

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 142**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/02** (2006.01)

**C07K 14/205** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2011 PCT/US2011/039832**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2011 WO11156619**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2011 E 11793174 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2579901**

54 Título: **Vacuna y métodos para reducir una infección por Campylobacter**

30 Prioridad:

**09.06.2010 US 353039 P**

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

**07.04.2020**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS (100.0%)  
2404 North University Avenue  
Little Rock, AR 72207, US**

72 Inventor/es:

**HARGIS, BILLY;  
PUMFORD, NEIL, R.;  
KWON, YOUNG, MIN 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 2 753 142 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Vacuna y métodos para reducir una infección por *Campylobacter*

## 5 LISTADO DE SECUENCIAS

Un Listado de Secuencias acompaña a la presente solicitud. El Listado de Secuencias se presentó con la solicitud como un archivo de texto el 9 de junio de 2011.

## 10 Antecedentes

El repertorio de vacunas seguras y rentables para la generación de inmunidad de mucosa contra diversos agentes es limitado. La principal causa bacteriana de enfermedad gastrointestinal humana en todo el mundo es *Campylobacter*. La gastroenteritis bacteriana continúa representando una amenaza significativa para el público en general en los Estados Unidos y en el extranjero en el futuro previsible. Las infecciones con *Campylobacter jejuni* se producen con mayor frecuencia que las infecciones más publicitadas por especies de *Salmonella* o *Escherichia coli* O157:H7. La carga real de enfermedad de la gastroenteritis por *Campylobacter* en todo el país es de 500-850 infecciones/100.000 personas por año.

20 El *Campylobacter* no solo es la causa principal de gastroenteritis bacteriana, sino que *C. jejuni* se ha asociado a la enfermedad neuropatológica Síndrome de Guillain-Barré (SGB). Esta enfermedad potencialmente mortal puede ser una respuesta inmunitaria a estructuras similares a gangliósidos en determinadas cepas de *C. jejuni* que conducen a una respuesta autoinmunitaria contra las células nerviosas. Aunque el SGB es la secuela crónica más importante, la infección por *Campylobacter* también se asocia a una artritis reactiva, que puede progresar al síndrome de Reiter.

25 La vacunación contra *Campylobacter* ha tenido un éxito limitado usando vacunas a base de células enteras muertas o proteínas. Además, existen preocupaciones con respecto al desarrollo del síndrome de Guillain-Barré u otras secuelas a partir de la vacunación con células enteras muertas. Una vacuna satisfactoria necesitaría ser rentable, segura y eficaz por vía oral, y producirse en grandes cantidades en un período de tiempo muy corto. En la actualidad no existe ninguna vacuna de este tipo.

35 Wyszynska, Agnieszka et al. (2004) *Vaccine* 22.11: 1379-1389, describe un estudio que examina la eficacia general de cepas vacunales avirulentas de *Salmonella* que expresan antígeno de *Campylobacter* como un prototipo de vacuna bivalente de pollo. Los autores publican que los pollos inmunizados por vía oral con *Salmonella* que expresa el gen *Campylobacter cjaA* desarrollaron respuestas de anticuerpos IgG en suero e IgA en mucosas contra proteínas de membrana de *Campylobacter* y PME de *Salmonella*, como se midió mediante un ensayo ELISA. Los autores publican adicionalmente que los experimentos de protección mostraron que la inmunización de pollos con *Salmonella* avirulenta que portaba el gen *Campylobacter cjaA* redujo en gran medida la capacidad de la cepa heteróloga de *C. jejuni* de tipo silvestre para colonizar el ciego del ave.

40 Buckley, Anthony M., et al. (2010) *Vaccine* 28.4: 1094-1105, describe un estudio en el que se usaron pollos para evaluar una vacuna de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium  $\Delta$ aroA que expresa la proteína de unión a aminoácidos de *C. jejuni* CjaA como una fusión mediante plásmido al extremo C del fragmento C de la toxina tetánica. Los autores publican que sus datos respaldan el potencial de las vacunas a base de CjaA y Peb1A para el control de *C. jejuni* en aves de corral.

## Sumario

50 En el presente documento se proporcionan vectores y métodos para potenciar la resistencia a la infección por *Campylobacter* o potenciar la respuesta inmunitaria a *Campylobacter*.

55 En un aspecto, la invención proporciona un vector de vacuna, consistiendo la expresión de un polipéptido antigénico en la secuencia de la SEQ ID NO: 7 (cjaD; cj0113; GVSITVEGNCDEWGTDEYNQA), en el que el vector comprende una primera secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido antigénico, dicha primera secuencia polinucleotídica no se asocia de forma nativa al vector, en el que el vector es una bacteria. La única secuencia polipeptídica derivada de un *C. jejuni* cjaD (cj0113) que está codificada por los polinucleótidos de la bacteria es el polipéptido antigénico que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 7.

60 El vector bacteriano también incluye un polipéptido inmunoestimulador no asociado de forma nativa al vector. El vector de vacuna es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria de un sujeto vacunado que incluye una respuesta de anticuerpos IgA contra *Campylobacter*. La respuesta puede ser protectora contra el estímulo con *Campylobacter*.

65 En otro aspecto más, se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden los vectores que se proporcionan en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto más, se proporcionan vectores para su uso en métodos para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica dirigida a *Campylobacter* en un sujeto. Los métodos incluyen administrar una cantidad eficaz de los vectores que se proporcionan en el presente documento a un sujeto. En una realización, la respuesta inmunitaria terapéutica incluye una respuesta de anticuerpos IgA y la respuesta puede ser protectora.

5 En otro aspecto adicional más, en el presente documento se proporcionan vectores para su uso en métodos para potenciar la resistencia a la infección por *Campylobacter*. Los métodos incluyen administrar una cantidad eficaz de los vectores que se desvelan en el presente documento al sujeto de manera que el sujeto sea resistente a la infección después de una exposición posterior a *Campylobacter*. En una realización, la respuesta inmunitaria potenciada incluye una respuesta de anticuerpos IgA y la respuesta puede ser protectora.

### Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 es un gráfico que muestra la curva patrón para la PCR cuantitativa que muestra el número de *Campylobacter jejuni* cultivables en el eje x determinado mediante el cultivo convencional y la determinación de unidades formadoras de colonias (UFC). El número de ciclo en el que la fluorescencia cruzó el umbral en la PCR cuantitativa se muestra en el eje y.

20 La Figura 2 es un gráfico que muestra el log de ufc/g de contenido de íleo en polluelos vacunados con solución salina o vectores de Salmonella que expresan péptidos de *Campylobacter* cj0420 (SEQ ID NO: 9), cj0113 (SEQ ID NO: 7) o cj0982 (SEQ ID NO: 8) ( $10^8$  ufc/polluelo), 11 días después del estímulo con *C. jejuni* ( $10^7$  ufc/ml, 5 veces). La PCR cuantitativa se realizó en ADN total extraído mediante métodos convencionales de las mucosas del íleon. Los resultados se presentan como media +/- ETM (n = 10). Los grupos con letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes (p<0,05).

25 La Figura 3 es un gráfico que muestra el log ufc/g de contenido de íleo en polluelos vacunados con solución salina, el vector de Salmonella sin un inserto de polipéptido antigénico o el vector de Salmonella con el inserto de cj0113 (SEQ ID NO: 7) ( $10^8$  ufc/polluelo), 11 días después del estímulo con *C. jejuni* ( $10^7$  ufc/ml, 1 vez). La PCR cuantitativa se realizó en ADN total extraído mediante métodos convencionales de las mucosas del íleon. Los resultados se presentan como media +/- ETM (n = 10) y el \* indica una diferencia significativa (P <0,05).

30 La Figura 4 es un gráfico que muestra los niveles relativos de IgG *anti-Campylobacter* (relación M/P) medidos mediante ELISA los días 21 y 32 después de la administración de los vectores indicados ( $10^8$  ufc/polluelo). Los grupos con letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes (P <0,05).

35 La Figura 5 es un gráfico que muestra los niveles relativos de *anti-Campylobacter* slgA (relación M/P) en la mucosa del íleon el día 32 después de la vacunación con los vectores indicados ( $10^8$  ufc/polluelo). Los grupos con letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes (P <0,05).

40 La Figura 6 es un gráfico que muestra los niveles de IgG en suero (relación M/P) los días 21 y 31 después de la vacunación y los niveles de slgA (relación M/P) en la mucosa del íleon el día 32 después de la vacunación con solución salina, el vector de Salmonella sin un inserto o el vector con el polipéptido antigénico, cj0113 (SEQ ID NO: 7) ( $10^8$  ufc/polluelo). Un \* indica una diferencia significativa con respecto a los controles (P <0,05).

45 La Figura 7 es un gráfico que muestra los niveles de anticuerpos IgG en suero específicos de *C. jejuni* 10 días después de la vacunación por sonda oral con cepa de base de *Bacillus subtilis* (BSBB, por sus siglas en inglés) o candidato de vacuna vectorizada de *Bacillus subtilis* cj0113 (SEQ ID NO: 7) a  $10^8$  ufc/polluelo. Los datos se presentan como media  $\pm$  ETM indicando el \* una diferencia significativa (P <0,05) de ambos controles.

50 La Figura 8 es un gráfico que muestra los niveles de anticuerpos IgA secretorios específicos de *C. jejuni* 10 días después de la vacunación por sonda oral con cepa de base de *Bacillus subtilis* (BSBB, por sus siglas en inglés) o candidato de vacuna vectorizada de *Bacillus subtilis* cj0113 (SEQ ID NO: 7) a  $10^8$  ufc/polluelo. La mucosa se recogió en la región del íleon. Los datos se presentan como media  $\pm$  ETM indicando el \* una diferencia significativa (P <0,05) de ambos controles.

55 La Figura 9 es un gráfico que muestra el log<sub>10</sub> de UFC de *C. jejuni* por gramo de contenido de íleon enumerado mediante PCR cuantitativa. Se estimularon aves vacunadas con la cepa de base de *Bacillus subtilis* (BSBB) o vector de *Bacillus subtilis* que expresa cj0113 (SEQ ID NO: 7), con *C. jejuni* a  $1 \times 10^8$  ufc/polluelo y después se enumeraron 10 días después mediante PCR. La qPCR se realizó en el ADN total extraído mediante métodos convencionales de las mucosas del íleon. Los resultados se presentan como log<sub>10</sub> medio de ufc/gramo de contenido de íleon  $\pm$  ETM (n = 10) y el \* indica una diferencia significativa (P <0,05) con respecto al control.

60 La Figura 10 es un gráfico que muestra el log<sub>10</sub> de UFC de *C. jejuni* por gramo de contenido de íleon de pavo enumerado mediante PCR cuantitativa. Se estimularon pavos vacunados con cepa de base o vacuna vectorizada de *Salmonella* cj0113 (SEQ ID NO: 7), con *C. coli* a  $1 \times 10^8$  ufc/polluelo y después se enumeraron 12 días después mediante PCR. La qPCR se realizó en el ADN total extraído mediante métodos convencionales de las mucosas del íleon. Los resultados se presentan como log<sub>10</sub> medio de ufc/gramo de contenido de íleon  $\pm$  ETM (n = 10) y el \* indica una diferencia significativa (P <0,05) con respecto al control.

### Descripción detallada

65 Los vectores de vacunas que desencadenan, respuestas inmunitarias mucosas, humorales y mediadas por células contra múltiples serovares de *Campylobacter* ofrecen un enfoque prometedor para limitar la gastroenteritis por *Campylobacter*. Este proyecto usa un enfoque novedoso en el desarrollo de vacunas mediante la inserción de secuencias de polinucleótidos que codifican epítopos lineales no nativos (polipéptidos antigénicos). Los polipéptidos

antigénicos pueden usarse en combinación con un polipéptido inmunoestimulador tal como CD154 (CD40L) o HMGB1 (caja de grupo de alta movilidad 1, por sus siglas en inglés) en el vector de vacuna. El polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulador no son polipéptidos que se encuentren asociados de forma nativa al vector. El epítipo o polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulador pueden expresarse en la superficie de vectores recombinantes. Los vectores son bacterianos. Los vectores pueden estar vivos, vivos y atenuados, o muertos antes de la administración. Los datos preliminares sustanciales, tales como los que se muestran en los Ejemplos, demuestran que las construcciones de *Salmonella* o *Bacillus* que expresan un epítipo extraño son capaces de inducir rápidamente anticuerpos específicos de epítipo de alto título *in vivo*. Además, la coexpresión de CD154 de superficie o HMGB1 potenció eficazmente la respuesta de anticuerpos contra el epítipo extraño.

Las tecnologías de ADN recombinante permiten una manipulación relativamente fácil de muchas especies bacterianas. Algunas bacterias son levemente patógenas o no patógenas, pero son capaces de generar una respuesta inmunitaria robusta. Estas bacterias fabrican vectores de vacunas atractivos para desencadenar una respuesta inmunitaria a un antígeno heterólogo, no nativo o extraño. Los vectores de vacuna bacterianos pueden imitar la infección natural y producir inmunidad robusta y duradera. Los vectores de vacunas con frecuencia son relativamente baratos de producir y administrar. Además, dichos vectores con frecuencia pueden portar más de un antígeno y pueden proporcionar protección contra múltiples agentes infecciosos.

Pueden insertarse polinucleótidos que codifiquen los antígenos polipeptídicos de cualquier número de organismos patógenos en el vector de vacuna y pueden expresarse para generar polipéptidos antigénicos. Un polipéptido antigénico es un polipéptido que es susceptible de ser reconocido específicamente por el sistema inmunitario adaptativo. Un polipéptido antigénico incluye cualquier polipéptido que sea inmunógeno. Los polipéptidos antigénicos incluyen, pero sin limitación, antígenos relacionados con patógenos, relacionados con alérgenos, relacionados con tumores o relacionados con enfermedades. Los patógenos incluyen patógenos víricos, parasitarios, fúngicos y bacterianos, así como patógenos proteínicos tales como los priones.

Los polipéptidos antigénicos pueden ser proteínas de longitud completa o porciones de las mismas. Está bien establecido que el reconocimiento del sistema inmunitario de muchas proteínas se basa en un número relativamente pequeño de aminoácidos, con frecuencia denominado epítipo. Los epítipos pueden ser de solo 8-10 aminoácidos. Por tanto, los polipéptidos antigénicos que se describen en el presente documento pueden ser proteínas de longitud completa, epítipos de 8 aminoácidos de longitud o cualquier porción entre estos extremos. De hecho, el polipéptido antigénico puede incluir más de un epítipo de un solo patógeno o proteína. Convenientemente, el polipéptido antigénico es un polipéptido que no está asociado de forma nativa al vector. No asociado de forma nativa incluye polipéptidos antigénicos que también pueden aparecer de forma nativa en el vector, pero que se expresan de forma recombinante como un epítipo, se expresan en combinación con un polipéptido diferente como una proteína de fusión para permitir la visualización diferencial y la potenciación diferencial de la respuesta inmunitaria en comparación con el polipéptido expresado de forma nativa.

