

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 646**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2011 PCT/US2011/022062**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO11091255**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2011 E 11735230 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2525817**

54 Título: **Vectores de vacuna y métodos para potenciar las respuestas inmunitarias**

30 Prioridad:

21.01.2010 US 297098 P

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

23.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BERGHMAN, LUC;
BOTTJE, WALTER;
HARGIS, BILLY y
LAYTON, SHERRYLL**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 643 646 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

Vectores de vacuna y métodos para potenciar las respuestas inmunitarias

5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la prioridad de la Solicitud de patente provisional N.º 61/297.098, presentada el 21 de enero de 2010.

10 Introducción

Las vacunas se usan para iniciar una respuesta inmunitaria adaptativa contra antígenos, en particular antígenos de patógenos, células tumorales o similares, con el objetivo de mejorar o de prevenir una enfermedad. Las vacunas de péptidos sintéticos o de microorganismos muertos o atenuados con frecuencia son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria robusta que es totalmente protectora. En algunos casos estas vacunas no son protectoras o son solo parcialmente protectoras y se deben usar otras estrategias para desarrollar vacunas protectoras. Las vacunas a base de microorganismos atenuados están asociadas con riesgos de transferencia génica y de reparación de mutaciones y pueden poner en riesgo a individuos inmunocomprometidos. Es necesario desarrollar nuevas vacunas que sean seguras y eficaces para estimular respuestas inmunitarias protectoras duraderas.

La infección por el virus de la gripe, en particular el virus de la gripe aviar H5N1, supone una creciente importancia sanitaria y económica. Los datos indican claramente que el H5N1 continúa circulando entre aves y cerdos susceptibles en regiones cada vez extensas del mundo. Muchos científicos creen que si no se controla, el virus de la gripe aviar H5N1 actual mutará y se podrá producir la transmisión de humano a humano y causará una pandemia mundial. Con una tasa de mortalidad de más del 50 %, dicha epidemia sería devastadora. Independientemente de la habilidad del virus para causar la enfermedad en humanos, el virus de la gripe aviar H5N1 ya está amenazando con tener un enorme impacto económico debido a la erradicación de manadas de aves de corral en áreas afectadas. Por lo tanto, se necesita el desarrollo de una vacuna para proteger a los seres humanos, aves de corral, cerdos y otros animales domésticos contra la el virus de la gripe H5N1. Una vacuna contra la gripe que sea capaz de proteger contra H5N1 así como también contra otros virus de la gripe, tal como H1N1, sería óptima. El documento US2008/0305120 divulga la actividad adyuvante del polipéptido HMGB1 y sugiere proteínas de fusión y antígenos.

Sumario

En la presente memoria se proporcionan vectores de vacunas y métodos de estimulación de una respuesta inmunitaria y métodos para reducir la morbilidad asociada con la infección por el virus de la gripe. En un aspecto, se proporciona un vector de vacuna que incluye un polipéptido antigénico y un polipéptido HMGB1 o un fragmento funcional de los mismos. Al menos una porción del polipéptido antigénico y del polipéptido HMGB1 está presente sobre la superficie del vector de vacuna. El vector de vacuna de esta divulgación puede incluir un primer polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico y un segundo polinucleótido que codifica el polipéptido HMGB1. El polipéptido HMGB1 y el polipéptido antigénico pueden estar unidos, tal como en una proteína de fusión. El polipéptido HMGB1 y el polipéptido antigénico se pueden insertar ambos dentro de un bucle extremo de una proteína transmembrana.

En un aspecto, esta invención proporciona un vector de vacuna como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En otro aspecto, se proporciona una composición que comprende el vector de vacuna y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser aceptable para uso oral o nasal. El vector de vacuna puede ser incapaz de replicarse.

En otro aspecto más, se proporciona un vector de vacuna contra *Bacillus* spp. El vector de vacuna incluye una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido antigénico que se expresa sobre la superficie del vector de vacuna y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido inmunoestimulador que se expresa sobre la superficie del vector de vacuna. El polipéptido antigénico puede ser un polipéptido M2e del virus de la gripe, un polipéptido HA del virus de la gripe o un polipéptido NP del virus de la gripe o una combinación de los mismos. El polipéptido inmunoestimulador puede ser un polipéptido CD154 o un polipéptido HMGB1 o una combinación de los mismos. El polipéptido inmunoestimulador y el polipéptido antigénico pueden estar unidos, tal como en una proteína de fusión y se pueden insertar en un bucle externo de una proteína transmembrana.

En otro aspecto más de esta divulgación, se proporcionan métodos para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto. En el método, se administran al sujeto los vectores de vacuna o composiciones proporcionadas en la presente memoria en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto hacia el polipéptido antigénico. Convenientemente, el vector de vacuna se administra por vía oral o por vía intranasal.

En otro aspecto adicional de esta divulgación, se proporcionan métodos para potenciar la respuesta inmunitaria en un sujeto mediante la administración de un vector de vacuna contra *Bacillus* spp. como se proporciona en la

presente memoria. El vector de vacuna incluye una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido antigénico que se expresa sobre la superficie del vector de vacuna y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido inmunoestimulador que se expresa sobre la superficie del vector de vacuna. El polipéptido antigénico puede ser un polipéptido M2e del virus de la gripe, un polipéptido HA del virus de la gripe, un polipéptido NP del virus de la gripe o una combinación de los mismos. El polipéptido inmunoestimulador puede ser un polipéptido CD154, un polipéptido HMGB1 o una combinación de los mismos.

En otro aspecto adicional más de esta divulgación, se proporcionan métodos para reducir la morbilidad relacionada con influenza en un sujeto. En los métodos, la administración de los vectores de vacuna o composiciones divulgados en la presente memoria reduce la morbilidad asociada con una subsiguiente infección por el virus de la gripe.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra las proporciones S/P (entre muestra y control positivo) del ELISA para la producción de anticuerpos específicos contra M2e en pollos después de la administración mediante sonda nasogástrica de la dosificación indicada del vector de vacuna *Bacillus subtilis* que expresa los epítomos del virus de la gripe A y HMGB1 o CD154, en comparación con pollos vacunados con solución salina.

La Figura 2 representa un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para la producción de anticuerpos específicos contra HA LB en pollos después de la administración mediante sonda nasogástrica de la dosificación indicada del vector de vacuna *Bacillus subtilis* que expresa los epítomos del virus de la gripe A y HMGB1 o CD154 en comparación con pollos vacunados con solución salina.

La Figura 3 es un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para la producción de anticuerpos específicos contra HA UA en pollos después de la administración mediante sonda nasogástrica de la dosificación indicada del vector de vacuna *Bacillus subtilis* que expresa los epítomos del virus de la gripe A y HMGB1 o CD154 en comparación con pollos vacunados con solución salina.

La Figura 4 es un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para la producción de anticuerpos específicos contra M2e en pollos después de la administración mediante sonda nasogástrica de la dosificación indicada de vectores de vacuna *Bacillus subtilis* vivos o inactivados en diversos grados que expresan los epítomos del virus de la gripe A y HMGB1 o CD154 en comparación con pollos vacunados con el vector contra *Bacillus* solo (BSBB).

La Figura 5 es un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para la producción de anticuerpos específicos contra HA LB en pollos después de la administración mediante sonda nasogástrica de la dosificación indicada de vectores de vacuna *Bacillus subtilis* vivos o inactivados en diversos grados que expresan los epítomos del virus de la gripe A y HMGB1 o CD154 en comparación con pollos vacunados con el vector contra *Bacillus* solo (BSBB).

La Figura 6 es un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para la producción de anticuerpos específicos contra HA UA en pollos después de la administración mediante sonda nasogástrica de la dosificación indicada de vectores de vacuna *Bacillus subtilis* vivos o inactivados en diversos grados que expresan los epítomos del virus de la gripe A y HMGB1 o CD154 en comparación con pollos vacunados con el vector de *Bacillus* solo (BSBB).

La Figura 7 es un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para la producción de anticuerpos IgG específicos contra M2e en pollos después de la administración mediante sonda nasogástrica de 10^6 vectores de vacuna *Bacillus subtilis*, vivos o bien inactivados con las diferentes dosificaciones de formalina que se indican, que expresan los epítomos del virus de la gripe A y HMGB1 en comparación con pollos vacunados con el vector contra *Bacillus* solo (BSBB).

La Figura 8 es un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para producción de anticuerpos IgA específicos contra M2e en pollos vacunados, ya sea por vía oral o por vía subcutánea, con 10^6 vectores de vacuna *Bacillus subtilis* vivos, inactivados con formalina o inactivados con formalina y liofilizados que expresan los epítomos del virus de la gripe A y HMGB1 en comparación con pollos vacunados con el vector contra *Bacillus* solo (BSBB).

La Figura 9 es un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para la producción de anticuerpos IgA específicos contra M2e en pollos vacunados, ya sea por vía oral o por vía subcutánea, con 10^6 vectores de vacuna *Bacillus subtilis* vivos, inactivados con formalina o inactivados con formalina y liofilizados que expresan los epítomos del virus de la gripe A y HMGB1 en comparación con pollos vacunados con el vector contra *Bacillus* solo (BSBB).

Descripción detallada

Las tecnologías del ADN recombinante permiten la manipulación relativamente fácil de muchas especies de bacterias y virus. Algunas bacterias y virus son, ya sea de forma natural o por selección o por manipulación, levemente patógenas o no patógenas, pero retienen la capacidad de generar una respuesta inmunitaria robusta. Estas bacterias y virus hacen atractivos a los vectores de vacuna para producir una respuesta inmunitaria contra antígenos heterólogos o extraños. Los vectores de vacuna bacterianos o víricos pueden imitar la infección natural y producir una inmunidad robusta y de larga duración. Los vectores de vacuna con frecuencia no son relativamente caros para producir y administrar. Además, dichos vectores con frecuencia pueden llevar consigo más de un antígeno y pueden proporcionar protección contra múltiples agentes infecciosos.

Los vectores para vacuna de bacterias o virus vivos pueden suponer aún riesgos para individuos inmunocomprometidos y pueden requerir observaciones reguladoras adicionales. Por lo tanto, es deseable el uso de vectores que estén muertos o inactivados o que califiquen como organismos generalmente considerados como seguros (GRAS) por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) de los Estados Unidos. El problema es generar una respuesta inmunitaria robusta usando dichos vectores. Como se muestra en los ejemplos, mediante la inclusión de polipéptidos HMGB1 (proteína de alta movilidad del grupo de caja 1) sobre la superficie del vector de vacuna se ha podido generar una respuesta inmunitaria robusta contra los polipéptidos antigénicos usando un vector contra *Bacillus spp.* De hecho, los ejemplos demuestran que este vector se puede inactivar, de modo que el mismo no se pueda replicar, usando varios métodos, y aun así producir una respuesta inmunitaria robusta después de su administración.

