA M2E (multicopia)-CD154	8,3
Control positivo	8,3

Ejemplo 7. Estudio de exposición.

Virus.

Los virus de la gripe usados en estos estudios fueron Gripe Aviar A/Turkey/Virginia/158512/2002 (TV/02) H7N2 LP (LPAI H7N2) y gripe aviar A/Egret/Hong Kong/757.2/2002 (Eg/02) H5N1 HP (HPAI H5N1). Los virus se cultivaron y se titularon en huevos de pollo SPF (sin patógeno específico) embrionados de 9-11 días de edad como se ha

descrito previamente (Suarez *et al.*, J Virol. Ago 1998; 72(8): 6678-88.).

Pollos y alojamiento.

- 5 Para exposición a LP y HPAI los pollos se transfirieron a unidades de Horsfall de acero inoxidable de presión negativa que contenían filtros HEPA en una instalación agrícola de nivel 3 de bioseguridad certificada por el USDA. Se proporcionaron alimentos y agua a voluntad.

Serología y aislamiento del virus.

- 10 Se realizó un ensayo de inhibición de hemaglutinación con antígeno H5N1 homólogo inactivado por BPL con sueros recogidos el día 0 en el Experimento I y el Día 0 y 14 en el Experimento II como se ha descrito previamente (Suarez *et al.*, 1998). Los títulos mayores de ≥ 3 (\log_2) se consideraron positivos. Se realizó aislamiento del virus de hisopos orales y cloacales los días 2 y 4 después de la exposición en huevos de pollo SPF en el día 9-11 de embrionación (Tumpey *et al.*, Avian Dis. Ene-Mar 2004; 48(1): 167-76). Brevemente, se recogieron hisopos en 2 ml de caldo de cultivo de infusión de cerebro-corazón (BHI) con antibióticos (penicilina G 1000 unidades/ml, sulfato de gentamicina 200 $\mu\text{g/ml}$ y anfotericina B 4 $\mu\text{g/ml}$; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) de cada ave el día 0, 2, 4 después de la exposición para aislamiento del virus.

Transferencia de Western.

- 20 Se separaron proteínas de AIV purificadas de virus completo (H5N1 y H7N2) por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10 % y se transfirieron como se ha descrito previamente (Kapczynski y Tumpey, Avian Dis. Jul-Sep 2003;47(3): 578-87). Brevemente, se incubó suero anti M2e de aves previamente inmunizadas con $\Delta\text{SE M2e-HM}$ (1:1000) con la membrana que contenía antígeno AIV durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados en PBS-Tween 20 (0,05 %) la membrana se hizo reaccionar con anticuerpo secundario de cabra anti IgG de pollo marcado con peroxidasa de rábano rústico (Southern Biotech Associates, Inc, Birmingham, AL) a una dilución 1:2000 durante 1 hora. Después del lavado como antes, la membrana se hizo reaccionar con Reactivos de Detección de Transferencia de Western ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes, y se expusieron a Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). La película se reveló usando reactivos de revelado GBX de Kodak (Eastman Kodak Company) de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes.

Estudios de protección.

- 35 El experimento inicial se diseñó para evaluar la protección de pollos que recibían vacunación con Salmonela $\Delta\text{SE M2e-HM}$ (M2e-CD154 multicopia con la secuencia de inserción SEC ID N°: 9) de la exposición a LPAI TV/02 (10^6 DIE₅₀ por ave (DIE se refiere a la dosis infecciosa embrionaria)) para determinar la reducción de la morbilidad y difusión viral. Posteriormente, se investigó la protección de la exposición a HPAI Eg/02 usando una dosis subletal (0,1 DLC₅₀ por ave (DLC se refiere a la dosis letal para polluelo)) y dosis letal (100 DLC₅₀ por ave), con respecto a morbilidad, mortalidad y difusión viral.

Experimento I. Exposición a LPAI H7N2

- 45 Se dividieron grupos de diez pollos SPF de 1 día de edad en 3 grupos. Las aves en los grupos 1 y 2 recibieron vacunación simulada con 100 μl de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). Las aves en el grupo 3 recibieron vacunación con $\Delta\text{SE M2e-HM}$. Tres semanas después (Día 21) los tres grupos de pollos SPF recibieron una segunda vacunación idéntica (refuerzo) utilizando solución salina (Grupos 1 y 2) o la vacuna con vector de Salmonela recombinante (Grupo 3). Tres semanas después del refuerzo (Día 42), las aves en el grupo 2 y 3 se expusieron por vía intranasal (IN) a 10^6 dosis infecciosas embrionarias 50 (DIE₅₀) / ave de TV/02 (LPAI H7N2). Las aves no expuestas se expusieron de forma simulada a 100 μl de PBS por vía intranasal. Después de la exposición, las aves se controlaron diariamente con respecto a señales de enfermedad durante 14 días después de la infección (PI). Los resultados de morbilidad después de la exposición a LPAI H7N2 e muestran en la Figura 5 y demuestran una reducción significativa en la morbilidad después de la vacunación con SE13A que expresaba M2E y CD154.
- 55 Para determinar la incidencia de la difusión viral, se tomaron hisopos orales y cloacales el día 2 y 4 PI. La cantidad de difusión viral después de la exposición a LPAI H7N2 los días 2 y 4 PI se muestra en la Figura 6 y demostró que la vacunación con SE13A-HM también reducía la capacidad de AI para replicarse en los pollos.