Pueden incluirse múltiples copias del mismo epítipo o múltiples epítipos de diferentes proteínas en el vector de vacuna. Se prevé que pueden administrarse varios epítipos o antígenos de los mismos o diferentes patógenos o enfermedades en combinación en un solo 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 a 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.

Los polinucleótidos pueden insertarse en el cromosoma del vector de vacuna o codificarse en plásmidos u otro ADN extracromosómico. Los polinucleótidos que codifican epítipos pueden expresarse independientemente (es decir, unidos operativamente a un promotor funcional en el vector) o pueden insertarse en un polinucleótido del vector de vacuna (es decir, un polinucleótido nativo o un polinucleótido no nativo) que se expresa en el vector. Convenientemente, el polinucleótido del vector de vacuna codifica un polipéptido expresado en la superficie del vector de vacuna tal como una proteína transmembrana. El polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico puede insertarse en la secuencia polinucleotídica del vector de vacuna en fase para permitir la expresión del polipéptido antigénico en la superficie del vector. Por ejemplo, el polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico puede insertarse en marco en un polinucleótido bacteriano en una región que codifica una región de bucle externo de una proteína transmembrana de manera que la secuencia polinucleotídica del vector permanezca en marco. Véanse los Ejemplos a continuación en los que los polipéptidos antigénicos se insertan en un bucle externo del gen *lamB* del vector de *Salmonella enteritidis*.

Como alternativa, el polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico puede insertarse en un polipéptido secretado. Los expertos en la materia apreciarán que el polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico podría insertarse en una amplia diversidad de polinucleótidos de vector de vacuna para proporcionar la expresión y presentación del polipéptido antigénico a las células inmunitarias de un sujeto tratado con el vector de vacuna. En los Ejemplos, se insertaron varios polinucleótidos de *Campylobacter* en la secuencia codificante de *lamB* de *Salmonella enteritidis*. Las bacterias recombinantes resultantes expresan los polipéptidos antigénicos insertados en la superficie de la bacteria. Los polinucleótidos pueden insertarse en CotB de *Bacillus subtilis* de manera que las

bacterias recombinantes expresen los polipéptidos antigénicos insertados en esporas o en slp para la expresión en superficie en bacterias vegetativas.

5 En este caso se describen polinucleótidos que codifican proteínas de *Campylobacter* de longitud completa que incluyen cjaD (SEQ ID NO: 1), cjaA (SEQ ID NO: 2) y ACE393 (SEQ ID NO: 3) o un polipéptido antigénico de estas proteínas. En los Ejemplos, se usaron polipéptidos antigénicos derivados de las proteínas de longitud completa como se indica a continuación: SEQ ID NO: 7 (un polipéptido de cjaD denominado cj0113); SEQ ID NO: 8 (un polipéptido de cjaA denominado cj0982); y SEQ ID NO: 9 (un polipéptido de ACE 393 denominado cj0420). Los polinucleótidos utilizados en los Ejemplos se proporcionan como las SEQ ID NO: 4-6, respectivamente. Los polinucleótidos utilizados en los Ejemplos tenían los polipéptidos antigénicos de las SEQ ID NO: 7-9 separados por enlazadores de serina y unidos a los aminoácidos 140-149 de CD154 (tres aminoácidos antes, después y entre el polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulador).

15 Convenientemente, la porción del polipéptido antigénico insertado en el vector de vacuna es inmunógena o antigénica. Un fragmento inmunógeno es un péptido o polipéptido capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria celular o humoral. Convenientemente, un polipéptido antigénico puede tener 20 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos u 8 o más aminoácidos de la secuencia de longitud completa. Convenientemente, la respuesta inmunitaria generada contra el patógeno objetivo es una respuesta inmunitaria protectora. Una respuesta inmunitaria protectora es una respuesta capaz de bloquear o reducir la morbilidad o mortalidad provocada por una infección posterior con el patógeno objetivo, es decir, *Campylobacter*.

25 Un experto en la materia apreciará que cualquiera de estas secuencias polinucleótídicas puede usarse en combinación con cualquier otro polipéptido antigénico, incluyendo polipéptidos de otros patógenos u organismos heterólogos, y también puede usarse junto con polinucleótidos que codifiquen polipéptidos inmunoestimuladores, tales como un polipéptido de CD154 o HMGB1 tal como se describe en las Solicitudes Internacionales N.º WO2008036675 y WO/2011/091255.

30 También pueden insertarse en un vector polinucleótidos que codifiquen polipéptidos inmunoestimuladores que sean homólogos a las proteínas del sujeto y sean capaces de estimular el sistema inmunitario para responder al epítipo extraño. Como se describe con mayor detalle a continuación, el vector puede incluir un polipéptido CD154 que es capaz de unirse a CD40 en el sujeto y estimular al sujeto para que responda al vector y su polipéptido antigénico extraño asociado. Además, un vector puede incluir un polipéptido de HMGB1 o un fragmento funcional del mismo. Como se ha descrito anteriormente con respecto a los polipéptidos antigénicos, los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos pueden insertarse en el cromosoma del vector o mantenerse extracromosómicamente. Un experto en la materia apreciará que estos polinucleótidos pueden insertarse en diversos polinucleótidos vectoriales para la expresión en diferentes partes del vector o para la secreción de los polipéptidos.

40 El polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimulador capaz de potenciar la respuesta inmunitaria a un polipéptido antigénico no nativo también puede codificar el polipéptido antigénico. El polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimulador puede estar unido al polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico, de manera que en el vector de vacuna el polipéptido inmunoestimulador y el polipéptido antigénico extraño estén presentes en el mismo polinucleótido. Por ejemplo, el polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulador pueden ser porciones de una proteína de fusión. En los Ejemplos, un polinucleótido que codifica un polipéptido de CD154 que es capaz de unirse a CD40 también codifica un polipéptido antigénico de cjaD, cjaA o ACE 393 de *Campylobacter*. Véanse las SEQ ID NO: 10-12 en el listado de secuencias adjunto para algunos ejemplos de secuencias polipeptídicas potenciales y las SEQ ID NO: 4-6 para secuencias polinucleótídicas que codifican enlazadores de serina opcionales entre el polipéptido antigénico, el polipéptido inmunoestimulador y el polipéptido hospedador.

50 En los Ejemplos, el polinucleótido que codifica los polipéptidos antigénicos de *Campylobacter* y el polinucleótido que codifica el polipéptido inmunoestimulador se insertan ambos en el bucle externo del gen transmembrana *lamB*. Los expertos en la materia apreciarán que también pueden usarse polinucleótidos vectoriales que codifiquen otras proteínas transmembrana. Además, los polinucleótidos antigénicos pueden ser extracromosómicos o pueden ser secretados por el vector. En los Ejemplos, el polinucleótido que codifica el antígeno cj0113 de *Campylobacter* (SEQ ID NO: 7) y el péptido inmunoestimulador HMGB1 (SEQ ID NO: 20) se expresaron a partir de un plásmido portado por un vector de *Bacillus* y se expresaron en la superficie celular.

60 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 tener 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 a CD40 no están altamente conservadas entre diversas especies. Las secuencias de CD154 de pollo y ser humano se proporcionan en la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14, respectivamente.

65 Las regiones de unión a CD40 de CD154 se han determinado para varias especies, incluyendo los seres humanos, pollo, de pato, ratón y vaca, y se muestran en la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 19, respectivamente. Aunque existe una variabilidad en las secuencias en la región de unión de CD40 entre especies, se ha publicado la unión cruzada entre especies de CD154 a CD40. Por ejemplo, el

polipéptido CD154 humano fue capaz de potenciar la respuesta inmunitaria en pollos. Por tanto, la invención puede ponerse en práctica usando polipéptidos de CD154 específicos de especie o un polipéptido de CD154 heterólogo.

5 La proteína HMGB1 (Caja de Grupo de Alta Movilidad 1) se identificó por primera vez como una proteína de unión a ADN crítica para la estructura y estabilidad del ADN. Es una proteína nuclear expresada de manera ubicua que se une al ADN sin especificidad de secuencia. La proteína está altamente conservada y se encuentra desde en plantas hasta en mamíferos. Las secuencias de aminoácidos de HMGB1 de pez cebra, pollo y ser humano se proporcionan en la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO: 27, respectivamente. La secuencia en todos los mamíferos está altamente conservada con una identidad de aminoácidos del 98 % y los cambios de aminoácidos son conservadores. Por tanto, una proteína HMGB1 de una especie puede sustituir a la de otra especie funcionalmente. 10 La proteína HMGB1 de longitud completa o una porción de la misma puede usarse como el polipéptido de HMGB1 en los vectores de vacuna que se describen en el presente documento. HMGB1 tiene dos regiones de unión al ADN denominadas caja A como se muestra en la SEQ ID NO: 21 y 22 y caja B como se muestra en la SEQ ID NO: 23 y 24. Véase Andersson y Tracey, *Annu. Rev. Immunol.* 2011, 29: 139-162.

15 HMGB1 es un mediador de la inflamación y sirve como señal de daño nuclear, tal como el de células necróticas. La HMGB1 también puede ser secretada activamente por las células del linaje de 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 a través del Receptor para Productos Finales Glucosilados Avanzados (RAGE) y a través de miembros de la familia de receptores de tipo Toll (TLR), en particular 20 TLR4. La actividad de unión a RAGE se ha identificado y requiere el polipéptido de la SEQ ID NO: 25. La unión a TLR4 requiere la cisteína en la posición 106 de la SEQ ID NO: 20, que se encuentra en la región de la caja B de HMGB1.

25 Las actividades inflamatorias de HMGB1 no requieren la proteína de longitud completa y se han identificado fragmentos funcionales. Se ha demostrado que la caja B es suficiente para mediar los efectos proinflamatorios de HMGB1 y, por tanto, las SEQ ID NO: 23 y 24 son polipéptidos de HMGB1 o fragmentos funcionales de los mismos dentro del contexto de la presente invención. Además, el sitio de unión a RAGE y la actividad de citocinas proinflamatorias se han cartografiado en la SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 26, respectivamente. Por tanto, estos 30 polipéptidos son fragmentos funcionales de polipéptidos de HMGB1 en el contexto de la presente invención.

Los expertos en la materia son capaces de identificar polipéptidos de HMGB1 y fragmentos de los mismos capaces de estimular la actividad de citocinas proinflamatorias, usando métodos tales como los de la Publicación Internacional N.º WO02 092004. Convenientemente, el polipéptido de HMGB1 incluye el dominio de unión a RAGE 35 en los aminoácidos 150-183 de la SEQ ID NO: 20 (SEQ ID NO: 25 o un homólogo de la misma) y el dominio de actividad de citocina proinflamatoria entre los aminoácidos 89-109 de la SEQ ID NO: 20 (SEQ ID NO: 26 o un homólogo de la misma). En particular, los polipéptidos de HMGB1 y los fragmentos funcionales u homólogos de los mismos incluyen polipéptidos idénticos o al menos un 99 % idénticos, al menos un 98 % idénticos, al menos un 95 % idénticos, al menos un 90 % idénticos, al menos un 85 % idénticos o al menos un 80 % idéntico a los polipéptidos de 40 HMGB1 de las SEQ ID NO: 20-28.

Un experto en la materia apreciará que el polipéptido de HMGB1 podría usarse para potenciar la respuesta inmunitaria a más de un polipéptido antigénico presente en un vector. El polipéptido de HMGB1 estimula una respuesta inmunitaria al menos en parte mediante la activación de células dendríticas y macrófagos y estimulando 45 de este modo la producción de IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Convenientemente, puede expresarse HMGB1 en la superficie del vector.

Al menos una porción del polipéptido antigénico y al menos una porción del polipéptido de HMGB1 u otro polipéptido inmunoestimulador pueden estar presentes en la superficie del vector de vacuna. Presente en la superficie del vector 50 de vacuna incluye polipéptidos que están comprendidos dentro de una proteína transmembrana, interactuando con o entrecruzados covalente o químicamente con una proteína transmembrana, un lípido de membrana o hidrato de carbono anclado en membrana. Un polipéptido puede estar comprendido dentro de una proteína transmembrana teniendo los aminoácidos que comprenden el polipéptido unidos a través de un enlace peptídico al extremo N, el extremo C o en cualquier lugar dentro de la proteína transmembrana (es decir, insertados entre dos aminoácidos de 55 la proteína transmembrana o en lugar de uno o más aminoácidos de la proteína transmembrana (es decir, supresión-inserción). Convenientemente, los polipéptidos pueden insertarse en un bucle externo de una proteína transmembrana. Son proteínas transmembrana adecuadas *cotB* y *lamB*, pero los expertos en la materia apreciarán que hay disponibles muchas proteínas transmembrana adecuadas.

60 Como alternativa, los polipéptidos pueden unirse covalentemente o químicamente a proteínas, lípidos o hidratos de carbono en la membrana, a través de métodos disponibles para expertos en la materia. Por ejemplo, podrían usarse enlaces disulfuro o entrecruzamiento biotina-avidina para presentar los polipéptidos antigénico y HMGB1 en la superficie de un vector de vacuna. Convenientemente, el polipéptido antigénico y el polipéptido de HMGB1 es parte de una proteína de fusión. Los dos polipéptidos pueden estar directamente unidos a través de un enlace peptídico o 65 pueden estar separados por un enlazador o una sección de una tercera proteína en la que están insertados.

En los Ejemplos, algunos de los vectores tienen los polipéptidos antigénicos de *Campylobacter* (cj0113, cj0420 y cj0982) y el polipéptido inmunoestimulador (aminoácidos 140-149 de CD154 o HMGB1 o un fragmento funcional del mismo) codificados en el mismo polinucleótido (*lamB*) de manera que las secuencias estén en marco entre sí y con el polinucleótido de *Salmonella* en el que se insertaron. En algunos aspectos, pueden añadirse enlazadores entre las

5 secuencias de polinucleótidos que codifican el polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulador de manera que en el polipéptido expresado varios aminoácidos separen los dos polipéptidos. El enlazador puede ser 3 nucleótidos que codifiquen un solo aminoácido, o puede ser mucho más largo, por ejemplo, 30 nucleótidos que codifican 10 o más aminoácidos. En los Ejemplos se usó un enlazador de 9 nucleótidos y codificó tres restos de serina. Los expertos en la materia preverán fácilmente muchos otros tipos de enlazadores que podrían usarse.