En la presente memoria se proporcionan vectores de vacuna que incluyen un polipéptido antigénico y un polipéptido HMGB1 o un fragmento funcional de los mismos. Al menos una porción del polipéptido antigénico y al menos una porción del polipéptido HMGB1 o fragmentos funcionales de los mismos están presentes sobre la superficie del vector de vacuna. El vector de vacuna puede incluir un primer polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico y un segundo polinucleótido que codifica el polipéptido HMGB1. El polipéptido HMGB1 y el polipéptido antigénico pueden estar unidos, tal como en una proteína de fusión o se pueden expresar de forma separada. El polipéptido HMGB1 y el polipéptido antigénico se pueden insertar ambos dentro de un bucle externo de una proteína transmembrana.

Los vectores de vacuna pueden ser bacterianos, víricos o a base de liposomas. Los posibles vectores de vacuna incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus* (*Bacillus subtilis*), *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*), *Shigella*, *Escherichia* (*E. coli*), *Yersinia*, *Bordetella*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* (*Vibrio cholerae*), *Listeria*, adenovirus, poxvirus, herpesvirus, alfavirus y virus adenoasociados. Convenientemente, el vector de vacuna es un organismo GRAS. El vector de vacuna puede estar inactivado o muerto de modo que no sea capaz de replicarse. Los métodos para inactivar o destruir vectores de vacuna bacterianos o víricos son conocidos por los expertos en la materia e incluyen, sin limitarse a, métodos tales como los que se muestran en los ejemplos, concretamente inactivación por formalina, inactivación a base de antibióticos, tratamiento con calor y tratamiento con etanol.

Un polipéptido antigénico es un polipéptido capaz de ser reconocido específicamente por el sistema inmunitario adaptativo. Un polipéptido antigénico incluye cualquier polipéptido inmunogénico. Los polipéptidos antigénicos incluyen, pero no se limitan a, antígenos relacionados con patógenos, con alérgenos, con tumores o con enfermedades. Los patógenos incluyen patógenos víricos, parásitos, fúngicos y bacterianos, así como también patógenos proteicos tales como los priones. Los polipéptidos antigénicos pueden ser proteínas de longitud completa o porciones de las mismas. Está bien establecido que el reconocimiento por el sistema inmunitario de muchas proteínas se basa en un número relativamente pequeño de aminoácidos, con frecuencia denominados epítopo. Los epítopos pueden ser de entre solo 8 y 10 aminoácidos. Por lo tanto, los polipéptidos antigénicos que se describen en la presente memoria pueden ser proteínas de longitud completa, epítopos de 8 aminoácidos de longitud o cualquier porción entre estos extremos. De hecho, el polipéptido antigénico puede incluir más de un epítopo de un único patógeno o proteína.

Se pueden incluir en el vector de vacuna múltiples copias del mismo epítopo o múltiples epítopos de diferentes proteínas. Se cree que se pueden administrar varios epítopos o antígenos del mismo o diferentes patógenos o enfermedades en combinación con un vector de vacuna individual para generar una respuesta inmunitaria más intensa contra múltiples antígenos. Los vectores de vacuna recombinantes pueden codificar antígenos de múltiples antígenos asociados a microorganismos patógenos, virus o 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.

El polipéptido antigénico puede ser un polipéptido del virus de la gripe, convenientemente es un polipéptido del virus de la gripe H5N1 o un polipéptido asociado con múltiples cepas del virus de la gripe tal como un polipéptido de la proteína M2 del virus de la gripe. El ectodominio de la proteína M2 del virus de la gripe A, 25 conocido como M2e, protruye desde la superficie del virus. La porción M2e de la proteína M2 contiene aproximadamente 24 aminoácidos. El polipéptido M2e varía poco entre un aislamiento del virus de la gripe y otro. De hecho, se han aislado solo unas pocas mutaciones de origen natural en M2e a partir de humanos infectados desde la epidemia de gripe de 1918. Además, los virus de la gripe aislados a partir de hospedadores aviares y porcinos tienen diferentes, aunque conservadas, secuencias de M2e. Para revisiones de las secuencias del polipéptido M2e aislado de hospedadores humanos, aviares y porcinos véase Liu et al., *Microbes and Infection* 7:171-177 (2005) y Reid et al., *J. Viral* 76:10717-10723 (2002). Véase también la SEQ ID NO: 1-4.

Convenientemente se puede insertar el polipéptido M2e completo en el vector de vacuna o se puede usar solamente una porción. En los ejemplos, se incorporó un polipéptido de ocho aminoácidos (LM2 que tiene la secuencia de aminoácidos: EVETPIRN, SEQ ID NO:5 o su variante M2eA que tiene la secuencia de aminoácidos EVETPTRN, SEQ ID NO:6) en el vector de vacuna y se demostró que produce una respuesta con anticuerpos después de su administración a pollos. Convenientemente, la porción del polipéptido M2e insertada en el vector de vacuna es inmunogénica. Un fragmento inmunogénico es un péptido o polipéptido que es capaz de producir una respuesta

inmunitaria celular o humoral. Convenientemente, un fragmento inmunogénico de M2e puede ser el polipéptido M2e de longitud completa, o convenientemente puede ser de 20 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos u 8 o más aminoácidos de la secuencia de longitud completa.

5 Otros epítomos apropiados para su inclusión en un vector de vacuna del virus de la gripe A incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de la hemaglutinina (HA) o de la proteína nuclear (NP) del virus de la gripe A. Por ejemplo, se pueden incluir los péptidos de SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO: 10 en un vector de vacuna. En los ejemplos, se incorporaron la SEQ ID NO: 7 (HAUA) y la SEQ ID NO: 8 (HALB) en el vector de vacuna y se demostró que producían una respuesta con anticuerpos después de su administración a pollos. Véanse las figuras 10 2-3 y 5-6. Además, en los ejemplos, se incorporaron en el vector de vacuna los epítomos NP de SEQ ID NO: 9 (NP54) y SEQ ID NO: 10 (NP147). Un experto en la materia apreciará que cualquiera de estas secuencias se puede usar en combinación con cualquier otro epítomo, incluyendo epítomos que derivan de otros patógenos o antígenos.

15 La proteína HMGB1 (proteína de alta movilidad del grupo caja 1) se identificó primero como una proteína de unión a ADN que es crítica para la estructura y estabilidad del ADN. Es una proteína nuclear que se expresa en forma ubicua que se une al ADN sin especificidad de secuencia. La proteína está muy conservada y se encuentra en plantas hasta en mamíferos. Las secuencias de aminoácidos de HMGB1 del pez cebra, el pollo y seres humanos se proporcionan en la SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 29, respectivamente. La secuencia está muy conservada en mamíferos, con un 98 % de identidad de aminoácidos y los cambios de aminoácidos son 20 conservativos. Por lo tanto, una proteína HMGB1 de una especie probablemente puede sustituir funcionalmente a la de otras especies. La proteína HMGB1 de longitud completa o una porción de la misma, se puede usar como polipéptido HMGB1 en el vector de vacuna como se describe en la presente memoria. HMGB1 tiene dos regiones de unión a ADN denominadas caja A, como se muestra en la SEQ ID NO: 23 y 24 y caja B como se muestra en la SEQ ID NO: 25 y 26. Véase Andersson and Tracey, Annu. Rev. Immunol. 2011, 29:139-162.

25 HMGB1 es un mediador de la inflamación y sirve como una señal de daño nuclear, tal como en células necróticas. HMGB1 también se puede secretar activamente en células del linaje de los monocitos/macrófagos en un proceso que requiere acetilación de la proteína, translocación a través del núcleo y secreción. La HMGB1 extracelular actúa como un potente mediador de la inflamación mediante la señalización de la vía de los receptores para productos 30 finales de glicosilación avanzada (RAGE) y a través de miembros de la familia de receptores tipo Toll (TLR), en particular TLR4. Se ha identificado la actividad de unión a RAGE y la misma requiere del polipéptido de SEQ ID NO: 27. La unión a TLR4 requiere de la cisteína de la posición 106 de la SEQ ID NO: 18, que se encuentra en la región de la caja B de HMGB1.

35 Las actividades inflamatorias de HMGB1 no requieren de la proteína de longitud completa y se han identificado fragmentos funcionales. La caja B se ha demostrado como suficiente para mediar los efectos proinflamatorios de HMGB1 y por lo tanto las SEQ ID NO: 25 y 26 son polipéptidos HMGB1 o fragmentos funcionales de los mismos dentro del contexto de la presente divulgación. Además, el sitio de unión a RAGE y la actividad de citocina proinflamatoria se han cartografiado en la SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28, respectivamente. Por lo tanto, estos 40 polipéptidos son fragmentos funcionales del polipéptido HMGB1.

Los expertos en la materia son capaces de identificar polipéptidos HMGB1 y fragmentos de los mismos que son capaces de estimular actividad de citocina pro-inflamatoria, usando métodos tales como los de la Publicación internacional N.º W002 092004. Convenientemente, el polipéptido HMGB1 incluye el dominio de unión a RAGE en 45 los aminoácidos 150 a 183 de SEQ ID NO:18 (SEQ ID NO: 27 o un homólogo de la misma) y el dominio de actividad citocina proinflamatoria entre los aminoácidos 89 y 109 de la SEQ ID NO: 18 (SEQ ID NO: 28 o un homólogo de la misma). En particular, los polipéptidos HMGB1 y fragmentos funcionales u homólogos de los mismos incluyen a polipéptidos idénticos, o al menos 99 % idénticos, al menos 98 % idénticos, al menos 95 % idénticos, al menos 90 % idénticos, al menos 85 % idénticos, o al menos 80 % idénticos a los polipéptidos HMGB1 de las SEQ ID NOS: 18 o 50 23-30.

Al menos una porción del polipéptido antigénico y al menos una porción del polipéptido HMGB1 están presentes sobre la superficie del vector de vacuna. Presente sobre la superficie del vector de vacuna incluye a polipéptidos que 55 están comprendidos dentro de una proteína transmembrana, que interaccionan covalentemente o químicamente entrecruzados con una proteína transmembrana, un lípido de membrana o un carbohidrato anclado a la membrana. Un polipéptido puede estar comprendido en una proteína transmembrana teniendo los aminoácidos que comprenden el polipéptido unidos a través de un enlace peptídico al extremo N-terminal, C-terminal o a cualquier parte dentro de la proteína transmembrana (es decir, insertados entre dos aminoácidos de la proteína transmembrana o en el lugar de uno o más aminoácidos de la proteína transmembrana (es decir, delección-inserción). Convenientemente, los 60 polipéptidos se pueden insertar en un bucle externo de una proteína transmembrana. Las proteínas transmembrana adecuadas son *cotB* y *lamB*, pero los expertos en la materia apreciarán que existen muchas proteínas transmembrana apropiadas.

Como alternativa, los polipéptidos pueden unirse covalente o químicamente a proteínas, lípidos o carbohidratos en la 65 membrana, o cápside si se usa un vector viral mediante los métodos disponibles para los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden usar enlaces disulfuro o entrecruzamientos de biotina - avidina para presentar los polipéptidos

antigénicos y HMGB1 sobre la superficie de un vector de vacuna. Convenientemente, el polipéptido antigénico y el polipéptido HMGB1 son parte de una proteína de fusión. Los dos polipéptidos se pueden unir directamente a través de un enlace peptídico o puede estar separados por un adaptador o por una sección de una tercera proteína en la cual están insertados.