Experimento II. Exposición a HPAI H5N1

- 60 Se dividieron grupos de diez pollos SPF de 1 día de edad en 5 grupos. Las aves en los grupos 1, 2 y 3 recibieron vacunación simulada con 100 μl de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). Las aves en el grupo 4 y 5 recibieron vacunación con $\Delta\text{SE M2e-HM}$ como se ha descrito en el Experimento I. El día 42, las aves en el grupo 1 reciben exposición simulada con 100 μl de PBS por vía intranasal. Las aves en los grupos 2 y 3 recibieron exposición a 0,1 y 100 DLC₅₀ Eg/02 (HPAI H5N1) por ave, respectivamente. Las aves en los grupos 4 y 5 recibieron

exposición a 0,1 y 100 DLC₅₀ Eg/02 (HPAI H5N1) por ave, respectivamente. Después de la exposición, las aves se controlaron diariamente con respecto a morbilidad y mortalidad durante 14 días PI. Los pollos que presentaban señales clínicas graves de enfermedad se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital sódico. Los resultados de morbilidad después de la exposición a HPAI H5N1 se muestran en la Figura 7 y demuestran una reducción significativa en la morbilidad después de la vacunación con SE13A que expresaba M2E y CD154. Para determinar la incidencia de la difusión viral, se tomaron hisopos orales y cloacales el día 2 y 4 PI. La cantidad de difusión viral después de la exposición a HPAI H5N1 los días 2 y 4 PI se muestran en la Figura 8 y demostró que la vacunación con SE13A-M2e también reducía la capacidad de AI para replicar en los polluelos.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> El consejo de administración de la Universidad de Arkansas

<120> Composiciones y métodos para potenciar respuestas inmunitarias

<130> SMK/FP6618268

<140> EP 07842706.9

<141> 18-09-2007

<150> PCT/US2007/078785

<151> 18-09-2007

<150> US 60/825.983

<151> 18-09-2006

<160> 40

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Virus de la gripe aviar

<400> 1

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu
1 5 10 15

Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> Virus de la gripe A

<400> 2

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Gly
1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 3

<211> 24

<212> PRT

<213> Virus de la gripe A

ES 2 520 026 T3

<400> 3

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly
1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

5 <210> 4
<211> 24
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

10 <400> 4

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu
1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

15 <210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Virus de la gripe A

20 <400> 5

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn
1 5

25 <210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Cys
1 5 10

35 <210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> *Gallus*

<400> 7

Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser
1 5 10

40 <210> 8
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Sintético

50 <400> 8

ES 2 520 026 T3

Gly Gly Gly Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Gly Gly Gly
 20 25

5 <210> 9
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 9

Ser Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Trp Ala Glu Lys Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Thr Met Ser Ser Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg
 35 40 45

Asn Ser Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser
 50 55 60

Ser
 65

15 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Salmonella enteritidis*

20 <400> 10
 tgtacaagtg gacgccaatc 20

25 <210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Salmonella enteritidis*

30 <400> 11
 gttatcgccg tctttgatat agcc 24

35 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Salmonella enteritidis*

40 <400> 12
 atttcccggt atgccgcagc 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 520 026 T3

<213> *Salmonella enteritidis*

<400> 13
 5 gtaaacaga gggcgacgag 20

<210> 14
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 14

15 gctatatcaa agacggcgat aactaactat aacggtccta aggtagcgaa tttccgggga 60
 tccgtcga 68

<210> 15
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Sintético

25 <400> 15
 gctcgcgcat aacgggaaat tgtaggctgg agctgctcg 40

<210> 16
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 16
 gctatatcaa agacggcgat aacgaagttg aaaccccgat tcgtaacatt tcccgttatg 60
 ccgcagcg 68

40 <210> 17
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 17

50 gctatatcaa agacggcgat aactgggcag aaaaagggtta ttataccatg tctatttccc 60
 gttatgcccgc agc 73

<210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Salmonella enteritidis*

55 <400> 18

ES 2 520 026 T3

gccatctcgc ttggtgataa 20
 <210> 19
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> *Salmonella enteritidis*

<400> 19
 cgctggatt ttgcgtaca 20
 10 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Virus de la gripe A
 <400> 20

Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn
 1 5

<210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A
 20
 25 <400> 21

Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln
 1 5 10

<210> 22
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A
 30
 35 <400> 22

Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr
 1 5 10 15

Glu Glu Leu

<210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A
 40
 <400> 23

Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe A
 50
 <400> 24

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
 1 5 10

55 <210> 25

ES 2 520 026 T3

<211> 272
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*

5 <400> 25

Met	Asn	Glu	Ala	Tyr	Ser	Pro	Ala	Ala	Pro	Arg	Pro	Met	Gly	Ser	Thr
1				5					10					15	
Ser	Pro	Ser	Thr	Met	Lys	Met	Phe	Met	Cys	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Met
			20					25					30		
Val	Val	Gln	Thr	Ile	Gly	Thr	Val	Leu	Phe	Cys	Leu	Tyr	Leu	His	Met
		35					40					45			
Lys	Met	Asp	Lys	Met	Glu	Glu	Val	Leu	Ser	Leu	Asn	Glu	Asp	Tyr	Ile
	50					55					60				
Phe	Leu	Arg	Lys	Val	Gln	Lys	Cys	Gln	Thr	Gly	Glu	Asp	Gln	Lys	Ser
65					70					75					80
Thr	Leu	Leu	Asp	Cys	Glu	Lys	Val	Leu	Lys	Gly	Phe	Gln	Asp	Leu	Gln
				85					90					95	
Cys	Lys	Asp	Arg	Thr	Ala	Ser	Glu	Glu	Leu	Pro	Lys	Phe	Glu	Met	His
			100					105					110		
Arg	Gly	His	Glu	His	Pro	His	Leu	Lys	Ser	Arg	Asn	Glu	Thr	Ser	Val