10 Además, los polinucleótidos pueden estar presentes en una sola copia o en múltiples copias. Por ejemplo, pueden encontrarse tres copias del polipéptido antigénico y tres copias del polipéptido inmunoestimulador en el mismo bucle externo de una proteína transmembrana o pueden expresarse dentro de varias proteínas vectoriales diferentes. En aspectos alternativos, el polipéptido inmunoestimulador y el polipéptido antigénico pueden estar codificados por

15 polinucleótidos distintos.  
Los posibles vectores de vacuna para su uso en los métodos incluyen, pero sin limitación, *Bacillus*, *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*), *Shigella*, *Escherichia* (*E. coli*), *Yersinia*, *Bordetella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Vibrio* (*Vibrio cholerae*) y *Listeria*.

20 Convenientemente, el vector de vacuna es un organismo RGCS (reconocido generalmente como seguro). El vector de vacuna puede estar inactivado o muerto de manera que no sea capaz de replicarse. Los expertos en la materia conocen métodos para inactivar o destruir vectores de vacuna bacterianos e incluyen, pero sin limitación, métodos tales como inactivación con formalina, la inactivación basada en antibióticos, el tratamiento térmico y el tratamiento con etanol. En algunos aspectos, el vector de vacuna puede ser un vector a base de liposomas.

25 También se proporcionan composiciones que comprenden el vector y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es cualquier vehículo adecuado para la administración *in vivo*. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir agua, soluciones tamponadas, soluciones de glucosa o fluidos de cultivo bacteriano. Los componentes adicionales de las composiciones pueden incluir convenientemente excipientes tales como estabilizantes, conservantes, diluyentes, emulsionantes y lubricantes. Los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen estabilizantes tales como hidratos de carbono (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 fosfato). En especial, cuando se añaden dichos estabilizantes a las composiciones, la composición es adecuada para la liofilización o el secado por pulverización.

30 También se proporcionan métodos para potenciar las respuestas inmunitarias a *Campylobacter* en un sujeto mediante la administración de los vectores que se describen en el presente documento. El vector puede contener un polipéptido de HMGB1 o un polipéptido de CD154 capaz de estimular la respuesta inmunitaria al vector y los polipéptidos antigénicos descritos anteriormente. El vector se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto a los polipéptidos antigénicos no nativos. Convenientemente, se potencia la respuesta inmunitaria al estímulo con *Campylobacter*.

35 La potenciación de una respuesta inmunitaria incluye, pero sin limitación, potenciar las respuestas de anticuerpos. Convenientemente, se potencia la respuesta de IgA, más convenientemente la respuesta secretora de IgA se potencia después de la administración del vector en comparación con un control. El control puede ser el mismo sujeto antes de la administración del vector, un sujeto comparable al que se le administra un vector solo o un vector que expresa un polipéptido antigénico irrelevante o un polipéptido *no Campylobacter*. La respuesta de anticuerpos, convenientemente la respuesta de IgA, puede aumentarse tanto como dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o más en comparación con la respuesta de un sujeto de control. La respuesta inmunitaria potenciada también puede dar como resultado una reducción de la capacidad de *Campylobacter* para crecer o replicarse y colonizar el sujeto después de la administración de los vectores que se describen en el presente documento. Una reducción de este tipo puede someterse a ensayo estimulando un sujeto al que se le administró el vector con una infección por

40 *Campylobacter* y controlando la capacidad de las bacterias para replicarse y colonizar, es decir, infectar, el sujeto en comparación con un sujeto de control. El crecimiento de *Campylobacter* en el sujeto puede reducirse en 1 logaritmo, 2 logaritmos, 3 logaritmos, 4 logaritmos, 5 logaritmos o incluso más. El crecimiento de *Campylobacter* en un sujeto al que se le administra el vector puede estar por debajo del nivel de detección.  
45 Además, se desvelan métodos para potenciar la resistencia a la infección por *Campylobacter*. Brevemente, los métodos comprenden administrar a un sujeto los vectores descritos anteriormente que comprenden polipéptidos antigénicos de *Campylobacter* en una cantidad eficaz para desencadenar una respuesta inmunitaria. Potenciar la resistencia a la infección por *Campylobacter* incluye, pero sin limitación, reducir la incidencia de infecciones por *Campylobacter*, limitar la propagación de infecciones por *Campylobacter* de un hospedador a otro, reducir la replicación de *Campylobacter* en el sujeto, la invasión o diseminación dentro de un único hospedador, reducir la morbilidad asociada a infecciones por *Campylobacter* y reducir la duración de una infección por *Campylobacter*.

La administración del vector puede evitar que el sujeto contraiga *Campylobacter* o presente cualesquiera signos externos de enfermedad, tales como gastroenteritis o SGB. La resistencia aumentada a *Campylobacter* también puede incluir una producción aumentada de anticuerpos, convenientemente la producción de IgA. La respuesta de anticuerpos, convenientemente la respuesta de IgA, puede aumentarse tanto como dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o más en comparación con la respuesta de un sujeto de control. La respuesta inmunitaria potenciada también puede dar como resultado una reducción de la capacidad de *Campylobacter* para crecer o replicarse y colonizar el sujeto después de la administración de los vectores que se describen en el presente documento. Una reducción de este tipo puede someterse a ensayo estimulando un sujeto al que se le administró el vector con una infección por *Campylobacter* y controlando la capacidad de las bacterias para replicarse y colonizar, es decir, infectar, el sujeto en comparación con un sujeto de control. El crecimiento de *Campylobacter* en el sujeto puede reducirse en 1 logaritmo, 2 logaritmos, 3 logaritmos, 4 logaritmos, 5 logaritmos o incluso más. El crecimiento de *Campylobacter* en un sujeto al que se le administra el vector puede estar por debajo del nivel de detección.

Los polipéptidos antigénicos para su uso en todos los métodos que se describen en el presente documento son de cjaD como se ha analizado anteriormente. La inserción de los polipéptidos antigénicos en el vector puede lograrse en diversas maneras conocidas por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, el sistema de mutación dirigida al sitio sin cicatrices descrito en la Publicación de Patente Internacional N.º WO2008/036675. El vector puede ser una bacteria modificada mediante ingeniería genética para expresar polipéptidos antigénicos de *Campylobacter* junto con polinucleótidos capaces de potenciar la respuesta inmunitaria como se ha analizado anteriormente. En particular, el vector puede expresar un polipéptido de CD154 o HMGB1 para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto a los polipéptidos antigénicos. Los vectores utilizados en estos métodos pueden atenuarse o destruirse antes de la administración o el uso en los métodos.

La dosificación útil que se ha de administrar variará dependiendo de la edad, el peso y la especie del sujeto, el modo y la vía de administración y el tipo de patógeno contra el que se busca una respuesta inmunitaria. La composición puede administrarse en cualquier dosis de vector suficiente para provocar una respuesta inmunitaria. Para los vectores bacterianos, se prevé que sean adecuadas dosificaciones que varíen 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 solo 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 por tres o más semanas. Los vectores de bacterias son viables convenientemente antes de la administración, pero en algunos aspectos los vectores de bacterias pueden destruirse antes de la administración. En algunos aspectos, los vectores bacterianos pueden replicarse en el sujeto, mientras que en otras realizaciones los vectores bacterianos pueden estar atenuados y/o pueden no ser capaces de replicarse en el sujeto.

Para la administración a animales o seres humanos, las composiciones pueden administrarse mediante diversos medios incluyendo, pero sin limitación, por vía intranasal, por vía mucosa, mediante pulverización, por vía intradérmica, por vía parenteral, por vía subcutánea, por vía oral, mediante aerosol o por vía intramuscular. La administración de gotas oculares o la adición a agua potable o alimentos son medios de administración adicionales adecuados. Para pollos, las composiciones pueden administrarse *in ovo*.

Con respecto a los métodos, un sujeto incluye, pero sin limitación, un vertebrado, convenientemente un mamífero, convenientemente un ser humano, o aves, convenientemente aves de corral tales como pollos o pavos. 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. Por ejemplo, una respuesta inmunitaria se potencia si el sujeto está protegido de una infección posterior con *Campylobacter*. Específicamente, potenciar una respuesta inmunitaria puede incluir la producción potenciada de anticuerpos, tal como se demuestra en las Figuras 4-8, el cambio de clase potenciado de cadenas pesadas de anticuerpos, la maduración de células presentadoras de antígeno, la estimulación de linfocitos T auxiliares, la estimulación de linfocitos T citolíticos o la inducción de linfocitos T y B de memoria. En los Ejemplos, se observó un aumento en la cantidad de IgA secretora después de la administración del vector y se correlacionó con la protección contra la posterior infección por *Campylobacter*.

Se prevé que puedan administrarse varios epítomos o antígenos de los mismos o diferentes patógenos en combinación en un solo vector para generar una respuesta inmunitaria potenciada contra múltiples antígenos y sus patógenos asociados. Los vectores de vacuna recombinantes pueden codificar antígenos de múltiples microorganismos patógenos, virus o antígenos asociados a 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.

Los polinucleótidos heterólogos que codifican antígenos pueden insertarse en el genoma del vector de vacuna en cualquier sitio no esencial o, como alternativa, pueden incluirse en un plásmido usando métodos bien conocidos en la técnica. Un sitio adecuado para la inserción de polinucleótidos es dentro de porciones externas de proteínas transmembrana o acoplados a secuencias que se dirigen al polinucleótido heterólogo para vías secretoras. Un ejemplo de una proteína transmembrana adecuada para la inserción de polinucleótidos es el gen *lamB* de

*Salmonella*. Los polinucleótidos heterólogos incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos que codifican antígenos seleccionados entre microorganismos o virus patógenos distintos del vector de vacuna, es decir, polinucleótidos no nativos que codifican polipéptidos no nativos.

5 Los siguientes ejemplos tienen por objeto ser solamente ilustrativos.

**Ejemplos**

*Atenuación de cepas candidatas para vacuna de Salmonella*

10 Se atenuó un fago de *Salmonella enteritidis* de tipo 13A (*S. enteritidis*) mediante la introducción de mutaciones de supresión definidas e irreversibles en el gen *aroA* y/o *htrA* del genoma de *S. enteritidis* como se ha descrito anteriormente (disponible como Depósitos de ATCC N.º: PTA-7871, PTA-7872 y PTA-7873). Brevemente, la secuencia del gen diana en el genoma bacteriano de *S. enteritidis* se reemplazó con la secuencia del gen resistente a la kanamicina (Km<sup>R</sup>). Esto se realizó usando 3S-PCR y electroporación de los productos de 3S-PCR en células de *Salmonella* electrocompetentes que contenían el plásmido pKD46. La mezcla de células resultante se sembró en placas de agar LB complementadas con Km para seleccionar clones positivos que contengan un gen Km<sup>R</sup>. El gen Km<sup>R</sup> se insertó en la región genómica que contenía los genes de interés (*aroA* o *htrA*) flanqueando el gen Km<sup>R</sup> con secuencias homólogas a los genes de interés. Una vez que se obtuvieron los mutantes de Km<sup>R</sup>, las mutaciones de supresión se confirmaron mediante PCR y secuenciación de ADN. Todos los genes Km<sup>R</sup> se retiraron antes de comenzar la inserción del epítipo.

*Construcción de candidatos de vacunas recombinantes*

25 Se seleccionaron tres polipéptidos antigénicos candidatos potenciales: Omp18/cjaD (cj0113), cjaA (cj0982) y ACE393 (cj0420). Los polipéptidos seleccionados fueron los siguientes: cj0113 (GVSITVEGNCDEWGTDEYNQAWMTTTSYAPTS; SEQ ID NO: 10), cj0982c (KDIVLDAEIGGVAKGKDGKEKWMTTTSYAPTS; SEQ ID NO: 11) y cj0420 (KVALGVAVPKDSNITSVEDLKDKTLLLNKGTADAWMTTTSYAPTS; SEQ ID NO: 12), todos los insertos contienen adicionalmente una secuencia de aminoácidos 140-149 de CD 154.

35 Se construyeron cepas de *S. enteritidis* recombinantes que contenían copias integradas estables de cj0113-CD154 (cj0113), cj0420-CD154 (cj0420) o cj0982c-CD154 (cj0982) usando el método de Cox et al. *Scarless and site-directed mutagenesis in Salmonella enteritidis chromosome. BMC Biotechnol* 2007; 7: 59. Brevemente, se introdujo un sitio de enzima I-SceI junto con un gen Km<sup>R</sup> en el Bucle 9 del gen *lamB* mediante el diseño de un producto de PCR que tenía el sitio de enzima I-SceI y el gen Km<sup>R</sup> flanqueado por aproximadamente 200-300 pares de bases de ADN en cada lado, homólogo a las regiones corriente arriba y corriente abajo del Bucle 9. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla I a continuación. El producto de PCR se sometió a electroporación en células de *Salmonella* atenuadas electrocompetentes que contenían el plásmido pKD46 y la mezcla de células resultante se sembró en placas de agar LB complementadas con Km para seleccionar clones positivos que ahora contienen un gen Km<sup>R</sup>. Después de que se realizase la mutación Sce-I/Km en el Bucle 9, esta región se reemplazó por una secuencia de ADN de epítipo extraño con codones optimizados (Burns DM, Beacham IR. *Rare codons in E. coli and S. typhimurium signal sequences. FEBS Lett* 1985; 189 (2): 318-24.). Esta segunda reacción de 3S-PCR produjo el inserto de epítipo extraño flanqueado por regiones corriente arriba y abajo de Bucle 9, y el producto de PCR resultante se sometió a electroporación en SE13A electrocompetente que contenía la mutación Sce-I/Km descrita anteriormente. El plásmido pBC-I-SceI también se sometió a electroporación en las células junto con el inserto, ya que el plásmido produce la enzima I-SceI que reconoce y escinde una secuencia que crea un hueco en el sitio de la enzima I-SceI en la región del Bucle 9 del gen *LamB* donde las secuencias de epítipo extraño se insertan en el genoma SE13A. El plásmido también porta consigo un gen resistente al cloranfenicol (Cm) (Cm<sup>R</sup>), ya que los insertos que reemplazarán al gen Km<sup>R</sup> en las mutaciones deben tener un nuevo marcador de selección para contra-seleccionar contra la mutación I-SceI/Km anterior. Después de la electroporación, las células se sembraron en placas de agar LB que contenían 25 µg/ml de Cm para la selección de mutantes positivos.