5 Los polinucleótidos que codifican el polipéptido antigénico o el polipéptido HMGB1 se pueden insertar en el vector de vacuna y expresar para generar el polipéptido antigénico y el polipéptido HMGB1. Los polinucleótidos se pueden insertar en el cromosoma del vector de vacuna o pueden estar codificados en plásmidos u otro ADN extracromosómico. Convenientemente, los polinucleótidos que codifican el polipéptido antigénico y/o el polipéptido HMGB1 se pueden expresar en forma independiente o se insertan en un polinucleótido del vector de vacuna que se expresa. Convenientemente, el polinucleótido del vector de vacuna codifica un polipéptido que se expresa sobre la superficie del vector de vacuna tal como una proteína transmembrana. El polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico y/o el polipéptido HMGB1 se puede insertar en la secuencia de polinucleótidos del vector de vacuna para permitir la expresión del polipéptido antigénico y/o el polipéptido HMGB1 sobre la superficie del vector. Por ejemplo, el polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico y el polipéptido HMGB1 se pueden insertar en fase dentro de un polinucleótido bacteriano en una región que codifica una región externa en bucle de una proteína transmembrana, de modo que la secuencia de polinucleótidos bacteriana permanezca en fase. Véase el Ejemplo 1.

20 De forma alternativa, el polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico y/o el polipéptido HMGB1 se puede insertar en un polipéptido secretado que se expone o presenta sobre la superficie del vector de vacuna a través de la asociación con una proteína, lípido o carbohidrato sobre la superficie del vector de vacuna. Los expertos en la materia apreciarán que el polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico y/o el polipéptido HMGB1 se puede insertar en una amplia variedad de polinucleótidos del vector de vacuna para proporcionar la expresión y presentación del polipéptido antigénico y/o el polipéptido HMGB1 a las células inmunitarias del sujeto que se trata con el vector de vacuna. En los ejemplos, se expresaron varios epítomos del virus de la gripe, que incluyen un epítomo M2e, un epítomo HA y un epítomo NP, a partir de un plásmido para expresión vegetativa en *Bacillus subtilis*. La bacteria recombinante resultante expresa los epítomos insertados según se demuestra mediante la respuesta inmunitaria que se muestra en las Figuras 1-6.

30 En los ejemplos, los vectores de vacuna tienen los polipéptidos antigénicos (polipéptidos M2e, HA y NP) y el polipéptido inmunoestimulador (CD154 o HMGB1) codificados por el mismo polinucleótido y en fase entre sí. En realizaciones alternativas, el polipéptido inmunoestimulador y el polipéptido antigénico pueden estar codificados por polinucleótidos diferentes. Los expertos en la materia apreciarán que se puede usar varios métodos para obtener la expresión del polipéptido antigénico y el polipéptido HMGB1 sobre la superficie del vector de vacuna. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la materia.

40 También se proporcionan composiciones que comprenden el vector de vacuna y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es cualquier vehículo apropiado para su administración *in vivo*. Convenientemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es aceptable para administración oral, nasal o a través de la mucosa. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir agua, soluciones tamponadas, soluciones de glucosa o fluidos de cultivo bacteriano. Otros componentes de las composiciones convenientemente pueden incluir excipientes tales como estabilizantes, conservantes, diluyentes, emulsionantes y lubricantes. Entre los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables se incluyen estabilizantes 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 (p. ej., tampón fosfato). En especial cuando se agregan dichos estabilizantes a las composiciones, la composición es apropiada para secado por congelación o secado por pulverización. El vector de vacuna en las composiciones puede no ser capaz de replicarse, convenientemente el vector de vacuna se inactiva o destruye antes de agregarse a la composición.

50 Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden usar para potenciar una respuesta inmunitaria tal como una respuesta con anticuerpos frente al polipéptido antigénico. Las composiciones que contienen polipéptidos del virus de la gripe también se pueden usar para disminuir la morbilidad asociada con la consiguiente infección por el virus de la gripe. Las composiciones pueden prevenir que el virus de la gripe cause enfermedad o cualquier morbilidad asociada en un sujeto al cual se administraron las composiciones o los vectores de vacuna descritos en la presente memoria. Las composiciones y los vectores de vacuna descritos en la presente memoria pueden reducir la gravedad de la consiguiente enfermedad mediante la disminución de la duración de la enfermedad, disminuyendo la morbilidad o mortalidad asociadas con la enfermedad o reduciendo la posibilidad de contraer la enfermedad. La morbilidad o mortalidad asociadas con la enfermedad después de la administración del vector de vacuna como se describe en la presente memoria se pueden reducir en 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o incluso 60 100 % en comparación con sujetos similares que no recibieron el vector de vacuna.

También se proporcionan métodos para potenciar las respuestas inmunitarias en un sujeto mediante la administración de un vector de vacuna. El vector de vacuna puede contener un polipéptido HMGB1 capaz de estimular la respuesta inmunitaria contra el vector de vacuna y su polipéptido antigénico asociado. El vector de vacuna que comprende un polipéptido de HMGB1 se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto contra la vacuna y en particular contra el polipéptido antigénico. Convenientemente,

el vector de vacuna contiene un polinucleótido que codifica un polipéptido que incluye los aminoácidos 150-183 y 89-109 del polipéptido HMGB1 (SEQ ID NO: 18) o un homólogo del mismo. En los ejemplos, se usó un polipéptido de 190 aminoácidos de HMGB1. Convenientemente, el polinucleótido codifica un polipéptido HMGB1 de la misma especie que el sujeto. Las combinaciones heterólogas de polipéptidos HMGB1 y sujetos (es decir, un polipéptido HMGB1 humano para usar en una vacuna para pollos) pueden ser útiles en los métodos de la invención debido a que HMGB1 está muy conservado a través de un amplio número de especies. El polipéptido HMGB1 se puede usar para potenciar la respuesta inmunitaria en el sujeto frente a cualquier antígeno o polipéptido antigénico extraño que esté presente en, o sobre el vector de vacuna. El experto en la materia apreciará que el polipéptido HMGB1 se puede usar para potenciar la respuesta inmunitaria frente a más de un polipéptido antigénico presente en un vector de vacuna. El polipéptido de HMGB1 estimula una respuesta inmunitaria al menos en parte mediante la activación de células dendríticas y macrófagos y por lo tanto estimulando la producción de citocinas tales como IL-1, IL-6, IFN- γ y TNF- α . En los ejemplos, se expresó un polipéptido de HMGB1 sobre la superficie del vector de vacuna.

Además, se divulgan métodos para potenciar una respuesta inmunitaria contra el virus de la gripe A y métodos para reducir la morbilidad asociada con la subsiguiente infección por el virus de la gripe A. Brevemente, los métodos comprenden administrar a un sujeto un vector de vacuna que comprende un epítipo del virus de la gripe A (un polipéptido antigénico del virus de la gripe) capaz de producir una respuesta inmunitaria en una cantidad eficaz para producir la respuesta inmunitaria. El epítipo del virus de la gripe A puede ser un polipéptido M2e, un HA polipéptido o un polipéptido NP u otro polipéptido del virus de la gripe como se expuso previamente. La inserción de los polipéptidos antigénicos en el vector de vacuna se puede llevar a cabo en varias formas que son conocidas para los expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, el sistema de mutagénesis sin cicatrices dirigida al sitio, que se describe en la Publicación de patente internacional N.º WO 2008/036675. Las bacterias también se pueden manipular para que expresen polipéptidos del virus de la gripe junto con polinucleótidos capaces de potenciar la respuesta inmunitaria como se expuso previamente. En particular, se puede expresar un polipéptido de CD154 o HMGB1 mediante el vector de vacuna para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto contra los polipéptidos del virus de la gripe. Los ejemplos demuestran la producción de una respuesta robusta a IgA e IgG ante la vacunación en pollos. Se espera que dicha respuesta robusta sea protectora, o que al menos reduzca la morbilidad asociada con la subsiguiente infección o estimulación con la fuente de polipéptido antigénico (virus de la gripe en los ejemplos).

Las composiciones se pueden administrar mediante varios medios que incluyen, pero no se limitan a, por vía oral, por vía intranasal y a través de mucosa. Por ejemplo, las composiciones o vectores de vacuna se pueden administrar mediante aerosol, mediante pulverización, mediante la adición a la comida o al agua, mediante sonda nasogástrica o a través de gotas oftálmicas. En algunas realizaciones, las composiciones se administran mediante inyección tal como intradérmica, parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intracraneal, o intramuscular. Para los pollos u otras aves de corral, las composiciones se pueden administrar *in ovo*.

Los sujetos incluyen, pero no se limitan a, un vertebrado, convenientemente un mamífero, convenientemente un ser humano, vacas, gatos, perros, cerdos, o aves, convenientemente aves de corral tal como pollos. También se pueden usar otros modelos de infección en animales. La potenciación de la respuesta inmunitaria incluye, pero no se limita a, inducir un efecto terapéutico o profiláctico que está mediado por el sistema inmunitario del sujeto. Específicamente, la potenciación de una respuesta inmunitaria puede incluir la producción aumentada de anticuerpos, tal como se demuestra en las Figuras 1 a 3, un aumento en el cambio de clase de las cadenas pesadas de anticuerpo tal como la producción de IgA como se muestra en la Figura 8, la maduración de células presentadoras de antígeno, la estimulación de los linfocitos cooperadores y la estimulación de linfocitos T citotóxicos o la inducción de memoria de linfocitos T y B.

La dosificación útil a administrar variará dependiendo de la edad, peso y especie del sujeto, el modo y la vía de administración y el tipo de patógeno o enfermedad contra la que se busca una respuesta inmunitaria. La composición se puede administrar en cualquier dosis de vector de vacuna que sea suficiente para producir una respuesta inmunitaria. Se cree que las dosis que están en el intervalo de 10^3 a 10^{10} copias de vector (es decir, unidades formadoras de placas o unidades formadoras de colonias), de 10^4 a 10^9 copias de vector, o de 10^5 a 10^7 copias de vector son apropiadas.

La composición se puede administrar solo una vez o se pueden administrar dos o más veces para incrementar la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la composición se puede administrar dos o más veces, separadas por una semana, dos semanas, o por tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, seis meses o más. La bacteria puede ser viable antes de la administración, pero en algunas realizaciones la bacteria se puede destruir o inactivar antes de la administración. En algunas realizaciones, la bacteria puede ser capaz de replicarse en el sujeto, mientras que en otras realizaciones la bacteria puede no ser capaz de replicarse en el sujeto. Como se muestra en los ejemplos, los vectores de vacuna bacterianos se pueden inactivar antes de la administración usando formalina, etanol, calor o antibióticos. Un experto en la materia apreciará que también se pueden usar otros métodos para inactivar vectores de vacuna.