ES 2 520 026 T3

115	120	125																			
Ala	Glu	Glu	Lys	Arg	Gln	Pro	Ile	Ala	Thr	His	Leu	Ala	Gly	Val	Lys						
130					135				140												
Ser	Asn	Thr	Thr	Val	Arg	Val	Leu	Lys	Trp	Met	Thr	Thr	Ser	Tyr	Ala						
145					150				155												
Pro	Thr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	His	Glu	Gly	Lys	Leu	Lys	Val	Glu						
			165						170												
Lys	Ala	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Ser	Phe	Cys	Thr	Lys						
			180						185												
Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Pro						
			195						200												
Met	Glu	Glu	Asp	Arg	Leu	Leu	Met	Lys	Gly	Leu	Asp	Thr	His	Ser	Thr						
210						215				220											
Ser	Thr	Ala	Leu	Cys	Glu	Leu	Gln	Ser	Ile	Arg	Glu	Gly	Gly	Val	Phe						
225					230				235												
Glu	Leu	Arg	Gln	Gly	Asp	Met	Val	Phe	Val	Asn	Val	Thr	Asp	Ser	Thr						
			245						250												
Ala	Val	Asn	Val	Asn	Pro	Gly	Asn	Thr	Tyr	Phe	Gly	Met	Phe	Lys	Leu						
			260						265												

<210> 26
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 26

Met	Ile	Glu	Thr	Tyr	Asn	Gln	Thr	Ser	Pro	Arg	Ser	Ala	Ala	Thr	Gly						
1				5						10		15									
Leu	Pro	Ile	Ser	Met	Lys	Ile	Phe	Met	Tyr	Leu	Leu	Thr	Val	Phe	Leu						
			20						25		30										
Ile	Thr	Gln	Met	Ile	Gly	Ser	Ala	Leu	Phe	Ala	Val	Tyr	Leu	His	Arg						
			35						40		45										
Arg	Leu	Asp	Lys	Ile	Glu	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	His	Glu	Asp	Phe	Val						
50						55				60											

5

10

ES 2 520 026 T3

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> *Anas* sp.

<400> 27

Trp Asn Lys Thr Ser Tyr Ala Pro Met Asn
1 5 10

5

10

ES 2 520 026 T3

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus sp.*
 5
 <400> 28

 Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys
 1 5 10

 10
 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

 15
 <400> 29

 Trp Ala Pro Lys Gly Tyr Tyr Thr Leu Ser
 1 5 10

 20
 <210> 30
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25
 <220>
 <223> Sintético

 <400> 30
 tagggataac agggaat 18

 30
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 35
 <220>
 <223> Sintético

 <400> 31
 caaaagcgct ctgaagttcc 20
 40
 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Sintético

 <400> 32
 gcgtgagggg atctgaagt 20
 50
 <210> 33
 <211> 92
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintético

 <400> 33
 60

ES 2 520 026 T3

	tgggcagaaa aaggttatta taccatgtct ggtgggtgtg aagttgaaac cccgattcgt	60
	aacgggtgtg gtatttcccg ttatgccgca gc	92
5	<210> 34 <211> 63 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Sintético	
	<400> 34	
	agacatggta taataacctt tttctgccca accaccaccg ttatgccgct cttgatata	60
	gcc	63
15	<210> 35 <211> 134 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Sintético	
	<400> 35	
	tgggcagaaa aaggttatta taccatgtct tctctctcct cogaagttga aaccccgatt	60
	cgtaactcct cctctccoga agttgaaacc cegattogta actcctctc ctcatttcc	120
25	cgttatgccg cagc	134
30	<210> 36 <211> 138 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Sintético	
	<400> 36	
	agacatggta taataacctt tttctgccca ggaggaggag gagttacggg tcggggtttc	60
	aacttcggag gaggaggagt tacgggtcgg ggtttcaact tcggaggagg aggagttatc	120
	gccgtctttg atatagcc	138
40	<210> 37 <211> 24 <212> ADN <213> Virus de la gripe A	
45	<400> 37 gaagttgaaa ccccgattcg taac	24
50	<210> 38 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sintético	

ES 2 520 026 T3

	<400> 38		
	tgggcagaaa aaggttatta taccatgtct	30	
5	<210> 39		
	<211> 81		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
10	<220>		
	<223> Sintético		
	<400> 39		
	ggtgggtggtt gggcagaaaa aggttattat accatgtctg gtgggtggtga agttgaaacc	60	
15	ccgattcgtta acgggtggtgg t	81	
	<210> 40		
	<211> 198		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Sintético		
25	<400> 40		
	tcctcctcct ccgaagttga aaccccgacc cgtaactcct cctcctccga agttgaaacc	60	
	ccgaccgta actcctcctc ctctgggca gaaaaagggtt attataccat gtcttctctc	120	
	tcctccgaag ttgaaacccc gattcgtaac tcctcctcct ccgaagttga aaccccgatt	180	
	cgtaactcct cctcctcc	198	