Tabla I: Cebadores de PCR

Cebador	Región amplificada	Secuencia del cebador (SEQ ID NO)
lam-arriba-d	Bucle 9 arriba	5'TGTACAAGTGGACGCCAATC 3' (SEQ ID NO: 29)
lam-arriba-i	Bucle 9 arriba	5'GTTATCGCCGTCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID NO: 30)
lam-abajo-d	Bucle 9 abajo	5'ATTTCCC GTTATGCCGCAGC3' (SEQ ID NO: 31)
lam-abajo-i	Bucle 9 abajo	5'GTAAACAGAGGGCGACGAG 3'(SEQ ID NO: 32)

55

(continuación)

Cebador	Región amplificada	Secuencia del cebador (SEQ ID NO)
Km-d	gen I-Scel/Km <sup>r</sup>	5'GCTATATCAAAGACGGCGATAAC TAACTATAACGGTCTCTAAGGTAGCGA ATTTCGGGGATCCGTCGA 3'(SEQ ID NO: 33)
Km-i	gen I-Scel/Km <sup>r</sup>	5'GCTGCGGCATAACGGGAAA TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3' (SEQ ID NO: 34)
Kan4d	Gen Km <sup>r</sup> interior	5'CAAAAGCGCTCTGAAGTTCC 3' (SEQ ID NO: 35)
Kan4i	Gen Km <sup>r</sup> interior	5'GCGTGAGGGGATCTTGAAGT 3' (SEQ ID NO: 36)
lam 3d	Regiones externas del bucle 9	5'GCCATCTCGCTTGGTGATAA 3' (SEQ ID NO: 37)
lam 3i	Regiones externas del bucle 9	5'CGCTGGTATTTTGGCGGTACA 3' (SEQ ID NO: 38)
Cj0113d	Inserto con bucle 9 arriba	5'TTCATCGGTACCCCAATTCATCACAGTTACCTCAACGGTGATGCTAACACCGGAGGAGGAGT TATCGCCGCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID NO: 39)
Cj0113i	Inserto con bucle 9 abajo	5'ATGAATGGGGTACCGATGAATATAACCAGGGCGTCTCCTCCTGGATGACCACCTCCTATGCG CCGACCTCCTCCTCCATTTCCTCGTTATGCCGAGC3' (SEQ ID NO: 40)
Cj0420d	Inserto con bucle 9 arriba	5'ATCTTTACCTTTCGCAACACCACCGAATTCGCAATCCAGAACGATATCTTTGGAGGAGGAGT TATCGCCGCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID NO: 41)
Cj0420i	Inserto con bucle 9 abajo	5'GTGTTGCGAAAGGTAAAGATGGTAAAGAAAAATCCTCCTCCTGGATGACCACCTCCTATGC GCCGACCTCCTCCTCCATTTCCTCGTTATGCCGAGC3' (SEQ ID NO: 42)
Cj0982c-d	Inserto con bucle 9 arriba	5'GGTTTTATCTTTCAGATCTTCAACGCTGGTGATGTTGCTATCTTTCGGAACCGCAACACCCA GCGCAACTTTGGAGGAGGAGTTATCGCCGCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID NO: 43)
Cj0982c-i	Inserto con bucle 9 abajo	5'AAGATCTGAAAGATAAAACCCTGCTGCTGAACAAAGGTACCACCGCGGATGCGTCTCCTC CTGGATGACCACCTCCTATGCGCCGACCTCCTCCTCCTCCATTTCCTCGTTATGCCGAGC3' (SEQ ID NO: 44)

Una vez que se sospechó la mutación positiva/insertos, se realizó una secuencia de PCR y ADN para confirmar que las secuencias de inserción están presentes y son correctas.

5

*Estimulación con Campylobacter jejuni*

Se cultivaron individualmente tres aislados de tipo silvestre de *C. jejuni* de pollos de engorde para el crecimiento en fase logarítmica, se combinaron, se diluyeron en serie y se extendieron en placas para la enumeración de cultivos convencionales como se ha descrito anteriormente (Cole et al. *Effect of aeration and storage temperature on Campylobacter concentrations in poultry semen. Poult Sci* 2004; 83: 1734-8.). Estos se diluyeron a aproximadamente de 10<sup>7</sup> a 10<sup>9</sup> ufc/ml para la estimulación por sonda oral usando densidad espectrofotométrica y comparación con una curva patrón generada anteriormente. Se publican las ufc determinadas empíricamente administradas para cada uno de los experimentos que implican estímulo (véase a continuación).

15

*Estudio de vacunación 1*

En el primer estudio de inmunización, se obtuvieron 210 polluelos de engorde del día de la eclosión en un criadero comercial local y se asignaron aleatoriamente a uno de los cuatro grupos de tratamiento: solo solución salina (control negativo) o uno de los tres grupos candidatos de vacuna: cj0113, cj0420 o cj0982; n = 50/corral. Cada grupo de tratamiento se alojó en un corral de suelo individual sobre arena de pino fresca y se le proporcionó agua y alimento a voluntad. El día de la eclosión, se inocularon todos los polluelos en cada grupo de tratamiento, a través de sonda oral, con 0,25 ml de una solución que contenía aproximadamente 10<sup>8</sup> ufc/ml del tratamiento apropiado. El día 21 después de la eclosión, todas las aves de cada grupo de tratamiento se estimularon con *C. jejuni*, a través de sonda oral, con 0,25 ml de una solución que contenía 1x10<sup>7</sup> ufc/ml. Los días 3, 11, 21 (antes de la inoculación de refuerzo) y 32 después de la eclosión, se sacrificaron de forma humanitaria 10-15 aves de cada grupo de tratamiento y se extirparon asépticamente el hígado, el bazo y las amígdalas cecales para la determinación de la invasión de órganos, la colonización y la eliminación de las cepas del vector de vacuna de *Salmonella*. Además, los días 21 y 32 después de la eclosión, se extirparon secciones de íleon y se procesaron para su uso en qRT-PCR y el día 32 se extirpó una muestra de íleon separada y se diluyó 1:5 en solución salina y se usó para someter a ensayo la

30

inmunoglobulina secretora A (slgA). Además, se recogieron muestras de sangre de 10 aves por grupo de tratamiento y el suero se usó para determinar la respuesta de anticuerpos los días 21 y 32 después de la vacunación.

#### Estudio de vacunación 2

5 En el experimento 2, se obtuvieron 110 polluelos de engorde del día de la eclosión en un criadero comercial local y se asignaron aleatoriamente a uno de los dos grupos de tratamiento: solución salina solamente (control de vehículo) o candidato de vacuna de *Salmonella*, cj0113, (n = 55/corral). Cada grupo de tratamiento se alojó en un corral de  
10 suelo individual sobre arena de pino fresca y se le proporcionó agua y alimento a voluntad. El día de la eclosión, todos los polluelos en cada grupo de tratamiento se inocularon a través de sonda oral con 0,25 ml de una solución que contenía aproximadamente 10<sup>8</sup> ufc/ml del tratamiento apropiado. El día 21 después de la eclosión, todas las aves de cada grupo de tratamiento se estimularon con *C. jejuni*, a través de sonda oral, con 0,25 ml de una solución que contenía 1x10<sup>7</sup> ufc/ml. Los días 3, 11, 21 (antes de la inoculación de refuerzo) y 32 después de la eclosión, se  
15 sacrificaron de forma humanitaria 10-15 aves de cada grupo de tratamiento y se extirparon asépticamente el hígado, el bazo y las amígdalas cecales para la determinación de la invasión de órganos, la colonización y la eliminación de las cepas del vector de vacuna de *Salmonella*. Además, los días 21 y 32 después de la eclosión se extirparon las secciones de íleon y se procesaron para su uso en qRT-PCR. Además, se recogieron muestras de sangre de 10 aves por grupo de tratamiento y el suero se usó para determinar la respuesta de anticuerpos los días 21 y 32  
20 después de la eclosión.

#### Estudio de vacunación 3

Un tercer experimento fue similar al experimento de vacunación 2 (descrito anteriormente) excepto por la adición de un tercer grupo de *S. enteritidis* 13A aroA/htrA sin el epítipo de *Campylobacter* (SE13A) como control para la  
25 vacunación oral del propio vector. Todas las colecciones de muestras fueron las mismas que en el estudio de vacunación 2, excepto porque el día 32 después de la eclosión se usó una sección adicional de íleon para recoger la capa mucosa para slgA como en el experimento 1.

#### Medición de la respuesta de anticuerpos de *Campylobacter*

30 Se usó suero recogido de aves en ambos estudios de inmunización en un ELISA para determinar respuestas relativas de anticuerpos. Brevemente, se recubrieron pocillos individuales de una placa de 96 pocillos con *C. jejuni*. Se permitió que transcurriera la adhesión de antígeno durante la noche a 4 °C, después, las placas se lavaron y se bloquearon con Superblock (Pierce) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las placas se incubaron  
35 durante 2 horas con una dilución 1:50 de los sueros recogidos anteriormente. Las placas se aclararon nuevamente seguido de incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de pollo marcado con peroxidasa (Jackson Immunolaboratories) durante una hora adicional. Después del aclarado posterior, las placas se desarrollaron usando un kit de sustrato de peroxidasa (BD OptEIA, Fisher Scientific) y las absorbancias se leyeron en un espectrofotómetro a 450 nm. Cada placa contenía un control positivo y un control negativo donde una muestra agrupada de polluelos  
40 vacunados y suero de pollo preinmune, respectivamente, reemplazó el suero de los grupos de tratamiento. Las absorbancias obtenidas para el control positivo, el control negativo y las muestras experimentales se usaron para calcular las relaciones de Muestra con respecto a Positivo (relaciones M/P) usando el siguiente cálculo: (media de la muestra - media de control negativo) / (media de control positivo - media de control negativo) (Brown et al. *Detection of antibodies to Mycoplasma gallisepticum in egg yolk versus serum samples. J Clin Microbiol* 1991; 29  
45 (12): 2901-3 y Davies et al. *Evaluation of the use of pooled serum, pooled muscle tissue fluid (meat juice) and pooled faeces for monitoring pig herds for Salmonella. J Appl Microbiol* 2003; 95 (5): 1016-25.). El método ELISA utilizado para la detección de slgA fue similar al ensayo descrito anteriormente para la inmunoglobulina sérica, excepto porque los inventores usaron anticuerpo de cabra anti-IgA de pollo conjugado con peroxidasa de rábano picante (GenTex) en lugar del conjugado de anticuerpo anti-IgG de pollo.  
50

#### Aislamiento de ADN y PCR cuantitativa para *C. jejuni*

La extracción de ADN total de muestras ileales se consiguió usando el kit QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). El protocolo incluido por el fabricante se modificó ligeramente de las siguientes maneras: se retiraron contenidos ileales  
55 para incluir la capa mucosa y se diluyeron 1:5 (p/v) con PBS helado + Tween 20 al 0,05 %; se añadió un ml de la suspensión a 1 ml del tampón ASL incluido en un tubo de microcentrifuga de 2,0 ml, la mezcla se agitó formando un vórtice y se calentó a 70 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se siguieron las recomendaciones del fabricante hasta la última etapa cuando el ADN se eluyó en un volumen final de 50 ul.

60 La determinación cuantitativa de *C. jejuni* se logró usando un método publicado anteriormente con ligeras modificaciones (Skanseng et al. *Comparison of chicken gut colonisation by the pathogens Campylobacter jejuni and Clostridium perfringens by real-time quantitative PCR. Mol Cell Probes* 2006; 20 (5): 269-7) 9. El ensayo se optimizó para su uso en la mezcla maestra MX3005P (Agilent Technology) y Brilliant II QPCR (Agilent Technologies). Todos los demás componentes de la mezcla, cebadores, sonda y condiciones de ciclado permanecieron como se  
65 publicaron.

Se preparó una curva patrón (Figura 1) usando un cultivo puro de *C. jejuni* diluido en serie 10 veces y se añadió a un fondo constante de contenido ileal; se realizó el aislamiento total de ADN como se describió anteriormente.

*Análisis estadístico*

5 Los datos se analizaron usando un *ensayo t* de dos colas de Student, asumiendo variaciones desiguales para comparar la diferencia entre grupos y controles usando el software estadístico JMP™. Un valor de P <0,05 se consideró significativo.

10 **Resultados**

Se encontró una excelente correlación de cuantificación de *C. jejuni* usando técnicas convencionales de enumeración microbiológica frente a qPCR (Fig. 1) con una correlación superior al 99 % entre los dos métodos. En el experimento 1, los inventores observaron niveles significativos de colonización por las tres vacunas vectorizadas candidatas dentro de las amígdalas cecales el día 3 después de la vacunación; así como una invasión significativa de los órganos internos por el vector que expresa cj0113 en el mismo punto temporal (Tabla II). Sin embargo, el día 11 después de la vacunación, hubo una disminución en la cantidad de colonización de los tres vectores y el día 21 después de la vacunación, los vectores se habían aclarado por completo de las amígdalas cecales, así como de los órganos internos (Tabla II). Los inventores observaron la misma tendencia en su estudio de vacunación de seguimiento (experimento 2), usando cj0113 expresado en vector como candidato de vacuna, como se muestra en los datos presentados en la Tabla II.

Tabla II.

25 Porcentaje de colonización, invasión y aclaramiento del hígado, el bazo o las amígdalas cecales por *Salmonella* después de la vacunación con uno de los tres candidatos de vacuna vectorizada con *Salmonella* o sonda de solución salina.

	Hígado/Bazo				Amígdalas cecales			
	Día 3	Día 11	Día 21	Día 32	Día 3	Día 11	Día 21	Día 32
<b>Experimento 1</b>								
Solución salina	0	0	0	0	0	0	0	0
cj0420	0	0	0	0	60	0	0	0
cj0113	50	0	0	0	100	40	0	0
cj0982	0	0	0	0	70	20	0	0
<b>Experimento 2</b>								
Solución salina	0	0	0	0	0	0	0	0
cj0113	0	20	0	0	50	40	0	0

30 En los experimentos 1 y 2, la incidencia del vector de vacuna de *Salmonella* recombinante atenuada se representa como el porcentaje de hígado, bazo o amígdalas cecales positivos de 10 aves. Se sondaron polluelos por vía oral con aproximadamente 10<sup>8</sup> ufc del tratamiento apropiado el día de la eclosión y los días 3, 11, 21 y 32 después de la eclosión, se sacrificaron 10 aves de cada grupo de tratamiento y se recogieron los hígados, los bazos y las amígdalas cecales para la determinación (+/-) de los vectores de vacuna de *Salmonella* recombinante atenuada. El hígado y el bazo de cada ave se agruparon y se sometieron a ensayo como una sola muestra.

35 Los pollos se estimularon con *C. jejuni* el día 21 después de la vacunación. Se obtuvieron muestras de mucosa ileal los días 21 y 32 después de la vacunación (días 0 y 11 después de la estimulación) y se usaron para la preparación de muestras de ADN para enumerar *C. jejuni* dentro del intestino como se ha descrito anteriormente. La vacunación con los vectores candidatos cj0420 y cj0982 provocó una reducción aproximada de 1 log y 2 log (P<0,05), respectivamente, en el nivel de *C. jejuni* presente en las muestras ileales. Usando el candidato de vacuna cj0113, hubo una reducción notable de 4,8 log (P<0,05) de *C. jejuni* en el íleon en comparación con las aves de control (Fig. 2).