En la presente memoria también se proporciona un vector de vacuna *Bacillus* spp. El vector de vacuna *Bacillus* incluye una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido antigénico y una segunda secuencia de

polinucleótidos que codifica un polipéptido inmunoestimulador. El polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulador están presentes sobre la superficie del vector de vacuna *Bacillus* como se describió previamente. El polipéptido antigénico es un polipéptido del virus de la gripe como se describió previamente y el polipéptido inmunoestimulador es un polipéptido HMGB1 como se describió previamente o un polipéptido CD154.

5 También se pueden insertar dentro del vector de vacuna polinucleótidos que codifican polipéptidos inmunoestimuladores homólogos a proteínas del sujeto y que son capaces de estimular al sistema inmune para responder al polipéptido antigénico. Como se describe en más detalle en los ejemplos, un vector de vacuna puede incluir un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40 en el sujeto y estimular al sujeto para responder contra el
10 vector de vacuna y su polipéptido antigénico asociado, similar a HMGB1 descrito previamente. El vector de vacuna *Bacillus* puede incluir un polipéptido HMGB1, un polipéptido CD154 o una combinación de los mismos. Como se describió previamente, los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos se pueden insertar en el cromosoma del vector de vacuna o se pueden mantener extracromosómicamente. Un experto en la materia apreciará que estos polipéptidos se pueden insertar en varios polipéptidos del vector de vacuna y expresarse en diferentes partes del
15 vector de vacuna, o que se pueden secretar.

El polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimulador capaz de potenciar la respuesta inmunitaria contra un polipéptido antigénico puede también codificar el polipéptido antigénico. El polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimulador puede estar unido al polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico, de forma
20 que en el vector de vacuna, el polipéptido inmunoestimulador y el polipéptido antigénico están codificados por el mismo polinucleótido. En los ejemplos, un polinucleótido que codifica un polipéptido de CD154, que es capaz de unirse a CD40, o HMGB1, también codifica un epítipo M2e, un epítipo HA y un epítipo NP del virus de la gripe A. Véanse las SEQ ID NOs: 19-22. En los ejemplos, el polinucleótido que codifica los epítopos del virus de la gripe y el polinucleótido que codifica el polipéptido inmunoestimulador se expresan ambos a partir de un plásmido para
25 expresión en células vegetativas. En algunas realizaciones, los polinucleótidos se insertan en el gen *cotB* u otro gen que codifique una proteína que se expresa sobre la superficie de las esporas. Los expertos en la materia apreciarán que también se pueden usar polinucleótidos bacterianos que codifican otras proteínas transmembrana.

Como se expuso previamente, se puede incluir un polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimulador homólogo a una proteína del sujeto que es capaz de potenciar la respuesta inmunitaria contra el epítipo en el vector
30 de vacuna. En los ejemplos se demostró que un vector de vacuna *Bacillus* que incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40 o un polipéptido que codifica HMGB1, potencia la respuesta inmunitaria contra el epítipo M2e y contra los dos diferentes epítopos HA, medida por el incremento de la producción de anticuerpos en respuesta a la vacunación.

35 Convenientemente, el polipéptido CD154 tiene 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 la región de unión de CD40 no están muy conservadas entre las diferentes especies. Las secuencias de CD154 de
40 pollo y de ser humano se proporcionan en la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12, respectivamente.

Se han determinado las regiones de unión a CD40 de CD154 para varias especies, incluyendo ser humano, pollo, pato, ratón y bovino, y se las muestra en SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID
45 NO: 17, respectivamente. A pesar de que hay una variabilidad en las secuencias de la región de unión a CD40 entre las especies, los ejemplos siguientes indican que el polipéptido CD154 humano fue capaz de potenciar la respuesta inmunitaria en pollos. Por lo tanto, se puede poner en práctica la invención usando polipéptidos CD154 específicos de la especie o un polipéptido CD154 heterólogo. En particular, los polipéptidos CD154 y fragmentos funcionales u homólogos de los mismos incluyen polipéptidos idénticos, o al menos 99 % idénticos, al menos 98 % idénticos, al menos 95 % idénticos, al menos 90 % idénticos, al menos 85 % idénticos, o al menos 80 % idénticos a los
50 polipéptidos CD154 de SEQ las ID NOs: 11-17.

El vector de vacuna *Bacillus* que se describe en la presente memoria se puede usar en los métodos para potenciar una respuesta inmunitaria y los métodos para reducir la morbilidad por el virus de la gripe en un sujeto como se describió previamente. El vector de vacuna *Bacillus* se puede usar para preparar composiciones para administración
55 a sujetos tales como los que también se describen previamente.

Se pueden insertar polinucleótidos heterólogos que codifican polipéptidos antigénicos en el genoma bacteriano en cualquier sitio no esencial o, de forma alternativa, se pueden transportar sobre un plásmido usando métodos bien conocidos en la técnica. Un sitio apropiado para la inserción de los polinucleótidos es dentro de las porciones
60 externas de las proteínas transmembrana o acoplados a las secuencias que dirigen al polinucleótido heterólogo hacia vías secretorias. Entre los ejemplos de una proteína transmembrana apropiada para insertar los polinucleótidos se encuentra el gen *cotB* de *Bacillus* y el gen *lamB* de *Salmonella*.

Los polinucleótidos heterólogos incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos que codifican antígenos seleccionados
65 de microorganismos o virus patógenos distintos al vector de vacuna. Dichos polinucleótidos pueden derivar de virus patógenos tales como el virus de la gripe (p. ej., M2e, hemaglutinina, o neuraminidasa), herpesvirus (por ejemplo, los

genes que codifican las proteínas estructurales de herpesvirus), retrovirus (por ejemplo, la proteína de cubierta gp160), adenovirus, paramixovirus, coronavirus y similares. Los polinucleótidos heterólogos también se pueden obtener a partir de bacterias patógenas, por ejemplo, genes que codifican proteínas bacterianas tales como toxinas, y proteínas de la membrana externa. Además, los polinucleótidos heterólogos de parásitos, tales como *Eimeria* son candidatos atractivos para su uso en una vacuna a base de vector.

También se pueden incluir en el vector de vacuna polipéptidos inmunoestimuladores adicionales involucrados en la estimulación del sistema inmunitario como se describe en la presente memoria. Los polinucleótidos pueden codificar moléculas del sistema inmunitario que son conocidas por sus efectos estimulatorios, tales como una interleucina, factor de necrosis tumoral o un interferón, u otro polinucleótido involucrado en la regulación del sistema inmunitario.

Los siguientes ejemplos tienen solamente un propósito ilustrativo y no representan limitaciones al alcance de la invención o a las reivindicaciones adjuntas.

15 Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de HA/NP/M2e/cCD154 y HA/NP/M2e/HMGB1

20 Vectores de *Bacillus*.

Cepas y condiciones de cultivo

Todos los plásmidos se mantuvieron primero en células *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) a menos que se describa de otra manera. Se usó *Bacillus* spp. para la introducción de mutaciones (*Bacillus subtilis*, cepa Poultry Health Laboratory designada como NP122). Las bacterias que portan los plásmidos pDGIEF y pHT10 se cultivaron a 37 °C.

Se usó el medio de Luria-Bertani (LB) para el crecimiento celular de rutina, y se usó medio SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) para la expresión fenotípica después de la electroporación. En los casos apropiados, al medio se añadió lo siguiente:

Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 1 mM, ampicilina (Amp) a 100 µg/ml, espectinomicina (SP) a 100 µg/ml, y cloramfenicol (Cm) a 5 µg/ml.

35 Plásmidos

Los plásmidos pDGIEF (Bacillus Genetic Stock Center, Columbus, OH) y pHT10 que se usaron para el presente estudio se describieron previamente (Zhang et al., Nuc. Acids Research 2006, 34 (9):1-8 y Nguyen et al., Curr. Micro. 2007, 55:89-93). El plásmido pDGIEF sirvió como molde para la amplificación del gen *mazF* que se usó como contra-marcador de selección durante la manipulación del cromosoma de *Bacillus*. El plásmido pHT10 se usó para codificar y producir las secuencias de epítomos heterólogos del virus de la gripe aviar dentro de *Bacillus* spp. Este plásmido contiene un gen de resistencia a CM, se induce mediante la adición de IPTG 1 mM y se mantiene dentro de *Bacillus* a 37 °C.

45 Producción de proteínas heterólogas para la expresión en células vegetativas:

Se transformó el plásmido pHT10 adquirido de MoBioTec/Boca Scientific, Boca Ratón, FL (Nguyen et al., 2007) en el sitio de clonado múltiple mediante la adición de una secuencia de inserción optimizada por codón de *Bacillus subtilis*. Se hizo la secuenciación de ADN para confirmar la inserción correcta de la secuencia. El plásmido recién modificado se transformó entonces en *Bacillus*. Brevemente, se desarrollaron cultivos de *Bacillus* durante la noche a 37 °C en medio HS (medio de Spizzen suplementado con glucosa al 0,5 %, DL-triptófano 50 µg/ml, uracilo 50 µg/ml, hidrolizado de caseína al 0,02 %, extracto de levadura al 0,1 %, arginina 8 µg/ml, histidina 0,4 µg/ml, MgSO₄ 1 mM). Se usó el cultivo de la noche (1 ml) para inocular 20 ml de medio LS (Medio de Spizzen suplementado con glucosa al 0,5 %, DL-triptofano 5 µg/ml, uracilo 5 µg/ml, hidrolizado de caseína al 0,01 %, extracto de levadura al 0,1 %, MgSO₄ 1 mM, MgCl₂ 2,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM) y se incubó con agitación durante 3-4 horas a 30 °C. A 1 ml del cultivo de LS resultante se añadió 10 µl de EGTA 0,1 M y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación se añadió 1-2 µg de ADN plasmídico, se agitó durante 2 horas a 37 °C y se sembró en placas de LB con antibióticos de selección. Estos *Bacillus* spp. transformados producen ahora secuencias de epítomos heterólogos a partir de AI cuando se los induce con IPTG 1 mM.

60 PCR

Todos los cebadores usados para la PCR se enumeran en la Tabla 1. Las condiciones típicas de PCR consisten en aproximadamente 0,1 µg de ADN genómico purificado, plasmídico o generado por PCR (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.), 1x tampón *Pfu* polimerasa, 5U de *Pfu* polimerasa (Stratagene La Jolla, CA, EE.UU.), dNTP 1 mM (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ), 1,2 µM de cada cebador en un volumen total de 50 µl. Se usó el

ES 2 643 646 T3

DNA engine thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) con las siguientes condiciones de amplificación: 94 °C durante 2 minutos; 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 58 °C durante 60 segundos, 72 °C durante 90 segundos por cada 1 kb y 72 °C durante 10 minutos para la extensión final. Cada producto de PCR se purificó por medio de gel (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.) y se eluyó o bien con 25 µl de solución tampón EB para la preparación de los moldes que se usan en la PCR de extensión solapada o con 50 µl de tampón EB, se precipitó con etanol y se resuspendió en 5 µl de ddH₂O para electroporación en *Bacillus* spp.

Electroporación

Brevemente, se inocularon las células en 10 ml de caldo LB y se cultivaron a 37 °C durante la noche. A continuación, se reinocularon 100 µl del cultivo obtenido durante la noche en 10 ml de caldo LB fresco a 37 °C durante 3-4 horas.