REIVINDICACIONES

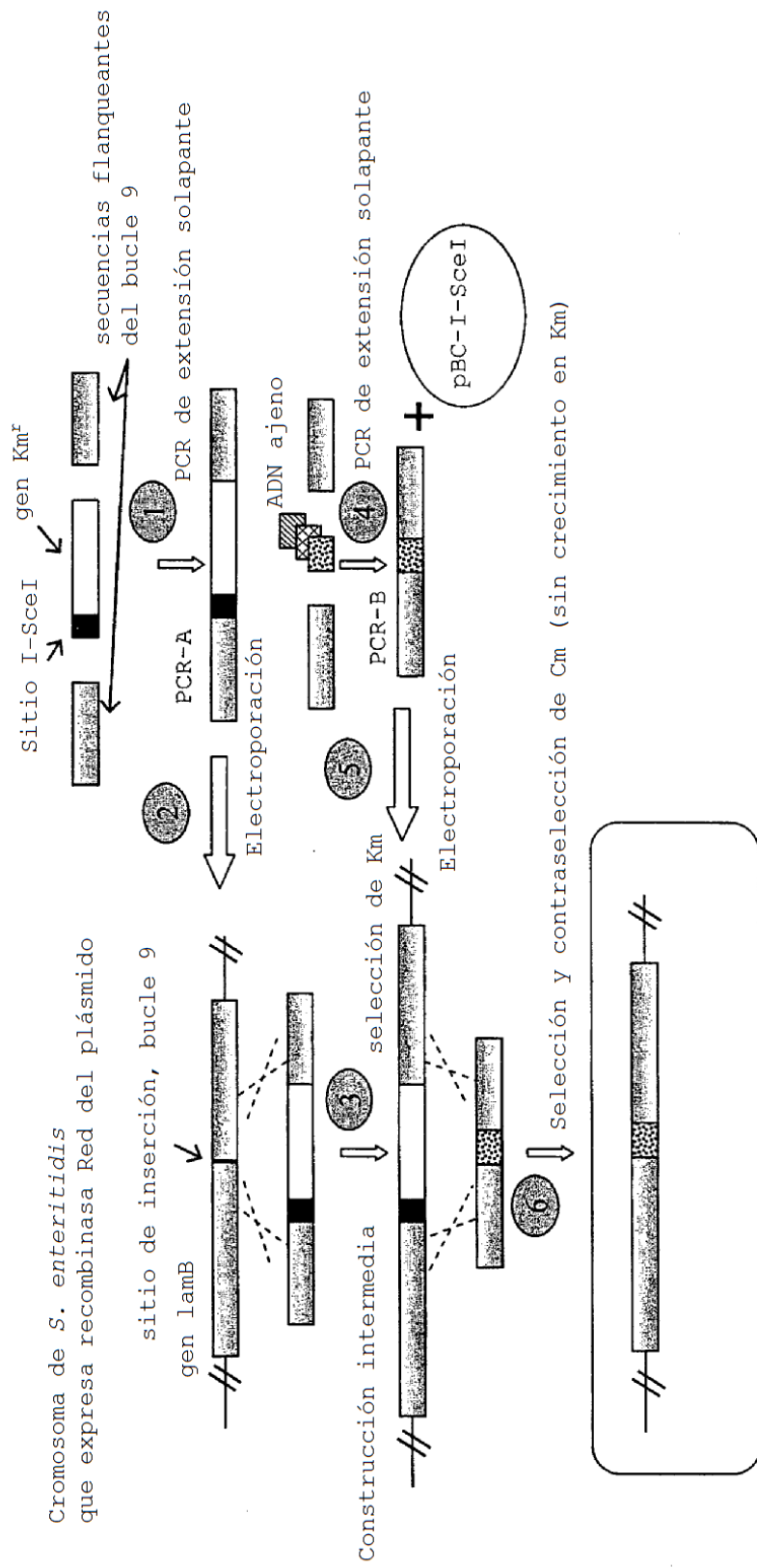
1. Un vector de vacuna bacteriana que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido antigénico y una secuencia polinucleotídica de CD154 que codifica un polipéptido de CD154 capaz de unirse con CD40, en donde el polipéptido de CD154 tiene menos de aproximadamente 50 aminoácidos y comprende los aminoácidos 140-149 de SEC ID N°: 26 o un homólogo de los mismos que es capaz de unirse con CD40, en donde el polipéptido antigénico es un polipéptido de la gripe, en donde la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido antigénico y la secuencia polinucleotídica de CD154 se insertan dentro de una secuencia que codifica una parte externa de una proteína transmembrana y en donde el vector de vacuna potencia la respuesta inmunitaria de un sujeto.
2. El vector de vacuna de la reivindicación 1, en el que la secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido antigénico es una polinucleótido M2e de la gripe que codifica un polipéptido M2e de la gripe.
3. El vector de vacuna de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el polipéptido antigénico y el polipéptido de CD154 están codificados por la misma secuencia polinucleotídica.
4. Uso de una secuencia polinucleotídica de CD154 que codifica un polipéptido de CD154 capaz de unirse con un CD40 para la preparación de un vector de vacuna bacteriano para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto a un polipéptido de la gripe, en donde el polipéptido de CD154 tiene menos de aproximadamente 50 aminoácidos y comprende los aminoácidos 140-149 de SEC ID N°: 26 o un homólogo de los mismos capaz de unirse con CD40, en donde la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de la gripe y la secuencia polinucleotídica de CD154 se insertan dentro de una secuencia que codifica una parte externa de una proteína transmembrana.
5. El uso de la reivindicación 4, en el que el polipéptido de CD154 tiene menos de 25 aminoácidos.
6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en el que el polipéptido de CD154 se expresa en la superficie del vector de vacuna.
7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en el que el vector de vacuna comprende además al menos una secuencia polinucleotídica de M2e de la gripe A que codifica un polipéptido M2e de gripe A en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto a la gripe A.
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en el que el polipéptido de la gripe y el polipéptido de CD154 están codificados por la misma secuencia polinucleotídica.
9. Uso de una bacteria que comprende al menos una secuencia polinucleotídica de M2e de la Gripe A que codifica un polipéptido M2e de la Gripe A para la preparación de una vacuna eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto a la Gripe A, en donde la bacteria comprende además una secuencia polinucleotídica de CD154 que codifica un polipéptido de CD154 capaz de unirse con CD40 y que tiene menos de 50 aminoácidos y comprende los aminoácidos 140-149 de SEC ID N°: 26 o un homólogo de los mismos capaz de unirse con CD40, y en donde la secuencia polinucleotídica de M2e de Gripe A y la secuencia polinucleotídica de CD154 se insertan en una secuencia polinucleotídica que codifica una parte externa de una proteína transmembrana.
10. Uso de una bacteria que comprende al menos una secuencia polinucleotídica de M2e de la Gripe A que codifica un polipéptido M2e de la Gripe A para la preparación de una vacuna eficaz para reducir la morbilidad relacionada con la Gripe A, en donde la bacteria comprende además una secuencia polinucleotídica de CD154 que codifica un polipéptido de CD154 capaz de unirse con CD40 y que tiene menos de 50 aminoácidos y comprende los aminoácidos 140-149 de SEC ID N°: 26 o un homólogo de los mismos capaz de unirse con CD40 y en donde la secuencia polinucleotídica de M2e de la Gripe A y la secuencia polinucleotídica de CD154 se insertan en una secuencia polinucleotídica que codifica una parte externa de una proteína transmembrana.
11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que el polipéptido M2e de la Gripe A se selecciona del grupo que consiste en SEC ID N°: 1; SEC ID N°: 2; SEC ID N°: 3; SEC ID N°: 4; SEC ID N°: 5; SEC ID N°: 20 y un fragmento inmunogénico de SEC ID N°: 1, un fragmento inmunogénico de SEC ID N°: 2, un fragmento inmunogénico de SEC ID N°: 3 y un fragmento inmunogénico de SEC ID N°: 4.
12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en el que la bacteria es un miembro de la familia Enterobacteriaceae.
13. El uso de la reivindicación 12, en el que la bacteria es una cepa de Salmonella de cualquiera de (a) *Salmonella enteritidis* que tiene el número de depósito de la ATCC PTA-7871, (b) una cepa de Salmonella capaz de colonizar un sujeto, (c) una cepa de Salmonella que comprende una mutación en una ruta de aromatización, (d) una cepa de Salmonella que comprende una mutación dentro de *aroA*, (e) una cepa de Salmonella que comprende una mutación en una ruta de respuesta a estrés y (f) una cepa de Salmonella que comprende una mutación en *htrA*.

14. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que el polipéptido de CD154 y el polipéptido M2e de la Gripe están codificados por la misma secuencia polinucleotídica.

15. Un método para desarrollar un vector de vacuna bacteriana que comprende:

- 5
- a) seleccionar una bacteria capaz de colonizar un sujeto;
 - b) atenuar la bacteria para generar una bacteria atenuada;
 - c) incorporar una secuencia polinucleotídica de CD154 que codifica un polipéptido de CD154 capaz de unirse con CD40 en la bacteria atenuada para generar un vector de vacuna, en donde el polipéptido de CD154 tiene
10 menos de 50 aminoácidos y comprende los aminoácidos 140-149 de SEC ID N°: 26 o un homólogo de los mismos capaz de unirse con CD40; y
 - d) incorporar una segunda secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de la Gripe en el cromosoma del vector de vacuna, en donde las secuencias polinucleotídicas que codifican el polipéptido de la Gripe y la
15 secuencia polinucleotídica de CD154 se insertan dentro de una secuencia que codifica una parte externa de una proteína transmembrana.

16. El método de la reivindicación 15, en el que el polipéptido de CD154 y el polipéptido antigénico están codificados por la misma secuencia polinucleotídica.



Cromosoma de *S. enteritidis* que expresa secuencia ajena

FIG. 1

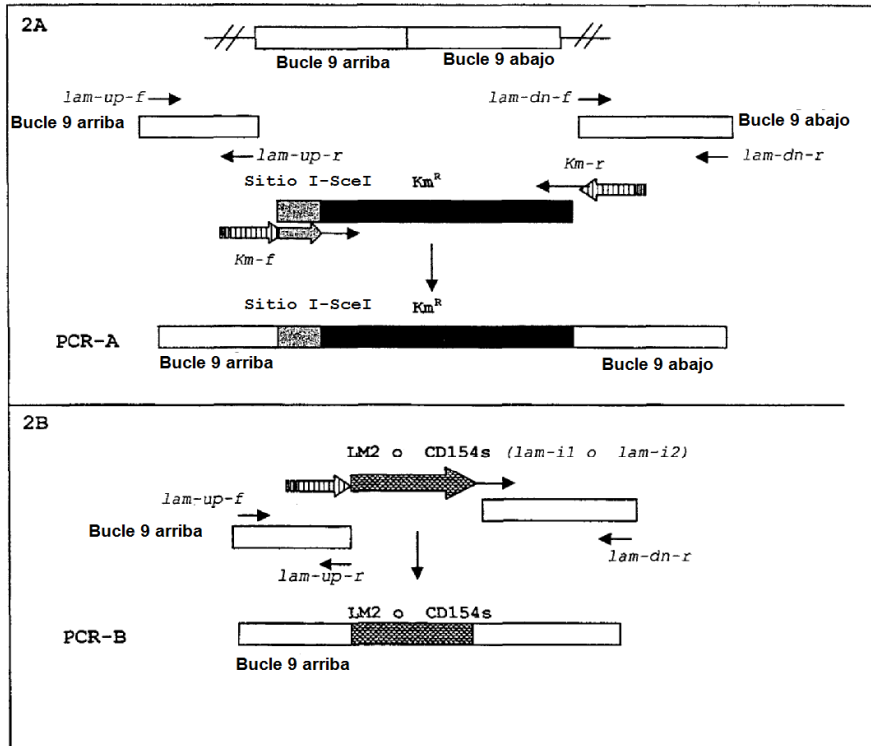


FIG. 2

Respuesta de anticuerpo de M2e (Relaciones S/P)