45 En el experimento 2, se realizó una repetición del estudio de inmunización primaria solamente con el candidato de vacuna que expresaba cj0113. En este estudio, datos de qPCR revelaron una reducción aproximada de 5 log de *C. jejuni* en la vacuna vectorizada por cj0113 SE administrada a las aves en comparación con las aves que recibieron solución salina solamente (Tabla III). Adicionalmente, en el experimento 3, la vacunación con el vector cj0113 provocó una reducción aproximada de 4 log, por debajo de los niveles detectables, de *C. jejuni* en comparación con la solución salina o la cepa parental de *Salmonella* que no contenía ningún inserto de epítipo (Fig. 3).

Tabla III.

Enumeración de *Campylobacter jejuni* por PCR cuantitativa en polluelos 11 días después de la estimulación con *Campylobacter* en el Experimento 2 (n = 10).

	Log10 ufc/gm medio de <i>C. jejuni</i> de íleon	DT <sup>a</sup>	ET <sup>b</sup>
Solución salina	5,00	0,98	0,44
cj0113	0,00	0,00	0,00

En el experimento 2, se determinó la cuantificación de *Campylobacter jejuni* en polluelos que recibieron solución salina o el candidato de vacuna vectorizada de *Salmonella*, cj0113 a  $10^8$  ufc/polluelo mediante PCR cuantitativa 11 días después de recibir una dosis de estimulación de *C. jejuni* de aproximadamente  $10^7$  ufc/ml. La qPCR se realizó en el ADN total extraído mediante métodos convencionales de las mucosas del íleon. Los resultados se presentan como log 10 ufc/gramo de contenido de íleon medio con desviación típica<sup>a</sup> y error típico<sup>b</sup> (n = 10).

Las muestras de suero recogidas en cada experimento los días 21 y 32 después de la vacunación se usaron para determinar los anticuerpos IgG específicos de *C. jejuni*. En el primer experimento, los tres candidatos de vacuna (cj0420, cj0113, cj0982) provocaron niveles de anticuerpos significativamente más altos en ambos puntos temporales en comparación con el grupo que recibió solución salina solamente (Fig. 4). También en el primer experimento, el grupo vacunado con cj0113 mostró títulos de anticuerpos significativamente más altos en comparación con cj0420 y cj0982 (Fig. 4). También se usó un ELISA para determinar los niveles de anticuerpos slgA de mucosa específicos para *Campylobacter*. Estos datos indican que el vector de vacuna cj0113 provocó un aumento significativo de los niveles de slgA en comparación con el grupo de solución salina y los dos grupos que recibieron cj0420 o cj0982 (Fig. 5). Los resultados del segundo y tercer estudio en los que solo se usó cj0113 como candidato de vacuna mostraron resultados similares al experimento 1 con aves vacunadas que tenían niveles significativamente más altos de anticuerpos IgG y slgA específicos de antígeno contra *C. jejuni* en comparación con las aves que solo recibieron solución salina (Los datos para el Experimento 3 se muestran en la Fig. 6). Además, en el tercer experimento, los niveles de anticuerpos para la cepa de base (SE13) fueron similares a los controles de solución salina (Fig. 6).

#### Estudio de vacunación vectorizada con *Bacillus*

##### Producción de proteínas heterólogas para la expresión de células vegetales

Se transformó plásmido pHT10 adquirido en MoBioTec/Boca Scientific, Boca Raton, FL (Nguyen et al., 2007) en el sitio de clonación múltiple mediante la adición de una secuencia de inserción con codones optimizados de *Bacillus subtilis* para cj0113 y HMGB1 (SEQ ID NO: 4 y 20, respectivamente). Se realizó secuenciación de ADN para confirmar la inserción correcta de la secuencia. El plásmido recién modificado se transformó después en *Bacillus*. Brevemente, se cultivaron cultivos de *Bacillus* durante la noche a 37 °C en medio HS (medio de Spizizen complementado 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, MgSO<sub>4</sub> 1 mM). Inocular 20 ml de medio LS (medio de Spizizen complementado con glucosa al 0,5 %, DL-triptófano 5 µg/ml, uracilo 5 µg/ml, hidrolizado de caseína al 0,01 %, extracto de levadura al 0,1 %, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM) con 1 ml de cultivo durante la noche e incubar con agitación durante 3-4 horas a 30 °C. Retirar 1 ml de cultivo de LS y añadir 10 µl de EGTA 0,1 M e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Añadir 1-2 µg de ADN plasmídico, agitar durante 2 horas a 37 °C y cultivar en placas de LB con antibióticos selectivos. Estos *Bacillus* spp. transformados ahora producen secuencias de epitopos heterólogos de *Campylobacter* (cj0113) y HMGB1 cuando se inducen con IPTG 1 mM.

##### Estudio de vacunación

En el estímulo por vacunación, se obtuvieron 100 polluelos de engorde del día de la eclosión en un criadero comercial local y se asignaron aleatoriamente a uno de los cuatro grupos de tratamiento: solución salina solamente, vector de *Bacillus* solo (BSBB) o  $10^6$  o  $10^8$  de candidato de vacuna de *Bacillus*, cj0113, (n = 25/corral). Cada grupo de tratamiento se alojó en un corral de suelo individual sobre arena de pino fresca y se le proporcionó agua y alimento a voluntad. El día de la eclosión, todos los polluelos en cada grupo de tratamiento se inocularon a través de sonda oral con 0,25 ml de una solución que contenía aproximadamente  $10^6$  ufc/ml de la cepa de vector de base o el vector de *Bacillus* Cj0113. El día 10, las aves recibieron una vacunación de refuerzo del mismo tratamiento que recibieron el día de la eclosión. El día 21 después de la eclosión, todas las aves de cada grupo de tratamiento se estimularon con *C. jejuni*, a través de sonda oral, con 0,25 ml de una solución que contenía  $1 \times 10^7$  ufc/ml preparada como se ha descrito anteriormente. Los días 3, 11, 21 (antes de la inoculación de refuerzo) y 32 después de la eclosión, se sacrificaron de forma humanitaria 10-15 aves de cada grupo de tratamiento y se extirparon asépticamente el hígado, el bazo y las amígdalas cecales para la determinación de la invasión de órganos, la colonización y la eliminación de las cepas del vector de vacuna. Además, los días 21 y 36 después de la eclosión se extirparon las secciones de íleon y se procesaron para su uso en qRT-PCR. Además, se recogieron muestras de

sangre de 15 aves por grupo de tratamiento y el suero se usó para determinar la respuesta de anticuerpos los días 21 y 36 después de la eclosión.

## Resultados

5 Se usaron muestras de suero recogidas el día 36 después de la vacunación para determinar los anticuerpos IgG específicos de *C. jejuni*. La vacunación con el vector de *Bacillus* que expresaba el polipéptido cj0113 provocó niveles de anticuerpos significativamente más altos en comparación con el grupo que recibió solución salina solamente o vector vacío (Fig. 7). También se usó un ELISA para determinar los niveles de anticuerpos sIgA de mucosa  
10 específicos para *Campylobacter* el día 36 después de la vacunación. Estos datos indican que el vector de vacuna que expresaba cj0113 provocó un aumento significativo en los niveles de sIgA en comparación con el vector vacío (Fig. 8).

15 Los pollos se estimularon con *C. jejuni* el día 24 después de la vacunación. Se obtuvieron muestras de mucosa ileal los días 24 y 36 después de la vacunación (días 0 y 11 después de la estimulación) y se usaron para la preparación de muestras de ADN para enumerar *C. jejuni* dentro del intestino como se ha descrito anteriormente. La vacunación con el vector cj0113 de *Bacillus* provocó una reducción aproximada de 3 log ( $P < 0,05$ ) en el nivel de *C. jejuni* presente en las muestras ileales (Fig. 9).

## 20 Estudio de vacunación en pavipollos

Puesto que la vacuna de Cj0113 vectorizada con *Salmonella* ha sido eficaz para reducir la recuperación de *Campylobacter* después del estímulo en pollos, los inventores plantearon la hipótesis de que la vacuna también  
25 podría funcionar en aves. Por tanto, para evaluar adicionalmente el uso de este sistema de entrega de epítomos, se diseñó un experimento para someter a ensayo la eficacia de la vacuna contra el estímulo con *C. coli* en pavipollos.

La vacuna  $\Delta$ SE-cj0113 se construyó como se ha descrito anteriormente. Se usó el fago de *Salmonella enteritidis* de tipo 13A (SE13A) como la cepa de base para este candidato de vacuna. Este aislado se atenuó doblemente mediante supresiones irreversibles de genes en los genes *aroA* y *htrA* como se ha descrito anteriormente. Las cepas  
30 recombinantes que contenían estas supresiones después se modificaron para incorporar el inserto cj0113 y una molécula inmunoestimuladora, CD-154 ( $\Delta$ SE-cj0113). Estas secuencias se integraron como se ha descrito anteriormente.

En este experimento, se obtuvieron 70 pavipollos de un criadero local. Se asignaron aleatoriamente a uno de los dos  
35 grupos de tratamiento y se etiquetaron. Se sondaron treinta pavipollos por vía oral con  $\Delta$ SE-cj0113  $10^8$  ufc/pavipollo y los restantes pavipollos se trataron simuladamente con solución salina. El día 21, se estimularon pavipollos con  $1,5 \times 10^8$  ufc/pavipollo de *C. coli* mediante sonda oral. Se extirparon asépticamente hígado, bazo y amígdalas cecales el día 3 (N = 10), el día 21 (N = 10) y el día 35 (N = 10) para la detección de la recuperación del vector mediante enriquecimiento en caldo de tetrionato y cultivo en placa en agar verde brillante. Los días 21 y 35, se recogieron  
40 muestras de ingesta (N = 10) y de tejido (N = 5) para su análisis posterior. Se analizó ingesta del íleon de pavipollos cultivados usando qPCR para la enumeración de *C. coli*. Se recogieron muestras de tejido de la misma región y se extrajo el ARN total. Se evaluaron las respuestas a vacunas de tipo interferón gamma y TNF-alfa.

## Resultados

45 Como se demostró anteriormente en pollos, los pavipollos desarrollaron una respuesta inmunitaria significativa después de la vacunación con vacuna de Cj0113 vectorizada con *Salmonella*. Después del estímulo, hubo una reducción de aproximadamente cinco log en *Campylobacter coli* en el íleon en comparación con los controles de vector solamente (Fig. 10). La vacunación con la vacuna de Cj0113 vectorizada con *Salmonella* parece funcionar en pavos de forma similar a los pollos.

## LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> LA JUNTA DE ADMINISTRADORES DE LA UNIVERSIDAD DE ARKANSAS  
<120> VACUNA Y MÉTODOS PARA REDUCIR LA INFECCIÓN POR *CAMPYLOBACTER*  
<130> 5658-00102  
60 <150> US 61/353.039  
<151> 09-06-2010  
<160> 44  
65 <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 753 142 T3

<210> 1  
 <211> 165  
 <212> PRT  
 <213> cjaD de *Campylobacter jejuni*

5

<400> 1

```

Met Lys Lys Ile Leu Phe Thr Ser Ile Ala Ala Leu Ala Val Val Ile
 1           5           10           15

Ser Gly Cys Ser Thr Lys Ser Thr Ser Val Ser Gly Asp Ser Ser Val
 20           25           30

Asp Ser Asn Arg Gly Ser Gly Gly Ser Asp Gly Trp Asp Ile Asp Ser
 35           40           45

Lys Ile Ser Gln Leu Asn Asp Thr Leu Asn Lys Val Tyr Phe Asp Phe
 50           55           60

Asp Lys Phe Asn Ile Arg Pro Asp Met Gln Asn Val Val Ser Thr Asn
 65           70           75           80

Ala Asn Ile Phe Asn Thr Glu Val Ser Gly Val Ser Ile Thr Val Glu
 85           90           95

Gly Asn Cys Asp Glu Trp Gly Thr Asp Glu Tyr Asn Gln Ala Leu Gly
 100          105          110

Leu Lys Arg Ala Lys Ala Val Lys Glu Ala Leu Ile Ala Lys Gly Val
 115          120          125

Asn Ala Asp Arg Ile Ala Val Lys Ser Tyr Gly Glu Thr Asn Pro Val
 130          135          140

Cys Thr Glu Lys Thr Lys Ala Cys Asp Ala Gln Asn Arg Arg Ala Glu
 145          150          155          160

Phe Lys Leu Ser Arg
 165
    
```

10 <210> 2  
 <211> 279  
 <212> PRT  
 <213> cjaA de *Campylobacter jejuni*

15 <400> 2

ES 2 753 142 T3

Met Lys Lys Ile Leu Leu Ser Val Leu Thr Ala Phe Val Ala Val Val  
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Cys Gly Gly Asn Ser Asp Ser Lys Thr Leu Asn Ser Leu  
 20 25 30

Asp Lys Ile Lys Gln Asn Gly Val Val Arg Ile Gly Val Phe Gly Asp  
 35 40 45

Lys Pro Pro Phe Gly Tyr Val Asp Glu Lys Gly Asn Asn Gln Gly Tyr  
 50 55 60

Asp Ile Ala Leu Ala Lys Arg Ile Ala Lys Glu Leu Phe Gly Asp Glu  
 65 70 75 80

Asn Lys Val Gln Phe Val Leu Val Glu Ala Ala Asn Arg Val Glu Phe  
 85 90 95

Leu Lys Ser Asn Lys Val Asp Ile Ile Leu Ala Asn Phe Thr Gln Thr  
 100 105 110

Pro Gln Arg Ala Glu Gln Val Asp Phe Cys Ser Pro Tyr Met Lys Val  
 115 120 125

Ala Leu Gly Val Ala Val Pro Lys Asp Ser Asn Ile Thr Ser Val Glu  
 130 135 140

Asp Leu Lys Asp Lys Thr Leu Leu Leu Asn Lys Gly Thr Thr Ala Asp  
 145 150 155 160

Ala Tyr Phe Thr Gln Asn Tyr Pro Asn Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Asp  
 165 170 175