5 Se lavaron las células cinco veces con agua ddH₂O y se resuspendieron en 60 µl de glicerol al 10 %. Luego se sometió a las células a pulsos de 2,4-2,45 kV durante 1-6 ms, se incubaron en 0,5 ml de SOC durante 2-3 horas a 37 °C y se sembraron en medio LB con antibióticos apropiados.

Integración cromosómica de ADN heterólogo para la expresión en la cubierta de la espora:

10 Se construyeron cepas recombinantes de *Bacillus* que contenían copias integradas estables de epítomos M2e, HA y NP seleccionados usando métodos publicados recientemente con modificación. Brevemente, se transformaron cepas de *Bacillus* con el casete MazF (Zhang et al., 2006) que generó una cepa que era sensible a IPTG y resistente a espectomicina. El casete MazF flanqueado por aproximadamente 300 pb de ADN homólogo a cada lado se introdujo en el gen *CotB* (Isticato et al., 2001) del vector *Bacillus* mediante electroporación seguida por crecimiento en medio con espectomicina para clones positivos que ahora contienen el casete *MazF* que es resistente a espectomicina.

20 Después de confirmarse la mutación de *MazF* en *CotB*, se reemplazó esta región por una secuencia de ADN optimizada por codón que codifica los epítomos antigénicos de AI de nuevo flanqueada por 300 pb de ADN homólogo. Esto se hizo mediante la creación de un producto de PCR usando PCR por solapamiento y extensión para producir las secuencias antigénicas flanqueadas por aproximadamente 300 pb a cada lado homólogo al cromosoma de *Bacillus* (Cox et al., 2007). El producto de PCR se introdujo en *Bacillus* de nuevo mediante electroporación y en sustitución del casete *MazF*. Se seleccionaron los transformantes en placas con IPTG, los clones positivos ahora no deberían responder a IPTG y deberían ser sensibles a espectomicina. La inserción de la secuencia cromosómica correcta se confirmó mediante secuenciación de ADN.

Ejemplo 2. Estudio de vacunación 1 y 2.

30 Se obtuvieron polluelos recién nacidos (día 0) de un granja comercial local y se distribuyeron al azar en los grupos de tratamiento (n=15/grupo de tratamiento, Exp. 1 y n=20/grupo de tratamiento, Exp. 2). Se marcaron y numeraron todos los polluelos de cada grupo de tratamiento. Se infectaron los polluelos por sonda nasogástrica con 0,25 ml de solución salina o 10⁶- 10⁸ ufc/ml de los diferentes tratamientos con *Bacillus* según se indica en la Tabla 2 para el estudio 1 y en la Tabla 3 para el estudio 2.

35

Tabla 2. Dosis de estimulación para cada grupo de tratamiento en el estudio de vacunación 1.

Grupo de tratamiento	Dosis de estimulación
Solución salina solo	
BS/AI/HMGB1	10 ⁶ ufc/ml
BS/AI/HMGB1	10 ⁸ ufc/ml
BS/AI/CD154	10 ⁶ ufc/ml
BS/AI/CD154	10 ⁸ ufc/ml

Tabla 3. Dosis de estimulación para cada grupo de tratamiento en el estudio de vacunación 2.

40

Grupo de tratamiento	Dosis de estimulación
BSBB (<i>Bacillus</i>)	10 ⁶ ufc/ml
BS/AI/HMGB1	10 ⁶ ufc/ml
BS/AI/CD154	10 ⁶ ufc/ml
BS/AI/HMGB1 Inactivado con calor	10 ⁶ ufc/ml
BS/AI/HMGB1 Inactivado con formalina	10 ⁶ ufc/ml
BS/AI/HMGB1 Inactivado con antibióticos	10 ⁶ ufc/ml
BS/AI/HMGB1 Inactivado con etanol	10 ⁶ ufc/ml

45 En el estudio 2, se inactivaron las bacterias de varias maneras diferentes para evaluar si la replicación era necesaria para la producción de una respuesta con anticuerpos dirigida a los péptidos antigénicos del virus de la gripe. Se usaron varias formas de inactivación debido a que los medios de inactivación pueden tener como resultado la destrucción de un epítipo y dar lugar a una mala interpretación de los resultados, lo que daría lugar a una necesidad de replicación o viabilidad del vector *Bacillus*. Las bacterias se inactivaron mediante incubación durante 10 minutos en formalina al 0,022 % (inactivados con formalina); incubación durante 10 minutos a 70 °C (inactivados con calor); incubación en gentamicina 5 µg/ml (inactivados con antibiótico); o incubación durante 10 minutos en etanol al 70 % (inactivados con etanol).

50

Cada grupo de tratamiento se alojó en un piso de gallinero individual sobre lecho de pino fresco y se proveyó con

agua y alimento *ad libitum*. En los días 11 y 21 después de la eclosión, las aves recibieron una vacuna de refuerzo del mismo tratamiento que habían recibido en el día 0. También en los días 21 y 31/32, se extrajo sangre de cada una de las aves marcadas y se separó el suero.

- 5 El suero extraído de las aves marcadas de cada grupo de tratamiento se usó a continuación en un ELISA de captura de anticuerpo para determinar la respuesta específica de anticuerpos contra M2e, HAUA y HALB. Brevemente, se recubrieron los pocillos individuales de una placa de 96 pocillos con 10 µg/ml de epítipo M2e, epítipo HAUA o epítipo HALB conjugado con BSA. Se dejó que los antígenos se adhiriesen durante la noche a 4 °C. Se lavaron las placas con PBS + Tween 20 al 0,05 %, se bloquearon con PBS Superblock (Pierce Chemical Co.) durante un
10 mínimo de 2 horas y se incubaron durante 2 horas con el suero previamente extraído de las aves de cada uno de los grupos de tratamiento descritos anteriormente. Se lavaron las placas con PBS + Tween 20 al 0,05 % seguido por incubación con anticuerpo secundario de cabra anti-IgY de pollo conjugado con peroxidasa (dilución 1:7.500), obtenido de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) durante una hora adicional. Después del subsiguiente lavado, se revelaron las placas usando un kit con sustrato para peroxidasa que se obtuvo de Fisher Scientific y se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro a 450 nm y 405 nm.

- Se usaron las muestras de suero combinadas de los grupos que recibieron los vectores de vacuna como controles positivos y se usaron muestras de suero combinadas de los grupos sin vacunar como controles negativos sobre cada placa para reemplazar al suero de los grupos de tratamiento. Las absorbancias que se obtuvieron de las
20 muestras de control positivo, control negativo y experimentales se usaron para calcular las relaciones entre muestra y control positivo (relaciones S/P) usando el siguiente cálculo:

$$\text{Calculo de la relación S/P} : \frac{\text{media de las muestras} - \text{media del control negativo}}{\text{media del control positivo} - \text{media del control negativo}}$$

- 25 Las relaciones S/P calculadas para cada estudio se muestran en las Figuras 1-6. Las Figuras 1-3 muestran los títulos de anticuerpos totales contra M2e, HALB y HAUA para el estudio 1, respectivamente, en los días 21 y 31 después de la eclosión. Los resultados demuestran que se generaron respuestas inmunitarias robustas contra cada uno de estos antígenos después de la administración oral con un *Bacillus* que expresa cada uno de los epítipos con CD154 o bien con HMGB1 como péptido inmunoestimulador. Las Figuras 4-6 muestran los títulos de anticuerpo
30 totales contra M2e, HALB y HAUA para el estudio 2, respectivamente, en los días 21 y 32 después de la eclosión. Los resultados demuestran que se generaron respuestas inmunitarias robustas contra cada uno de los epítipos después de la administración oral de un *Bacillus* vivo que expresa el epítipo y un péptido inmunoestimulador. Las Figuras 4-6 también demuestran que se generaron niveles similares de anticuerpos específicos cuando el vector (el *Bacillus*) se inactivaba antes de la administración.

35

Ejemplo 3. Estudio de vacunación 3

- Se obtuvieron polluelos recién nacidos (día 0) de una granja comercial local y se distribuyeron al azar en grupos de
40 tratamientos (n=20/grupo de tratamiento). Se marcaron y numeraron todos los polluelos de cada grupo de tratamiento. Se infectaron los polluelos mediante sonda nasogástrica con 0,25 ml de solución salina o 10⁵-10⁸ ufc/ml del vector *Bacillus* (BSBB), expresando el vector *Bacillus* los epítipos del virus de la gripe aviar y HMGB1 (BS/Al/HMGB1), o diferentes cantidades del vector BS/Al/HMGB1 después de inactivación con formalina (como se describió previamente). En el día 10 después de la eclosión, las aves recibieron una vacuna de refuerzo del mismo tratamiento que habían recibido en el día 0. También en los días 21 y 32, se extrajo sangre de cada una de las aves
45 marcadas y se separó el suero. Se determinaron los niveles séricos de anticuerpo IgG específico contra M2e usando el método que se describió previamente con un anticuerpo secundario específico anti IgG de pollo marcado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Los resultados de la Figura 7 muestran que las bacterias inactivadas con formalina fueron capaces de estimular la producción de anticuerpos IgG específicos contra M2e así como también las bacterias vivas. Este resultado fue sorprendente debido a que en general se cree
50 que solamente las bacterias vivas pueden estimular una respuesta inmunitaria robusta después de administración oral.

Ejemplo 4. Estudio de vacunación 4

- 55 Se obtuvieron polluelos recién nacidos (día 0) de una granja comercial local y se distribuyeron al azar en los grupos de tratamiento (n=20-35/grupo de tratamiento). Se marcaron y numeraron todos los polluelos de cada grupo de tratamiento. Se infectaron los polluelos mediante sonda nasogástrica o se inyectaron por vía subcutánea con 0,25 ml de 10⁶ ufc/ml del vector *Bacillus* (BSBB), expresando el vector *Bacillus* los epítipos del virus de la gripe aviar y HMGB1 (BSAI), o el vector BSAI después de inactivación con formalina (como se describió previamente) o después
60 de inactivación con formalina seguido por liofilización (reconstituido con solución salina inmediatamente antes de la administración). En el día 10 después de la eclosión, algunas de las aves recibieron una vacuna de refuerzo del mismo tratamiento que habían recibido en el día 0. En los días 11, 14 y 21, se extrajo sangre de cada una de las

aves marcadas y se separó el suero. Se determinaron los niveles de anticuerpos séricos IgA e IgG específicos contra M2e usando el método que se describió previamente con un anticuerpo secundario específico anti-IgA de pollo marcado con peroxidasa (GenTex) o anti-IgG de pollo marcado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Los resultados de la Figura 8 muestran que las bacterias inactivadas con formalina fueron capaces de estimular la producción de anticuerpos IgA específicos contra M2e aproximadamente tan bien como las bacterias vivas cuando se administran por vía oral. Por el contrario, cuando se administra por vía subcutánea, el vector BSAI inactivado no fue tan eficaz en estimular una respuesta con anticuerpos IgA y las bacterias liofilizadas no estimularon una respuesta IgA. Los resultados de la Figura 9 muestran que cada uno de los protocolos de administración de BSAI está asociado a una formación robusta de IgG.