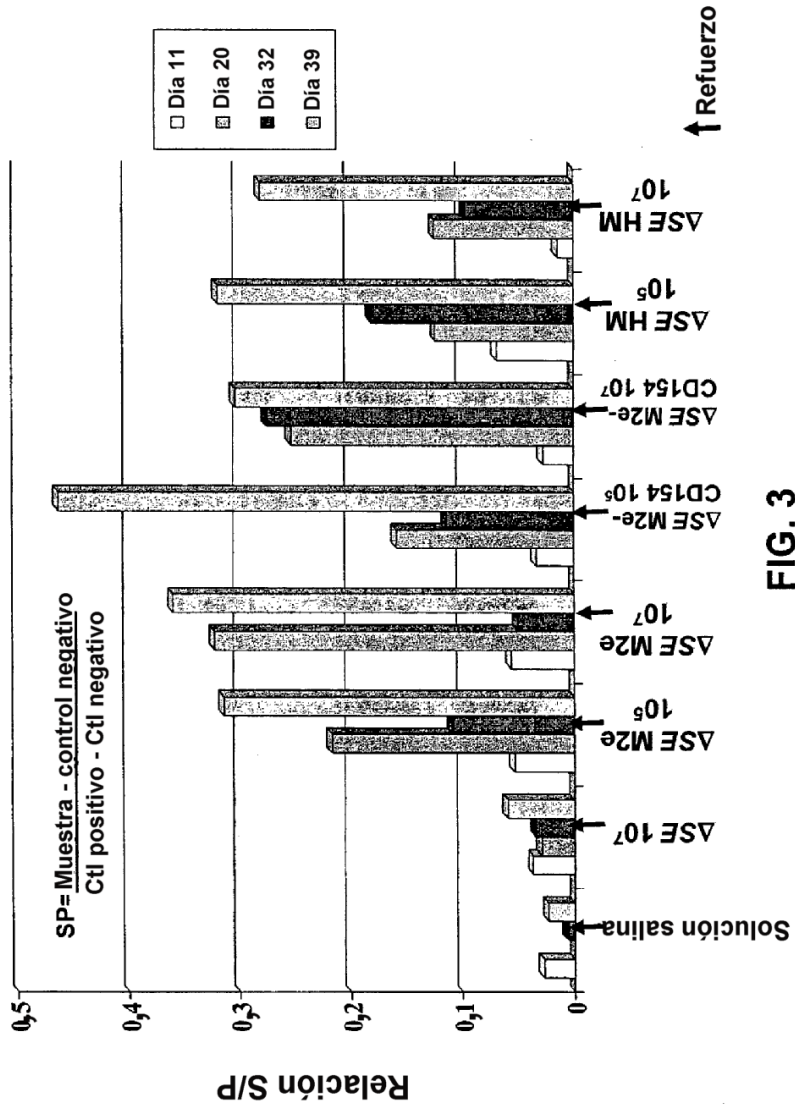


FIG. 3

Respuesta de anticuerpo de M2e (Relaciones S/P)