Gln Asn Thr Glu Thr Phe Ala Ala Leu Met Asp Lys Arg Gly Asp Ala  
 180 185 190

Leu Ser His Asp Asn Thr Leu Leu Phe Ala Trp Val Lys Asp His Pro  
 195 200 205

Asp Phe Lys Met Gly Ile Lys Glu Leu Gly Asn Lys Asp Val Ile Ala  
 210 215 220

Pro Ala Val Lys Lys Gly Asp Lys Glu Leu Lys Glu Phe Ile Asp Asn



ES 2 753 142 T3

Met Lys Lys Val Leu Leu Ser Ser Leu Val Ala Val Ser Leu Leu Ser  
 1 5 10 15

Thr Gly Leu Phe Ala Lys Glu Tyr Thr Leu Asp Lys Ala His Thr Asp  
 20 25 30

Val Gly Phe Lys Ile Lys His Leu Gln Ile Ser Asn Val Lys Gly Asn  
 35 40 45

Phe Lys Asp Tyr Ser Ala Val Ile Asp Phe Asp Pro Ala Ser Ala Glu  
 50 55 60

Phe Lys Lys Leu Asp Val Thr Ile Lys Ile Ala Ser Val Asn Thr Glu  
 65 70 75 80

Asn Gln Thr Arg Asp Asn His Leu Gln Gln Asp Asp Phe Phe Lys Ala  
 85 90 95

Lys Lys Tyr Pro Asp Met Thr Phe Thr Met Lys Lys Tyr Glu Lys Ile  
 100 105 110

Asp Asn Glu Lys Gly Lys Met Thr Gly Thr Leu Thr Ile Ala Gly Val  
 115 120 125

Ser Lys Asp Ile Val Leu Asp Ala Glu Ile Gly Gly Val Ala Lys Gly  
 130 135 140

Lys Asp Gly Lys Glu Lys Ile Gly Phe Ser Leu Asn Gly Lys Ile Lys  
 145 150 155 160

Arg Ser Asp Phe Lys Phe Ala Thr Ser Thr Ser Thr Ile Thr Leu Ser  
 165 170 175

Asp Asp Ile Asn Leu Asn Ile Glu Val Glu Ala Asn Glu Lys  
 180 185 190

5 <210> 4  
 <211> 120  
 <212> ADN  
 <213> cjaD de *Campylobacter jejuni*

10 <400> 4

tcctcctccg gtgtagcat caccgttgaa ggtaactgtg atgaatggg taccgatgaa 60

tataaccagg cgtcctcctc ctggatgacc acctcctatg cgccgacctc ctcctcctcc 120

15 <210> 5  
 <211> 162  
 <212> ADN

ES 2 753 142 T3

<213> cjaA de *Campylobacter jejuni*

<400> 5

tcctcctcca aagttgcgct ggggtgttgcg gttccgaaag atagcaacat caccagcgtt 60

gaagatctga aagataaaac cctgctgctg aacaaaggta ccaccgcgga tgcgtcctcc 120

5 tcctggatga ccacctccta tgcgccgacc tcctcctcct cc 162

<210> 6

<211> 120

<212> ADN

10 <213> ACE 393 de *Campylobacter jejuni*

<400> 6

tcctcctcca aagatatcgt tctggatgcg gaaatcggtg gtggttgcgaa aggtaaagat 60

ggtaaagaaa aatcctcctc ctggatgacc acctcctatg cgccgacctc ctccctcctcc 120

15

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

20 <213> Cj0113 de *Campylobacter jejuni*

<400> 7

Gly Val Ser Ile Thr Val Glu Gly Asn Cys Asp Glu Trp Gly Thr Asp  
1 5 10 15

Glu Tyr Asn Gln Ala  
20

25

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Cj0982 de *Campylobacter jejuni*

30

<400> 8

Lys Asp Ile Val Leu Asp Ala Glu Ile Gly Gly Val Ala Lys Gly Lys  
1 5 10 15

Asp Gly Lys Glu Lys  
20

35

<210> 9

<211> 35

<212> PRT

40 <213> Cj0420 de *Campylobacter jejuni*

<400> 9

ES 2 753 142 T3

Lys Val Ala Leu Gly Val Ala Val Pro Lys Asp Ser Asn Ile Thr Ser  
 1 5 10 15

Val Glu Asp Leu Lys Asp Lys Thr Leu Leu Leu Asn Lys Gly Thr Thr  
 20 25 30

Ala Asp Ala  
 35

5 <210> 10  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético: Cj0113-CD154  
 <400> 10

Gly Val Ser Ile Thr Val Glu Gly Asn Cys Asp Glu Trp Gly Thr Asp  
 1 5 10 15

Glu Tyr Asn Gln Ala Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser  
 20 25 30

15 <210> 11  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido sintético: Cj0982-CD154  
 <400> 11

Lys Asp Ile Val Leu Asp Ala Glu Ile Gly Gly Val Ala Lys Gly Lys  
 1 5 10 15

Asp Gly Lys Glu Lys Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser  
 20 25 30

25 <210> 12  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Péptido sintético: Cj0420-CD154  
 35 <400> 12

ES 2 753 142 T3

Lys Val Ala Leu Gly Val Ala Val Pro Lys Asp Ser Asn Ile Thr Ser  
 1 5 10 15

Val Glu Asp Leu Lys Asp Lys Thr Leu Leu Leu Asn Lys Gly Thr Thr  
 20 25 30

Ala Asp Ala Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser  
 35 40 45

<210> 13  
 <211> 272  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> CD154 de pollo

<400> 13

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

5

10

15

ES 2 753 142 T3

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

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> 14  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> CD154 humano

10

<400> 14

ES 2 753 142 T3

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

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

ES 2 753 142 T3

				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														

5 <210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> CD154 parcial humano

<400> 15

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

15 <210> 16  
 <211> 11

ES 2 753 142 T3

<212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
  
 <220>  
 5 <221> misc\_feature  
 <223> Péptido de CD154 de pollo  
  
 <400> 16  
  
 Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser  
 1 5 10  
 10  
  
 <210> 17  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 15 <213> *Anas sp.*  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Péptido de CD154 de pato  
 20  
 <400> 17  
  
 Trp Asn Lys Thr Ser Tyr Ala Pro Met Asn  
 1 5 10  
 25  
 <210> 18  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Mus sp.*  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Péptido de CD154 de ratón  
  
 <400> 18  
 35  
 Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys  
 1 5 10  
  
 <210> 19  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 40 <213> *Bos taurus*  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 45 <223> Péptido de CD154 de vaca  
  
 <400> 19  
  
 Trp Ala Pro Lys Gly Tyr Tyr Thr Leu Ser  
 1 5 10  
 50  
 <210> 20  
 <211> 190  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
 55  
 <220>  
 <221> misc\_feature

ES 2 753 142 T3

<223> Aminoácido de HMGB1 de pollo

<400> 20

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	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		

5

<210> 21

<211> 85

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético: Caja HMGB1 al

15

<400> 21

ES 2 753 142 T3

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

5 <210> 22  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético: Caja HMGB1 a2  
 <400> 22

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

15 <210> 23  
 <211> 73  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido sintético: Caja HMGB1 b1  
 <400> 23

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

ES 2 753 142 T3

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

- <210> 24
- <211> 69
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Péptido sintético: Caja HMGB1 b2
- <400> 24

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

- 15 <210> 25
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> Péptido sintético: Dominio de unión RAGE de HMGB1
- <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  
20

- 25 <210> 26

ES 2 753 142 T3

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

5 <220>  
 <223> Péptido sintético: Actividad de citocina proinflamatoria de HMGB1

<400> 26

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

10  
 <210> 27  
 <211> 215  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> HMGB1

20 <400> 27

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

ES 2 753 142 T3

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

<210> 28  
<211> 205  
<212> PRT  
<213> *Danio rerio*

5

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> HMGB1 de pez cebra

10

<400> 28

ES 2 753 142 T3

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

5 <210> 29  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cebador sintético: lam-arriba-d; Bucle 9 arriba

<400> 29  
tgtacaagtg gacgccaatc

20

ES 2 753 142 T3

5	<p>&lt;210&gt; 30                  &lt;211&gt; 24                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cebador sintético: lam-arriba-i; Bucle 9 arriba</p>	
10	<p>&lt;400&gt; 30                  gttatcgccg tcttgatat agcc</p>	24
15	<p>&lt;210&gt; 31                  &lt;211&gt; 20                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cebador sintético: lam-abajo-d; Bucle 9 abajo</p>	
20	<p>&lt;400&gt; 31                  attcccggt atgccgacg</p>	20
25	<p>&lt;210&gt; 32                  &lt;211&gt; 20                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cebador sintético: lam-abajo-i; Bucle 9 abajo</p>	
30	<p>&lt;400&gt; 32                  gttaacaga gggcgacgag</p>	20
35	<p>&lt;210&gt; 33                  &lt;211&gt; 68                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cebador sintético: Km-d; Gen I-Scel/Kmr</p>	
40	<p>&lt;400&gt; 33  <b>gctatatcaa agacggcgat aactaactat aacggtccta aggtagcga tttccgggga</b></p>	60
45	<p><b>tccgtcga</b></p>	68
50	<p>&lt;210&gt; 34                  &lt;211&gt; 39                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cebador sintético: Km-i; Gen I-Scel/Kmr</p>	
55	<p>&lt;400&gt; 34                  gctgcggcat aacgggaaat gtaggctgga gctgcttcg</p>	39
60	<p>&lt;210&gt; 35                  &lt;211&gt; 20                  &lt;212&gt; ADN                  &lt;213&gt; Secuencia artificial</p> <p>&lt;220&gt;                  &lt;223&gt; Cebador sintético: Kan4d; Gen Kmr interior</p>	

ES 2 753 142 T3

	<400> 35 caaaagcgct ctgaagtcc	20
5	<210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético: Kan4i; Gen Kmr interior	
15	<400> 36 gcgtgagggg atctgaagt	20
20	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador sintético: lam 3d; Regiones externas del bucle	9
30	<400> 37 gccatctcgc ttggtgataa	20
35	<210> 38 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador sintético: lam 3i; Regiones externas del bucle	9
45	<400> 38 cgctggatt ttgcggtaca	20
50	<210> 39 <211> 84 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador sintético: Cj0113d; Inserto con bucle 9 arriba	
60	<400> 39 <b>ttcatcggta cccattcat cacagttacc ttcaacggtg atgctaacac cggaggagga</b>	60
	<b>gttatcgccg tctttgatat agcc</b>	84
65	<210> 40 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Cebador sintético: Cj0113i; Inserto con bucle 9 abajo	
75	<400> 40 <b>atgaatgggg taccgatgaa tataaccagg cgtcctctc ctggatgacc acctcctatg</b>	60
80	<b>cgccgacctc ctctcctcc atttccggtt atgccgcage</b>	100
85	<210> 41 <211> 84 <212> ADN	

ES 2 753 142 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético: Cj0420d; Inserto con bucle 9 arriba	
5	<400> 41	
	atcttttacct ttcgcaacac caccgatttc cgcattccaga acgatatctt tggaggagga	60
	gttatcgccg tctttgatat agcc	84
10	<210> 42	
	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador sintético: Cj0420i; Inserto con bucle 9 abajo	
	<400> 42	
	gtgttgcgaa aggtaaagat ggtaaagaaa aatcctcctc ctggatgacc acctcctatg	60
	cgccgacctc cctcctcctcc atttcccgtt atgccgcagc	100
20	<210> 43	
	<211> 105	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador sintético: Cj0982c-d; Inserto con bucle 9 arriba	
	<400> 43	
	ggttttatct ttcagatctt caacgctggt gatggttgcta tctttcggaa cgcgaacacc	60
	cagcgcaact ttggaggagg agttatcgcc gtctttgata tagcc	105
30	<210> 44	
	<211> 121	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador sintético: Cj0982c-i; Inserto con bucle 9 abajo	
	<400> 44	
	aagatctgaa agataaaacc ctgctgctga acaaaggtag caccgaggat gcgtcctcct	60
	cctggatgac cacctcctat gcgccgacct cctcctcctc catttcccgt tatgccgcag	120
40	c	121

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria adecuada para su uso en la vacunación de aves de corral, y la expresión de un polipéptido antigénico que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 7, en donde la bacteria comprende una primera secuencia polinucleotídica que codifica dicho polipéptido antigénico, no estando dicha primera secuencia polinucleotídica asociada de forma nativa a la bacteria y que comprende adicionalmente una segunda secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido inmunoestimulador no asociado de forma nativa a la bacteria, en donde la única secuencia polipeptídica derivada de un cjaD de *C. jejuni* (cj0113) que está codificada por los polinucleótidos de la bacteria es el polipéptido antigénico que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 7.
2. La bacteria de la reivindicación 1, en donde la bacteria es de un género seleccionado entre *Salmonella*, *Escherichia*, *Bacillus* o *Lactobacillus*.
3. La bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la bacteria comprende más de una copia de la primera secuencia polinucleotídica, más de una copia de la segunda secuencia polinucleotídica o más de una copia de la primera y la segunda secuencia polinucleotídica.
4. La bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la primera secuencia polinucleotídica está unida en marco a la segunda secuencia polinucleotídica y opcionalmente la primera secuencia polinucleotídica y la segunda secuencia polinucleotídica están integradas en el genoma de la bacteria.
5. La bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulador se expresan en la superficie del vector.
6. La bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la primera secuencia polinucleotídica y la segunda secuencia polinucleotídica están insertadas dentro de una tercera secuencia polinucleotídica que codifica una porción externa de una proteína transmembrana.
7. La bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el polipéptido inmunoestimulador es un polipéptido de CD154 capaz de unirse a CD40 o un polipéptido de HMGB1, en donde el polipéptido CD154 tiene menos de 50 aminoácidos y comprende los aminoácidos 140-149 de la SEQ ID NO: 13 o se selecciona entre las SEQ ID NO: 15-19, y en donde el polipéptido de HMGB1 comprende un polipéptido seleccionado entre al menos una de las SEQ ID NO: 20-28.
8. La bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el primer polinucleótido codifica el polipéptido establecido en la SEQ ID NO: 10.
9. La bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la bacteria es capaz de potenciar la resistencia de un sujeto a una infección posterior con *Campylobacter* spp. después de la administración de la bacteria al sujeto en una cantidad eficaz.
10. Una composición farmacéutica que comprende la bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. La bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica en un sujeto, en donde la bacteria ha de administrarse al sujeto en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto al polipéptido antigénico.
12. La bacteria de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un método para potenciar la resistencia a la infección por *Campylobacter* en un sujeto, en donde la bacteria ha de administrarse al sujeto en una cantidad eficaz para potenciar la resistencia a la infección por *Campylobacter* después de una exposición posterior a *Campylobacter* spp.
13. La bacteria para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde la bacteria se atenúa o se destruye antes de la administración.
14. La bacteria para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 13, en donde la respuesta inmunitaria terapéutica incluye una producción de anticuerpos potenciada, y en donde la producción de anticuerpos potenciada comprende una mayor cantidad de IgA soluble.
15. La bacteria para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13, en donde la resistencia aumentada **se caracteriza porque** la infección posterior con *Campylobacter* spp. da como resultado un crecimiento disminuido de *Campylobacter* en comparación con un control.