Listado de secuencias

<110> UNIVERSITY OF ARKANSAS
THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM

<120> VECTORES DE VACUNA Y MÉTODOS PARA POTENCIAR LAS RESPUESTAS INMUNITARIAS

<130> 5658-00099

<150> US 61/297.098
<151> 21-01-2010

<160> 40

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 24
<212> PRT
<213> Virus de la gripe aviar

<220>
<221> misc_feature
<223> M2e

<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 aviar

<220>
<221> misc_feature
<223> M2e

<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

ES 2 643 646 T3

<212> PRT
<213> Virus de la gripe aviar

5 <220>
<221> misc_feature
<223> M2e

<400> 3

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

10 Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

15 <210> 4
<211> 24
<212> PRT
<213> Virus de la gripe aviar

20 <220>
<221> misc_feature
<223> M2e

<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

25 <210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Virus de la gripe aviar

30 <220>
<221> misc_feature
<223> M2e

<400> 5

35 Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn
1 5

40 <210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Virus de la gripe aviar

45 <220>
<221> misc_feature
<223> M2e

<400> 6

50 Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn
1 5

ES 2 643 646 T3

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe aviar
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> HA5 UA
 10 <400> 7

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

 <210> 8
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe aviar
 15

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> HA5 LB
 20

 <400> 8

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

 Glu Glu Leu
 25

 <210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe aviar
 30

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> NP 54-69
 35

 <400> 9

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

 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe aviar
 40

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> NP 147-160
 45

 <400> 10
 50

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

 <210> 11
 <211> 272
 <212> PRT
 55

ES 2 643 646 T3

<213> *Gallus gallus*

<220>

<221> misc_feature

5 <223> CD154 de pollo

<400> 11

```

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
          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          160

Pro Thr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr His Glu Gly Lys Leu Lys Val Glu
          165          170          175

Lys Ala Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Val Ser Phe Cys Thr Lys
          180          185          190

Ala Ala Ala Ser Ala Pro Phe Thr Leu Tyr Ile Tyr Leu Tyr Leu Pro
195          200          205

```

ES 2 643 646 T3

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
225 230 235 240

Glu Leu Arg Gln Gly Asp Met Val Phe Val Asn Val Thr Asp Ser Thr
245 250 255

Ala Val Asn Val Asn Pro Gly Asn Thr Tyr Phe Gly Met Phe Lys Leu
260 265 270

- <210> 12
- <211> 261
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- <220>
- <221> misc_feature
- 10 <223> CD154 humano

- <400> 12

ES 2 643 646 T3

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50 55 60

Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
 65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
 85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys
 100 105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
 115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
 130 135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
 145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala
 165 170 175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp
 180 185 190

<210> 19

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido sintético: BS/AI/CD154 = HA/NP/M2e/cCD154: SSS espaciador de serina

<400> 19

ES 2 643 646 T3

Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met
 1 5 10 15

Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp
 20 25 30

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn
 35 40 45

Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser
 50 55 60

Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr
 65 70 75 80

Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser
 85 90 95

Ser Ser Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser Ser Ser
 100 105 110

- <210> 20
- <211> 302
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Péptido sintético: BS/AI/HMGB1 = HA/NP/M2e/HMGB1
- <400> 20

ES 2 643 646 T3

Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met
 1 5 10 15
 Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp
 20 25 30
 Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn
 35 40 45
 Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser
 50 55 60
 Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr
 65 70 75 80
 Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser
 85 90 95
 Ser Ser Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser Ser Ser Ser
 100 105 110
 Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 115 120 125
 Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
 130 135 140
 Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 145 150 155 160

ES 2 643 646 T3

Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 165 170 175

Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
 180 185 190

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
 195 200 205

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys
 210 215 220

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
 225 230 235 240

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
 245 250 255

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
 260 265 270

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala
 275 280 285

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp
 290 295 300

<210> 21
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético: BS/AI/CD154

<400> 21

ES 2 643 646 T3

Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met
 1 5 10 15

Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp
 20 25 30

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn
 35 40 45

Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser
 50 55 60

Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr
 65 70 75 80

Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser
 85 90 95

Ser Ser Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser Ser Ser
 100 105 110

<210> 22

<211> 290

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético: BS/AI/HMGB1

10

<400> 22

ES 2 643 646 T3

Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met
1 5 10 15

Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp
20 25 30

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn
35 40 45

Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser
50 55 60

Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr
65 70 75 80

Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser
85 90 95

Ser Ser Ser Ser Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys
100 105 110

Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys
115 120 125

Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys
130 135 140

Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe
145 150 155 160

Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys
165 170 175

Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro
180 185 190

ES 2 643 646 T3

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

Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp
 210 215 220

Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp
 225 230 235 240

Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu
 245 250 255

Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys
 260 265 270

Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu
 275 280 285

Glu Asp
 290

<210> 23
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético: HMGB1 caja a1

<400> 23

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
 20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50 55 60

Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
 65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr
 85

<210> 24

ES 2 643 646 T3

<211> 54
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Péptido sintético: HMGB1 caja a2
 <400> 24

Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu
 1 5 10 15

Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met
 20 25 30

Ala Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val
 35 40 45

Pro Pro Lys Gly Glu Thr
 50

10

<210> 25
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Péptido sintético: HMGB1 caja b1

20

<400> 25

Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe
 1 5 10 15

Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser
 20 25 30

Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala
 35 40 45

Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu
 50 55 60

Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr
 65 70

25 <210> 26
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético: HMGB1 caja b2

ES 2 643 646 T3

<400> 26

Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu
1 5 10 15

Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp
20 25 30

Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp
35 40 45

Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu
50 55 60

Lys Asp Ile Ala Ala
65

5

<210> 27
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Péptido sintético: HMGB1 Dominio de unión a RAGE

15

<400> 27

Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe
1 5 10 15

Cys Ser Glu Phe Arg
20

20

<210> 28
<211> 33
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Péptido sintético: HMGB1 actividad citocina proinflamatoria

<400> 28

Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly
1 5 10 15

Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser Lys
20 25 30

Lys

30

<210> 29
<211> 215
<212> PRT

ES 2 643 646 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

5 <223> HMGB1

<400> 29

```

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 1                               5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
 20                               25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 35                               40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50                               55 60

Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
 65                               70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
 85                               90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys
 100                              105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
 115                              120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
 130                              135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
 145                              150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val
 165                              170 175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu
 180                              185 190

Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu
 195                              200 205

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 210                              215

```

ES 2 643 646 T3

<210> 30
 <211> 205
 <212> PRT
 5 <213> *Danio rerio*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> HMGB1 de pez cebra
 10
 <400> 30

```

Met Gly Lys Asp Pro Thr Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala
1          5          10          15

Tyr Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Glu
20          25          30

Ala Thr Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp
35          40          45

Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys
50          55          60

Leu Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Asn Tyr Ile Pro Pro
65          70          75          80

Lys Gly Glu Lys Lys Lys Arg Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg
85          90          95

Pro Pro Ser Ala Phe Phe Ile Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Val
100         105         110

Lys Glu Glu Thr Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Arg Leu
115         120         125

Gly Glu Met Trp Asn Lys Ile Ser Ser Glu Glu Lys Gln Pro Tyr Glu
130         135         140

Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala
145         150         155         160

Tyr Arg Ser Lys Gly Lys Val Gly Gly Gly Ala Ala Lys Ala Pro Ser
165         170         175

Lys Pro Asp Lys Ala Asn Asp Glu Asp Glu Asp Asp Asp Glu Glu Glu
180         185         190

Asp Glu Asp Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Asp Asp Glu
195         200         205
    
```

ES 2 643 646 T3

<210> 31
 <211> 53
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético: mazF directo – gen MazF

 10 <400> 31
 ctaaaatctt cagatgatca atcatcctca ctgcccgctt tccagtcggg aaa 53

 <210> 32
 <211> 44
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético: mazF inverso - gen MazF

 20 <400> 32
 tgaacgtgac gaacgaccag atttcccct atgcaagggt ttat 44

 <210> 33
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético: CotB arriba directo - Cot B arriba

 30 <400> 33
 gaaatgctcg atgctgatga 20

 35 <210> 34
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Cebador sintético: Cot B arriba inverso - Cot B arriba

 <400> 34
 45 ggatgattga tcatctgaag attttag 27

 <210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Cebador sintético: Cot B dn directo - Cot B abajo

 <400> 35
 55 aaatctggtc gttcgtcacg ttca 24

 <210> 36
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Cebador sintético: Cot B dn inverso - Cot B abajo

 <400> 36
 65 ttacgtttcc agtgatagtc tatcg 25

ES 2 643 646 T3

5	<p><210> 37 <211> 186 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> Cebador sintético: BS/AI/HMGB1 directo - BS/AI/HMGB1 CotB arriba</p>	
10	<p><400> 37</p> <p>aaccattctt tcaattgtaa ttgaattttg aatcagctctg cctgatgatg acagttcttc 60</p> <p>ataatcatta aaatcgcccg gatagcacag atcatttgcc ggatttgctg atgatgaatc 120</p> <p>catgcctggt ctaaccagtg ctcttgttct ttgatatgtg gatgattgat catctgaaga 180</p> <p>ttttag 186</p>	
15	<p><210> 38 <211> 200 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
20	<p><220> <223> Cebador sintético: BS/AI/HMGB1 inverso - BS/AI/HMGB1 CotB abajo</p> <p><400> 38</p> <p>ttacaattga aagaatggtt ctgtcatcat catcaactgct gtcaagaatt aatcattttg 60</p> <p>aaaaaattca atcatcatca gaagttgaaa caccgattag aaattcatca tcatggatga 120</p> <p>caacatcata tgcaccgaca tcatcatcat cagaagttga aacaccgatt agaaataaat 180</p> <p>ctggtcgttc gtcacgttca 200</p>	
25	<p><210> 39 <211> 177 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
30	<p><220> <223> Cebador sintético: BS/AI/CD154 directo - BS/AI/CD154 CotB arriba</p>	
35	<p><400> 39</p> <p>ttcaaaatga ttaattcttg acagcagtga tgatgatgac agaaccattc tttcaattgt 60</p> <p>aattgaattt tgaatcagtc tgcctgatga tgacagttct tcataatcat taaaatcgcc 120</p> <p>oggatagcac agatcatttg ccggatttgc ggatgattga tcatctgaag attttag 177</p>	
40	<p><210> 40 <211> 194 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
45	<p><220> <223> Cebador sintético: BS/AI/CD154 inverso - BS/AI/CD154 CotB abajo</p> <p><400> 40</p>	

ES 2 643 646 T3

caagaattaa tcattttgaa aaaattcaat catcatcaga agttgaaaca ccgattagaa	60
attcatcatc actgaaagaa aaatatgaaa aagatattgc agcatataga gcaaaaggca	120
aagttgatgc aggcaaaaaa gttggtgcaa aagcagaaaa atcaaaaaaa aaatctggtc	180
gttcgtcacg ttca	194