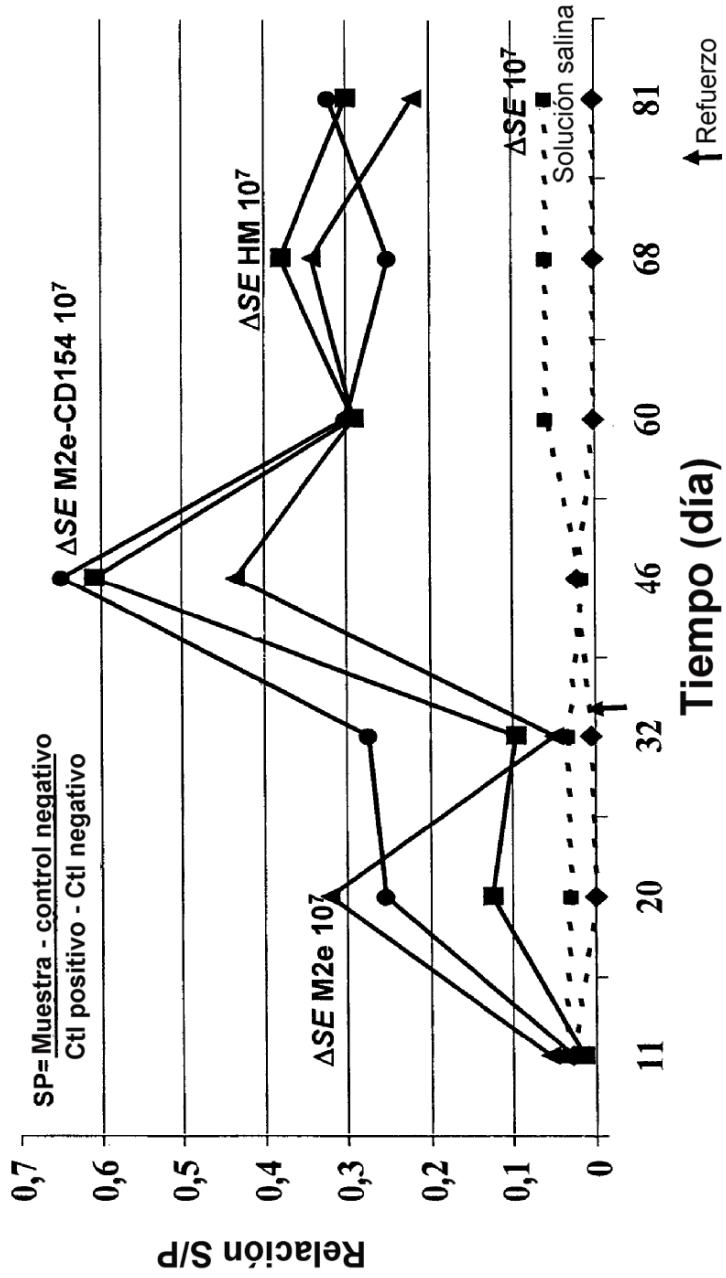


FIG. 4

Morbilidad después de exposición directa a LPAI H7N2

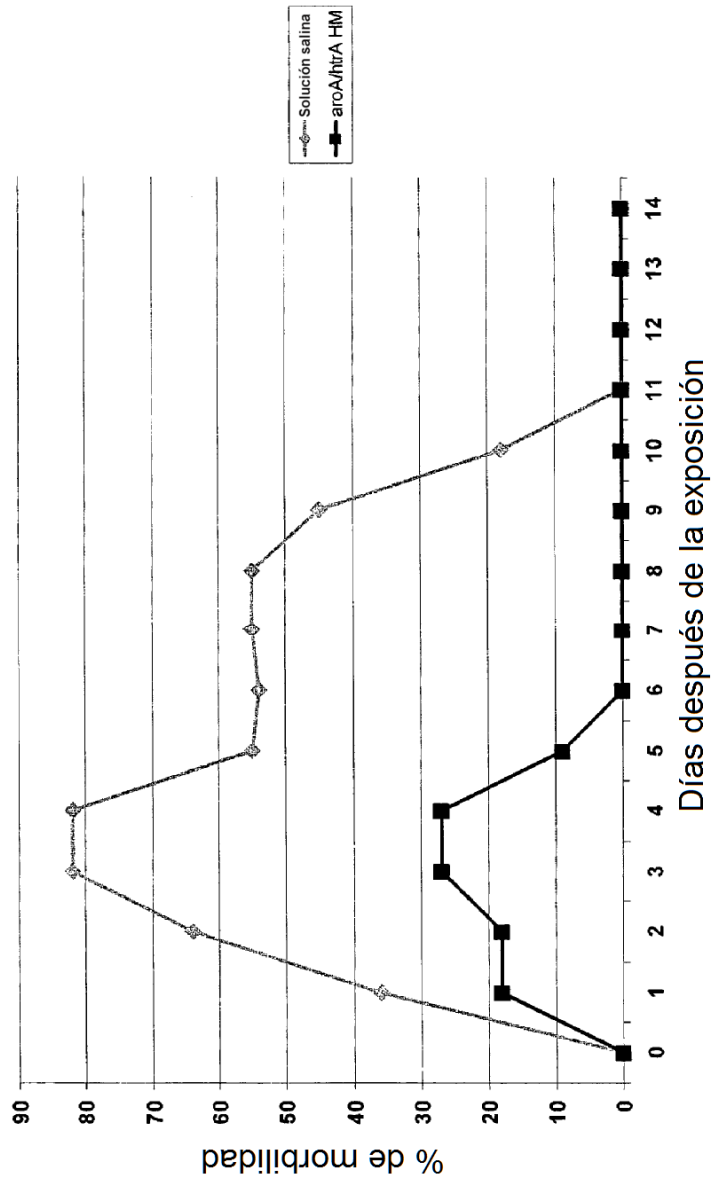


FIG. 5

Difusión viral después de exposición directa a LPAI H7N2

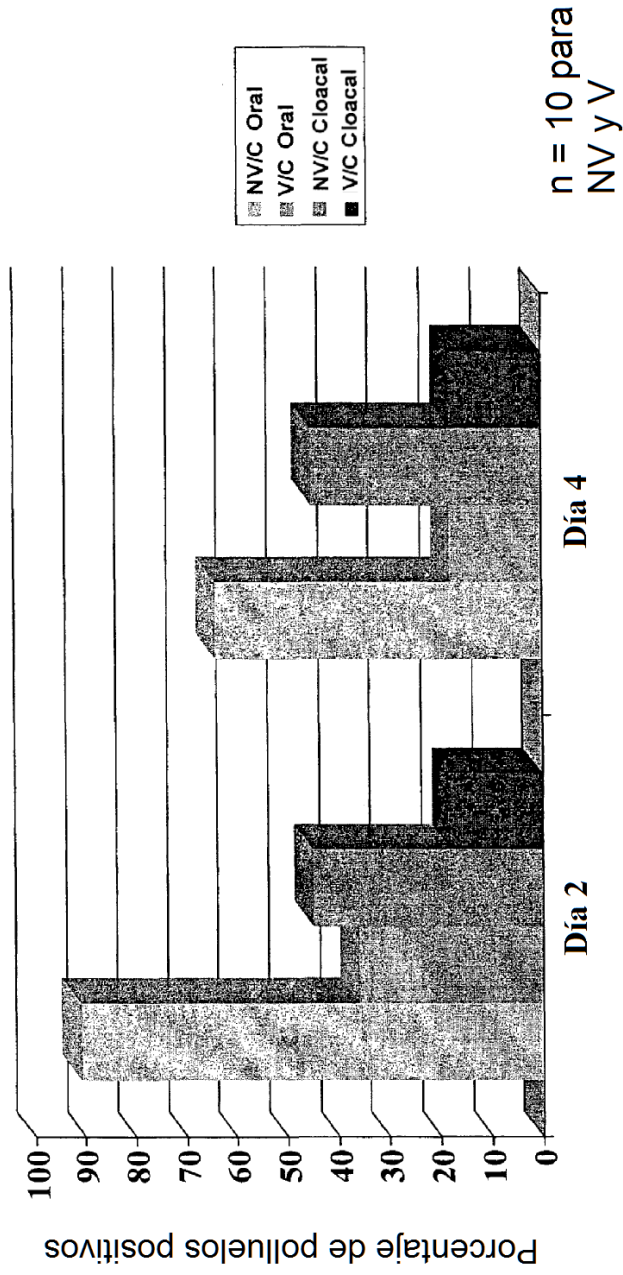