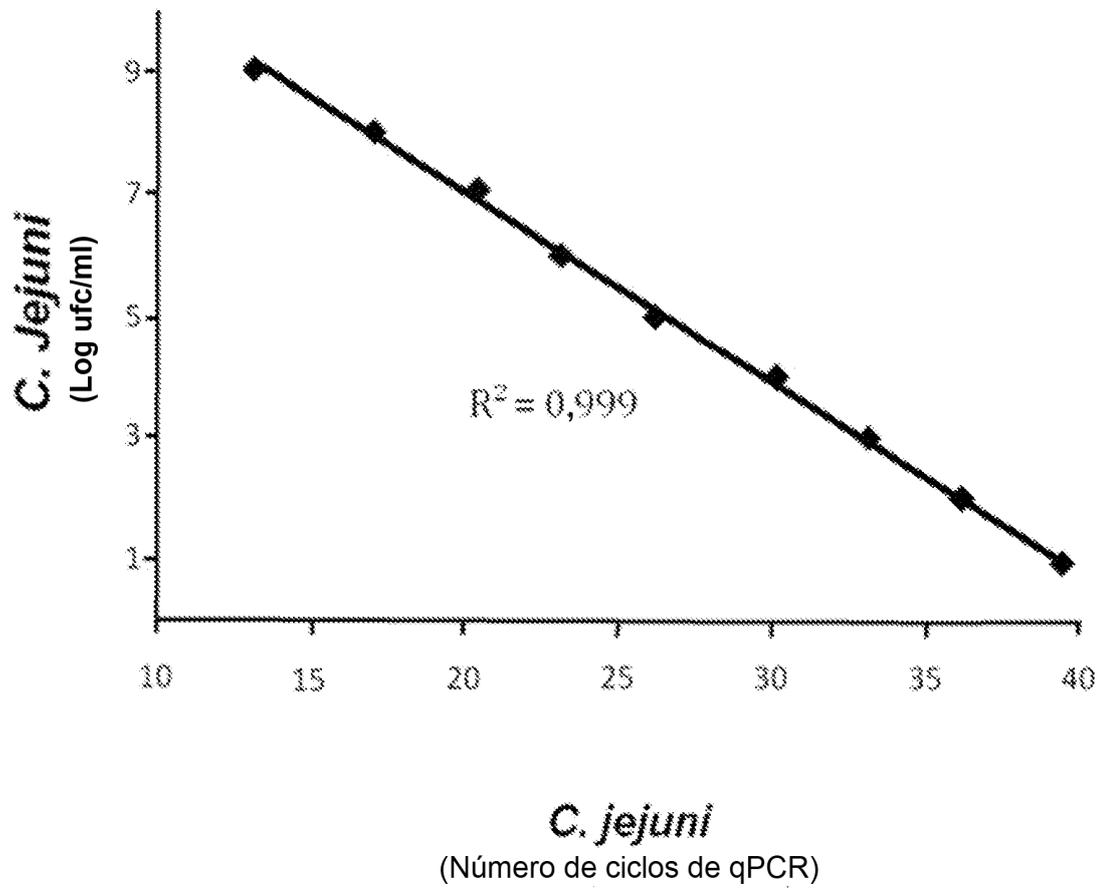


Figura 1.

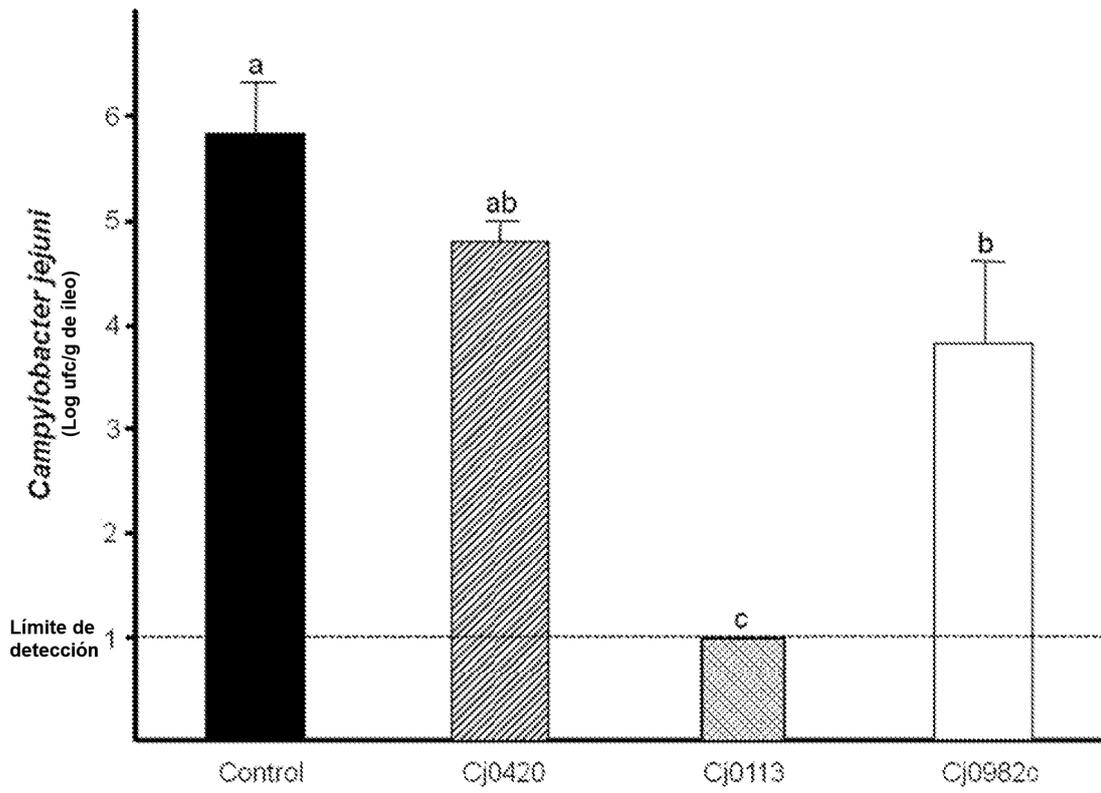


Figura 2.

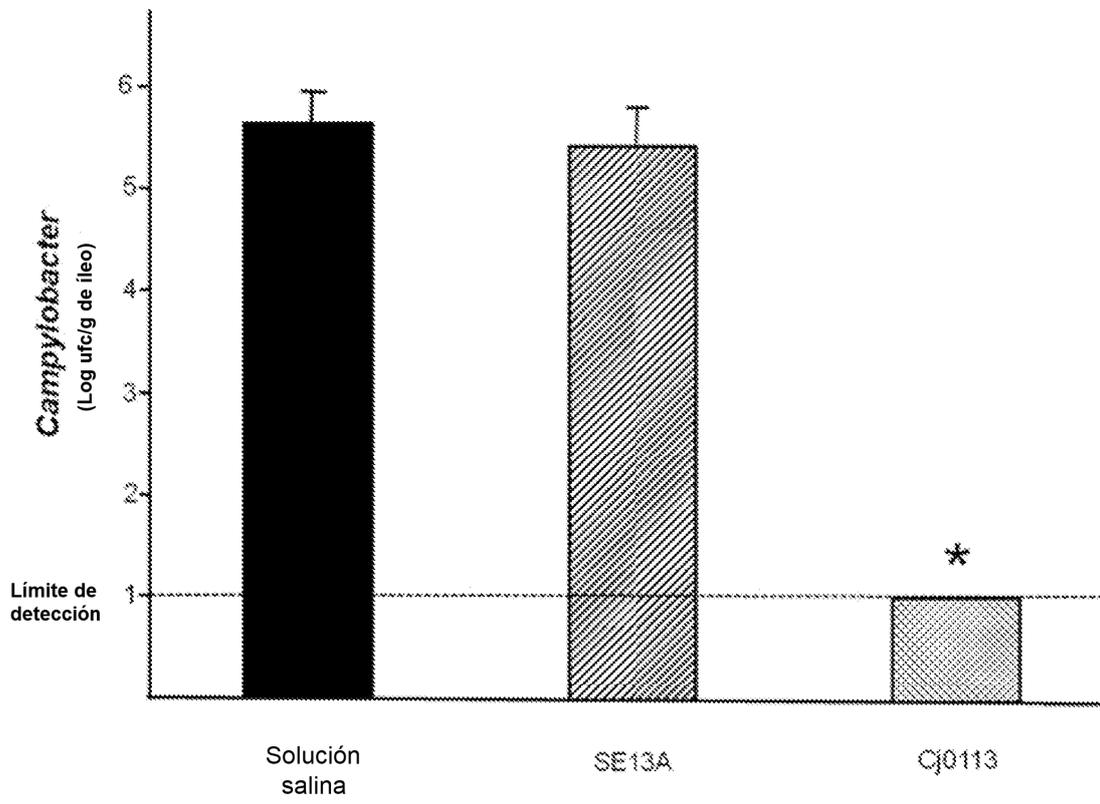


Figura 3.

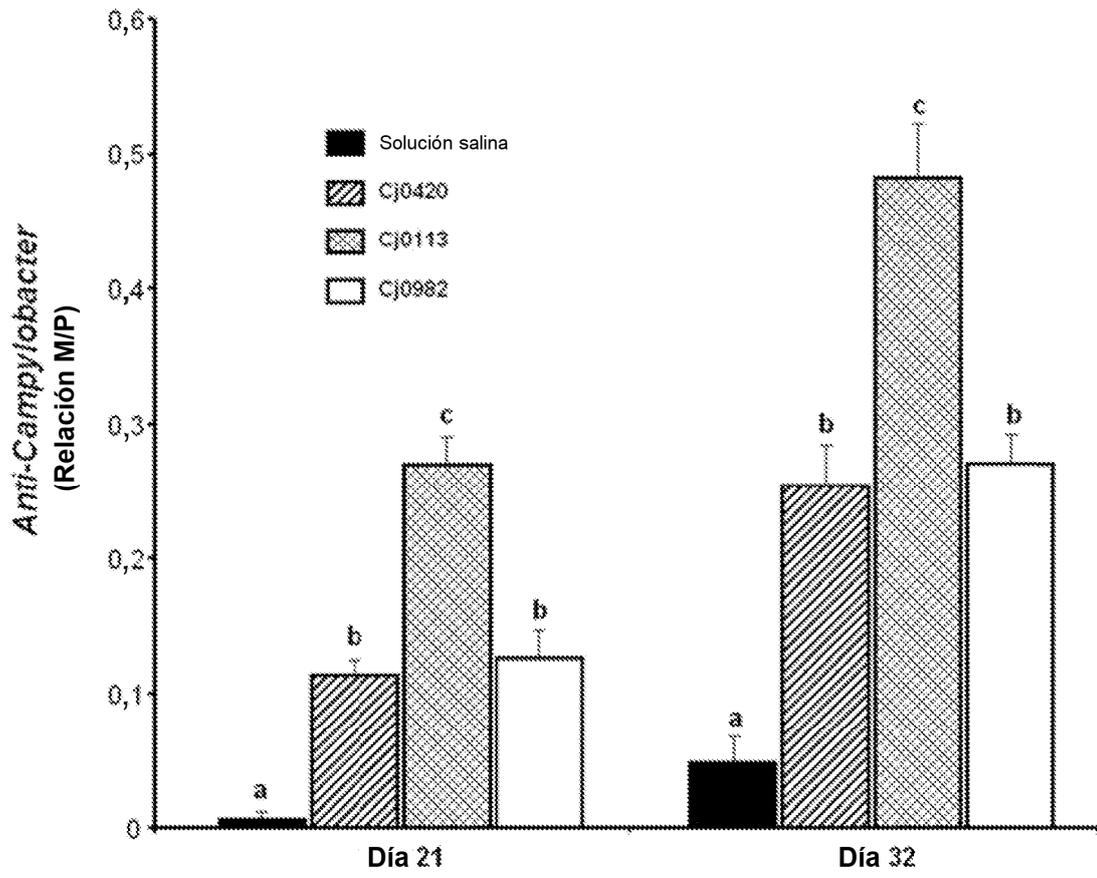


Figura 4.

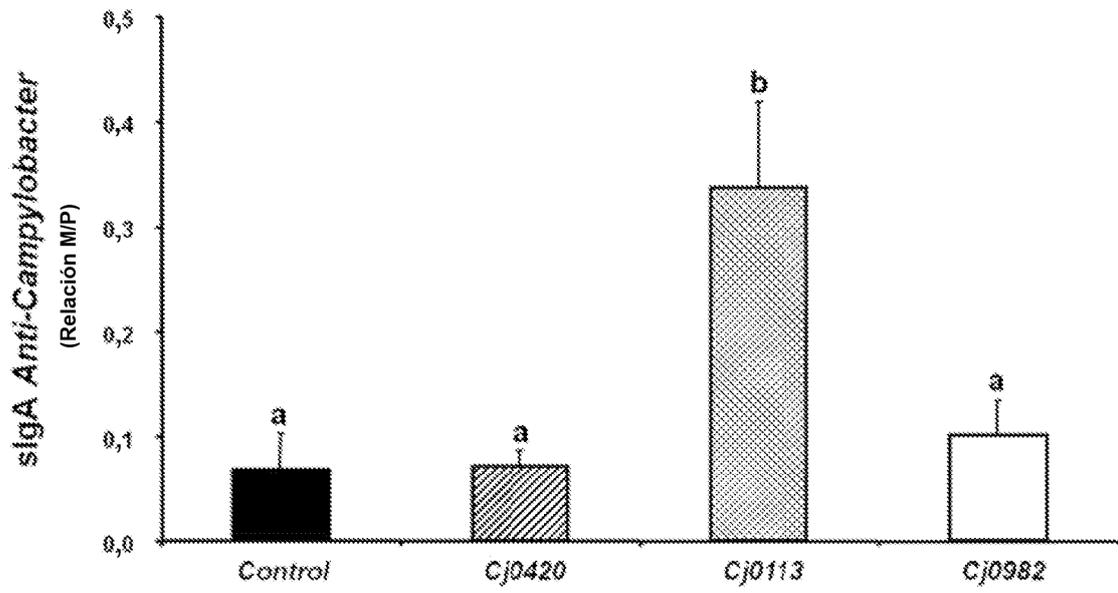


Figura 5.