REIVINDICACIONES

1. Un vector de vacuna que es un vector bacteriano, vírico o a base de liposomas, comprendiendo el vector un polipéptido antigénico y un polipéptido HMGB1 comprendidos cada uno dentro de una proteína transmembrana, en donde el polipéptido antigénico y el polipéptido HMGB1 están presentes en la superficie del vector de vacuna, en donde el polipéptido antigénico es opcionalmente un polipéptido del virus de la gripe y el polipéptido del virus de la gripe se selecciona opcionalmente de un polipéptido del virus de la gripe M2e, HA o NP en donde el polipéptido HMGB1 se selecciona de las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y un homólogo del mismo que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencia con al menos una de las SEQ ID NO: 18, 29 o 30.
2. El vector de vacuna de la reivindicación 1, en el que el polipéptido antigénico se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 1, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 2, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 3, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 7, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 8, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 9 o un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 10.
3. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el polipéptido HMGB1 se selecciona de las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30.
4. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el vector de vacuna es una bacteria, opcionalmente un *Bacillus* spp.
5. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el polipéptido antigénico y/o el polipéptido HMGB1 están dentro de un bucle externo de una proteína transmembrana.
6. Una composición que comprende el vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente formulado para administración oral o nasal.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que el vector de vacuna no es capaz de replicarse, está inactivado o muerto.
8. Uso del vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o de las reivindicaciones 12-14 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 6-7 en la fabricación de un medicamento para potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto al polipéptido antigénico.
9. El uso de la reivindicación 8, en el que el vector de vacuna está formulado para ser administrado por vía oral o intranasal.
10. El uso de la reivindicación 9, en el que la respuesta inmunitaria es una respuesta de anticuerpo IgA al polipéptido antigénico.
11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que el vector de vacuna no es capaz de replicación en el sujeto o está inactivado o muerto antes de la administración al sujeto.
12. Un vector de vacuna *Bacillus* spp. que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido antigénico presente sobre la superficie del vector de vacuna y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido inmunoestimulador, en donde el polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulador están comprendidos cada uno dentro de una proteína transmembrana y están presentes sobre la superficie del vector de vacuna, en donde
- (i) el polipéptido antigénico es un polipéptido del virus de la gripe y en donde
- (ii) el polipéptido inmunoestimulador es un polipéptido HMGB1, en donde el polipéptido HMGB1 se selecciona entre SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y un homólogo del mismo que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con al menos una de las SEQ ID NO: 18, 29 o 30.
13. El vector de vacuna de la reivindicación 12, en el que el polipéptido inmunoestimulador comprende además un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40 y tiene menos de 50 aminoácidos y comprende los aminoácidos 140-149 de la SEQ ID NO: 11.
14. El vector de vacuna de la reivindicación 12 o de la reivindicación 13, en el que el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están insertados dentro de una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica una porción externa de una proteína transmembrana.
15. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que el polipéptido antigénico es un

ES 2 643 646 T3

polipéptido del virus de la gripe M2e, un polipéptido del virus de la gripe HA o un polipéptido NP del virus de la gripe, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 1, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 2, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 3, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

16. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en el que el polipéptido HMGB1 se selecciona de las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30.