FIG. 6

Morbilidad después de exposición directa a HPAI H5N1

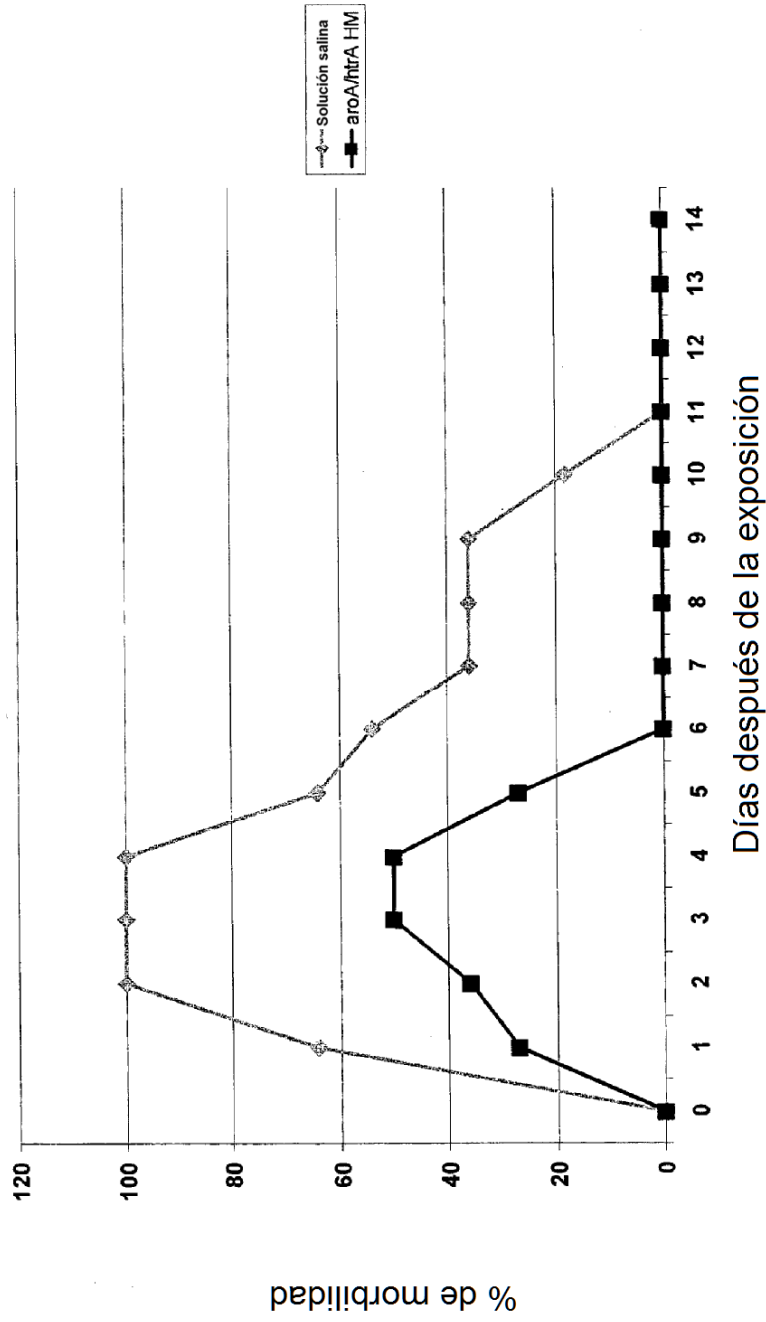


FIG. 7

Difusión viral después de exposición directa a HPAI H5N1

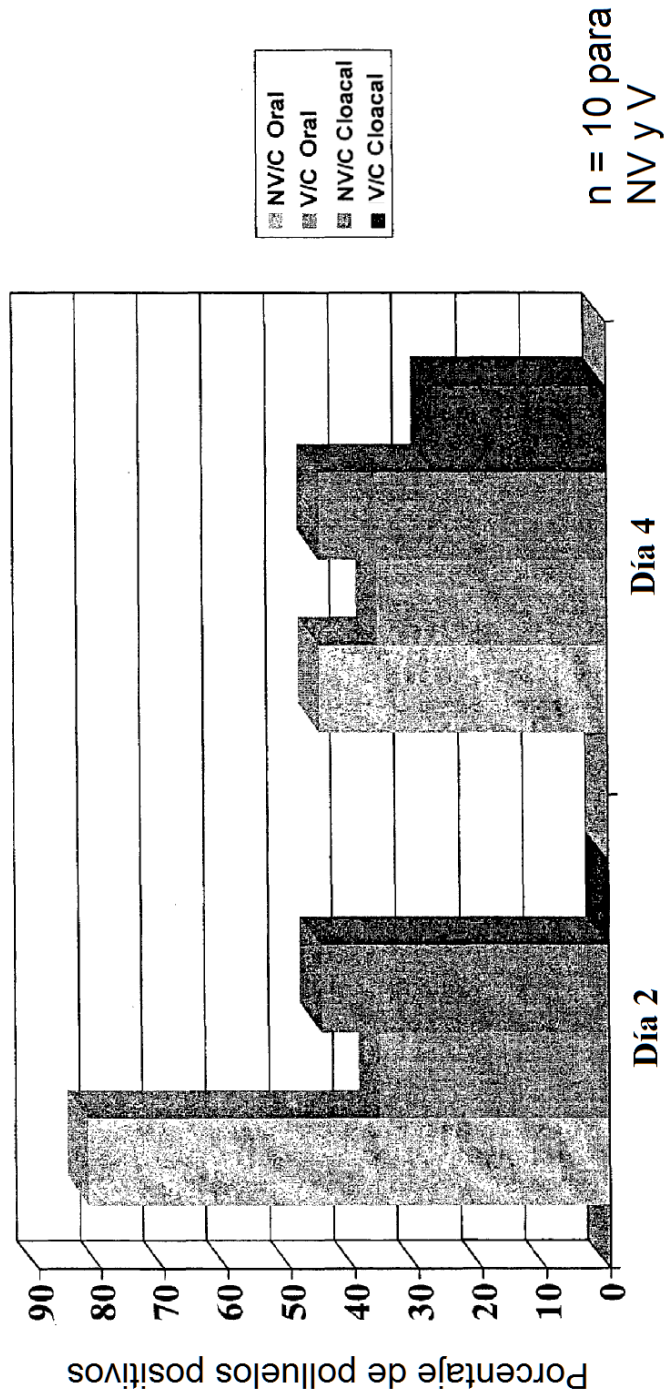


FIG. 8