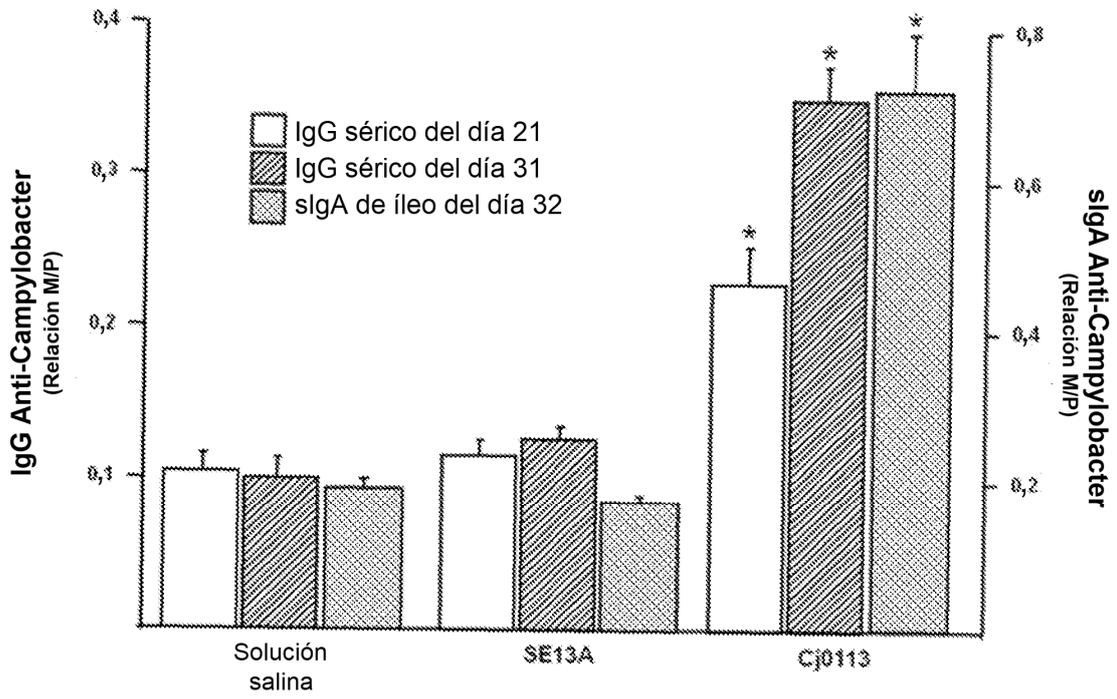


Figura 6.

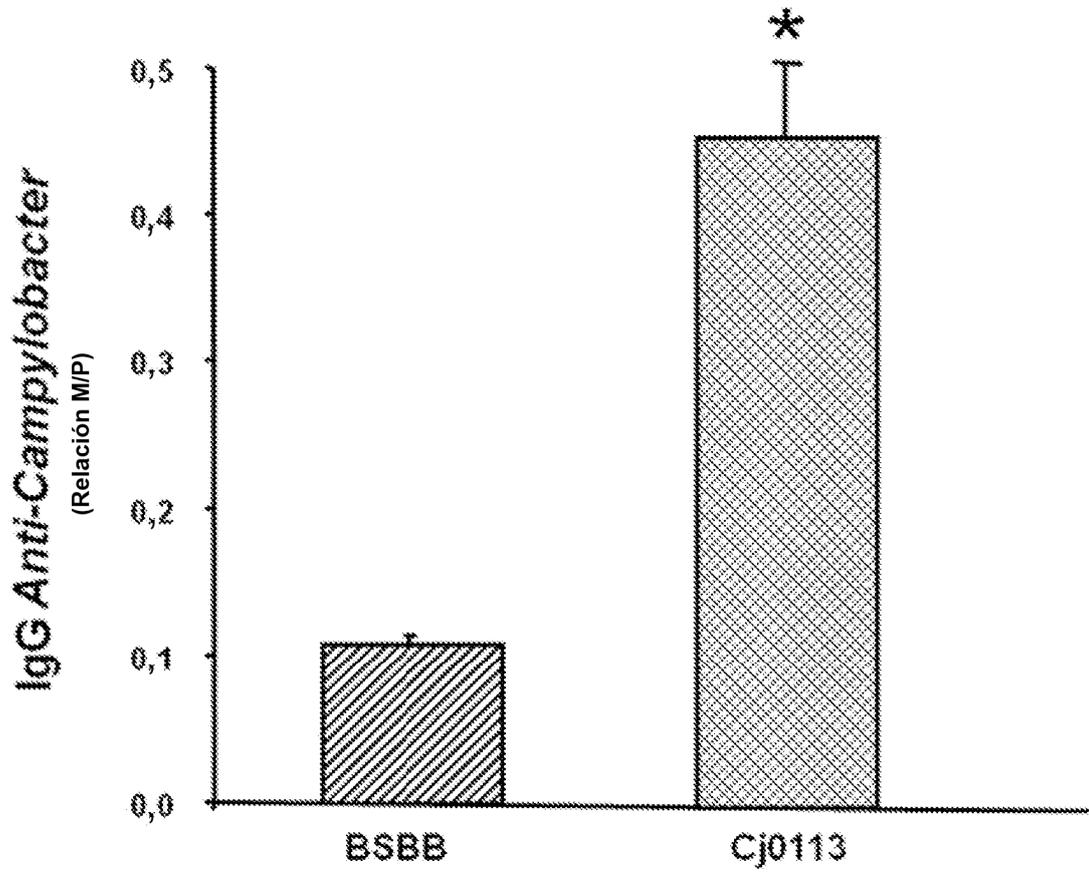


Figura 7.

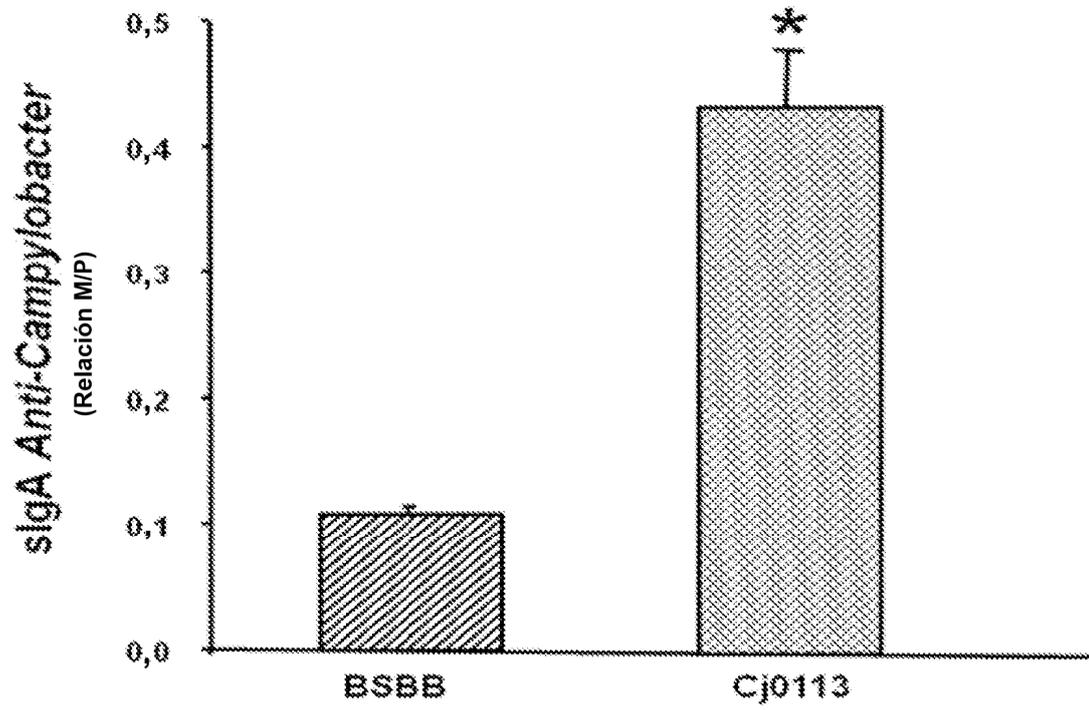


Figura 8.

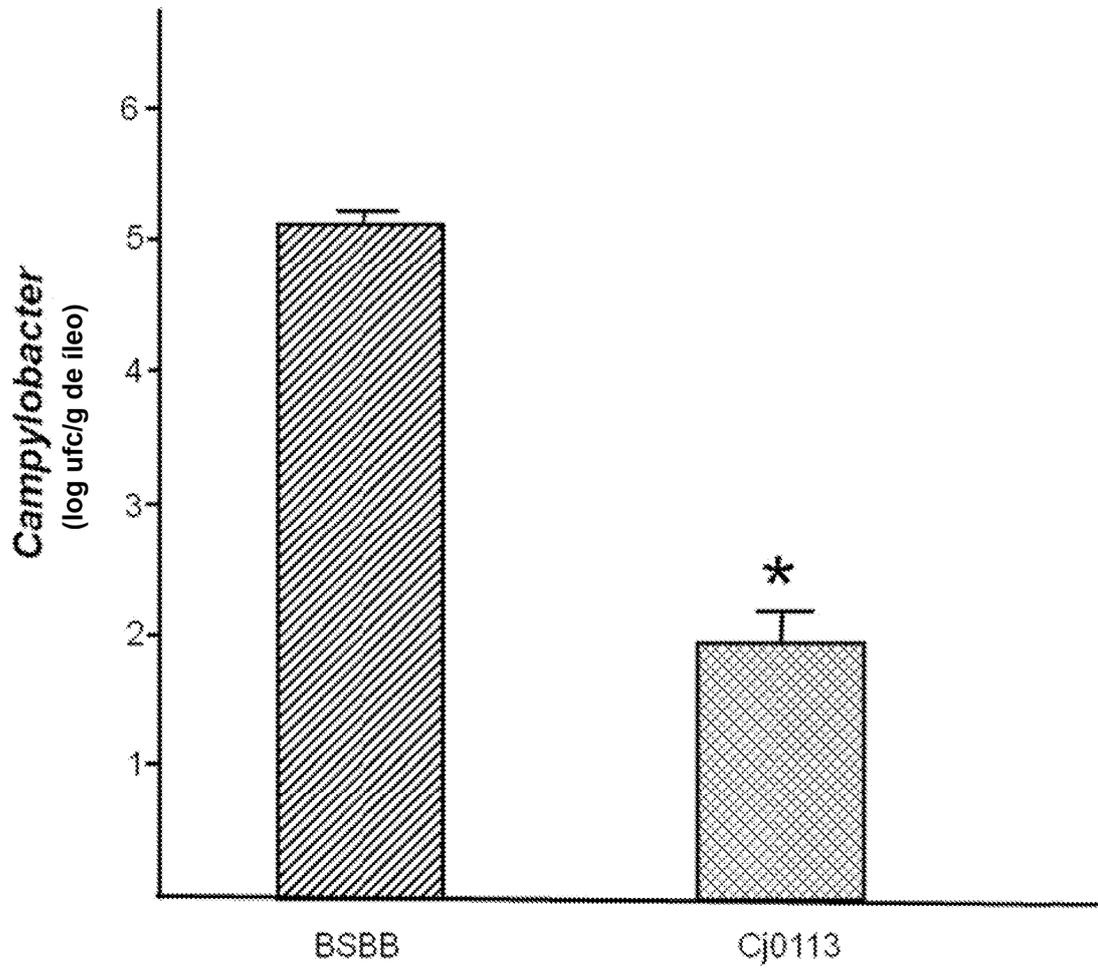


Figura 9.

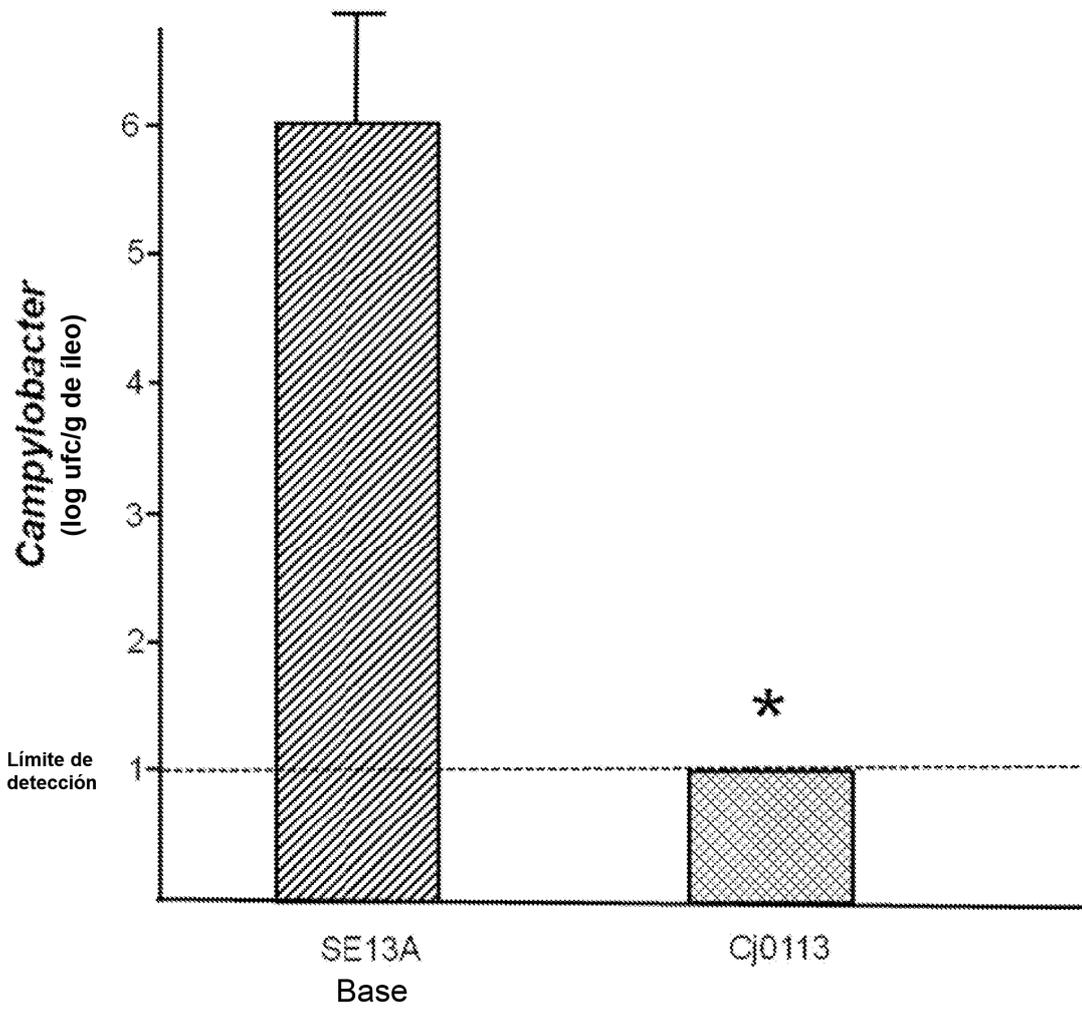


Figura 10.