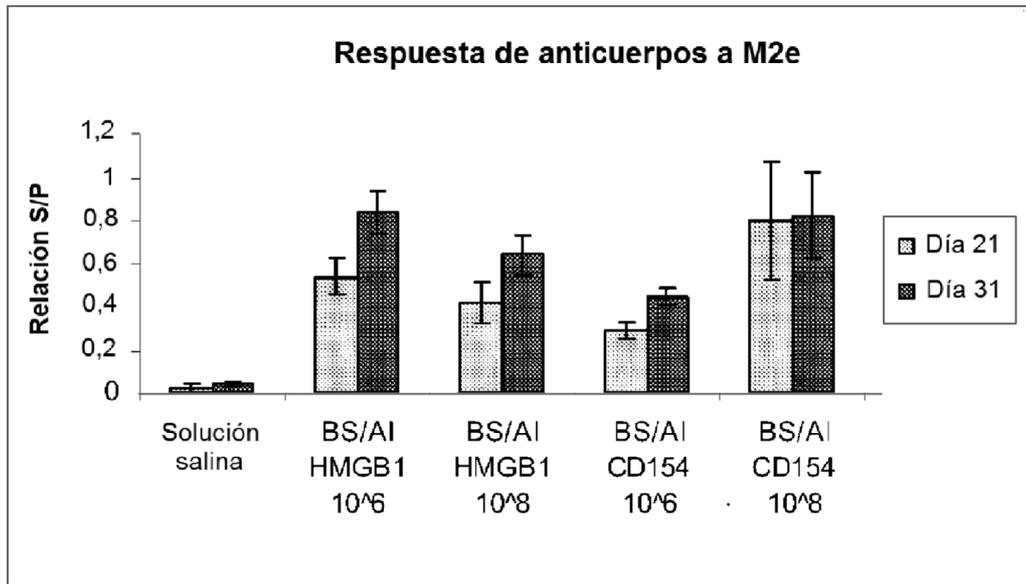


Fig. 1

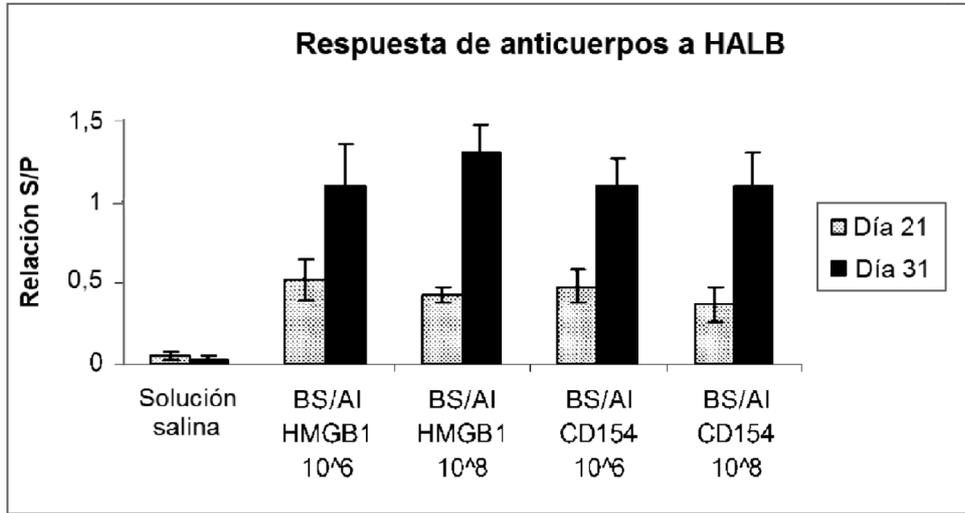


Fig. 2

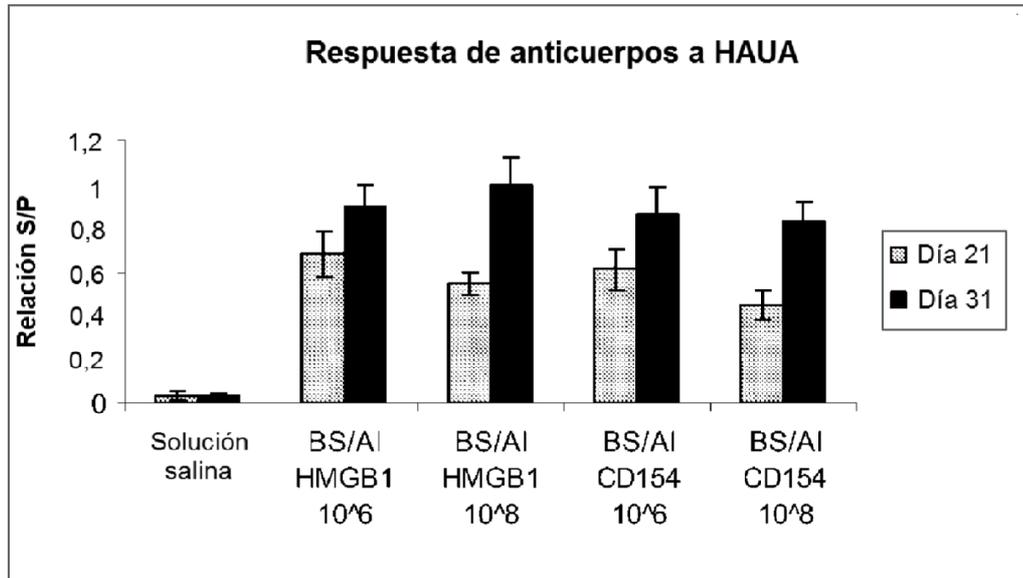


Fig. 3

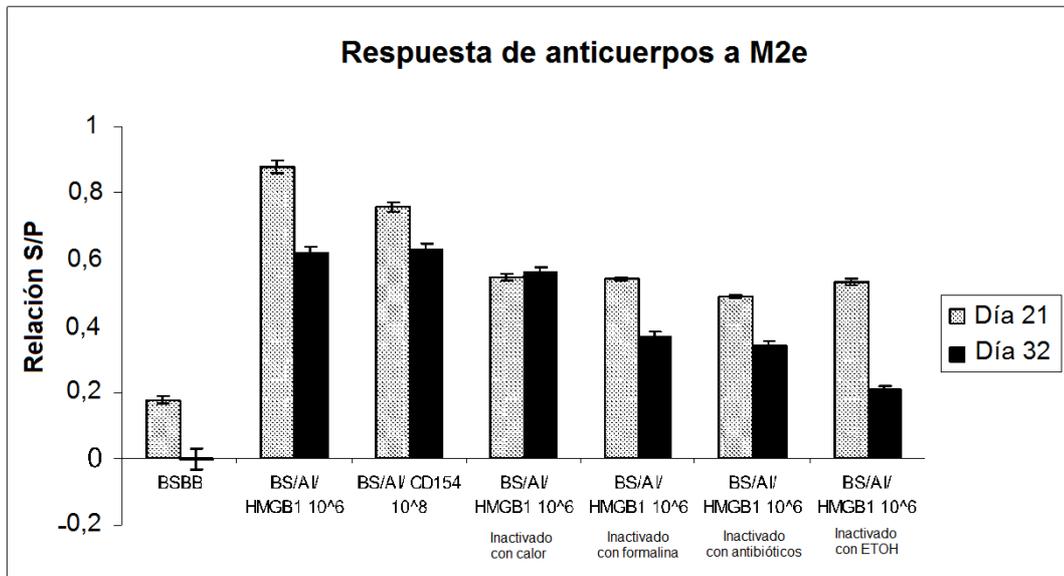


Fig. 4

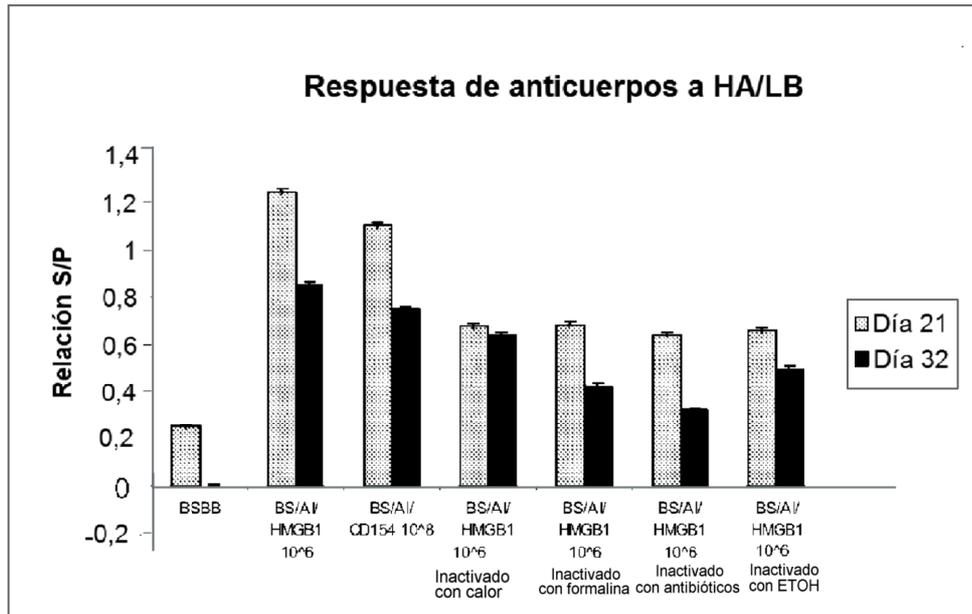


Fig. 5

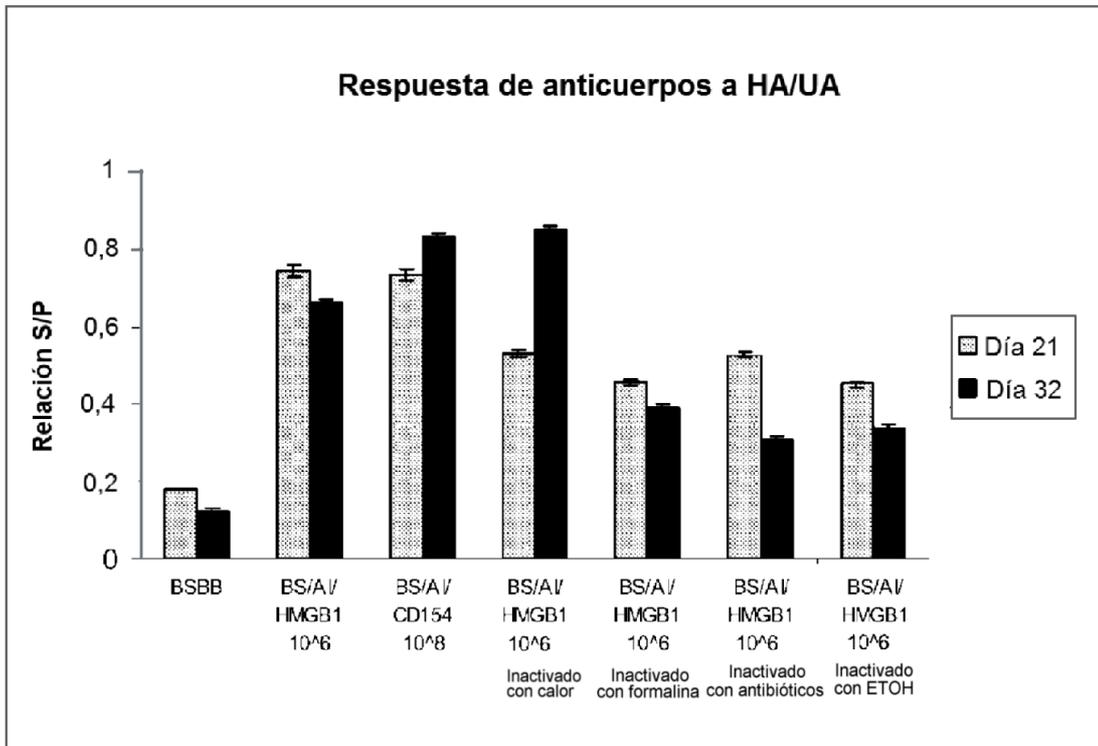


Fig. 6

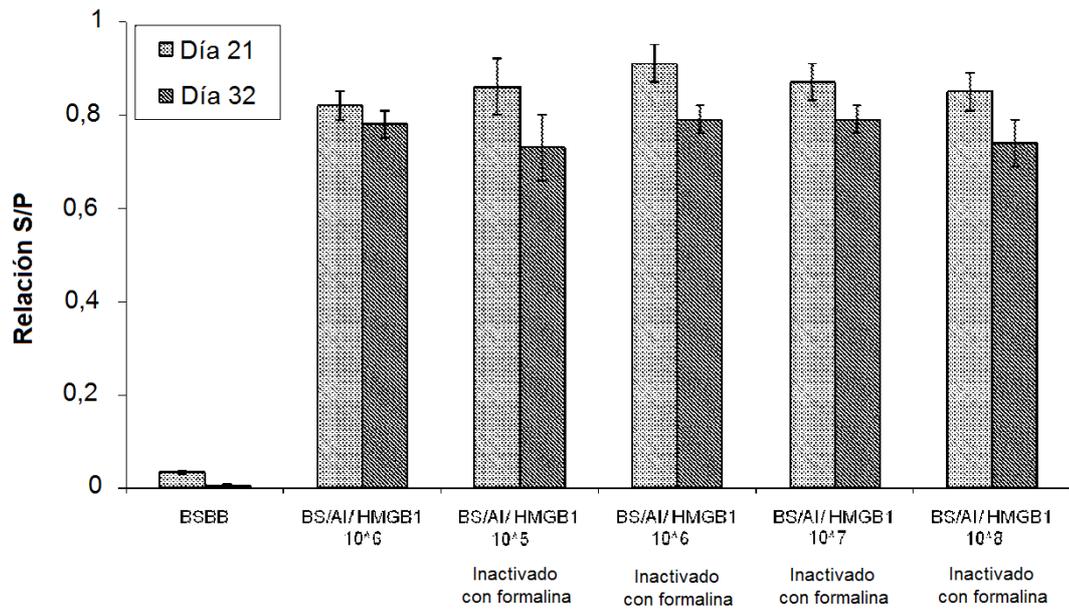


Fig. 7

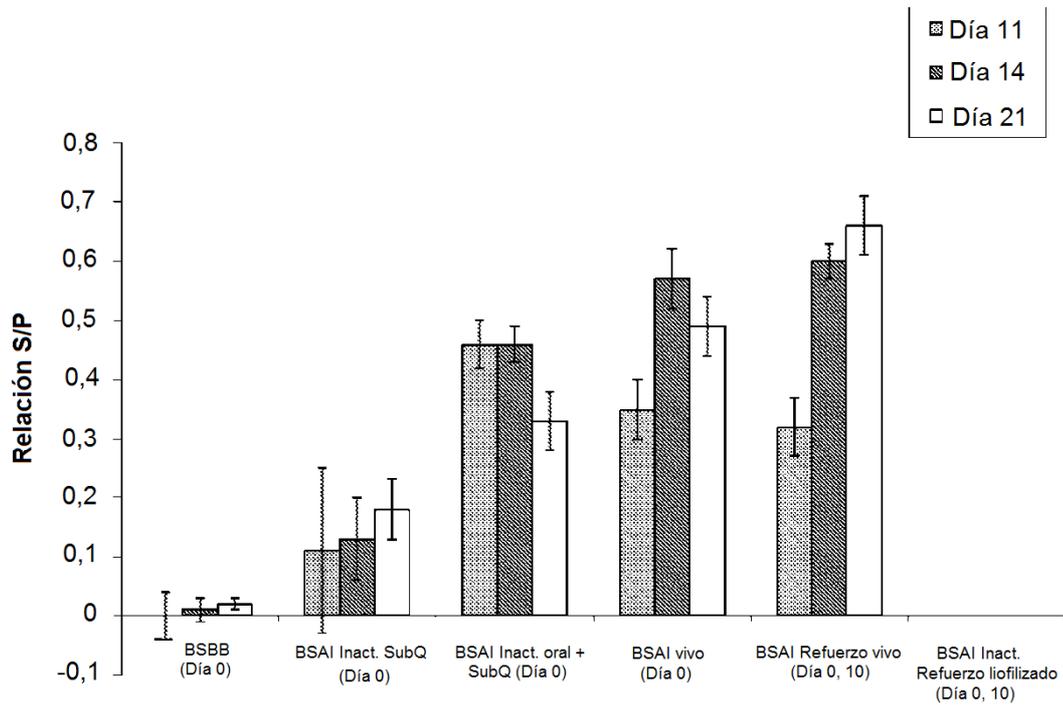


Fig.8

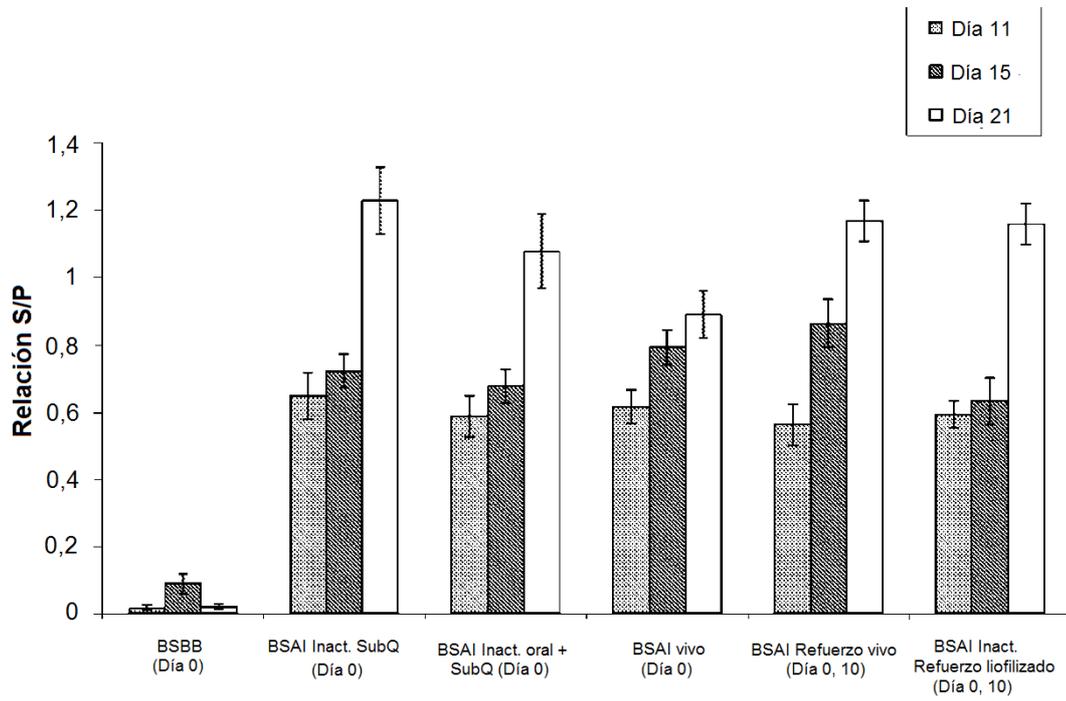


Fig. 9