



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-122137- -00000-0000

Fecha: 2012-07-19 16:11:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: VECTORES PARA VACUNAS Y MÉTODOS PARA POTENCIAR
RESPUESTAS INMUNES

SOLICITANTE: (1) The Board of Trustees of the University of Arkansas; (2)
The Texas A&M University System

DIRECCIÓN: (1) 2404 North University Avenue, Little Rock, Ar 72207 Estados
Unidos De América; (2) 3369 Tamu College Station, Tx 77843-3369 Estados
Unidos De América.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 19 de Julio de 2012

P2012/000084



PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000084

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: (1) The Board of Trustees of the
University of Arkansas; (2) The Texas A&M
University System

Dirección: (1) 2404 North University Avenue,
Little Rock, AR 72207 Estados Unidos de América;
(2) 3369 TAMU College Station, TX 77843-3369
Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: (1y2)Estadounidense

Lugar de Constitución: (1y2) Estados Unidos
de América

Teléfono: Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. NIT

C.E. Otro

Cual

Número

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. x NIT

C.E. Otro

Cual

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2011/022062 Fecha Enero 21, 2011

Publicación Internacional No. WO 2011/091255 Fecha Julio 28, 2011

6

Título (54) VECTORES PARA VACUNAS Y MÉTODOS PARA POTENCIAR RESPUESTAS
INMUNES

Clasificación Internacional (51) A61K 39/145.

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Enero 21, 2010

(31) Número de Solicitud

61/297,098

9

Comprobante de pago No. 12- Fecha Junio de 2012

10

ANEXOS

☒

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

☐

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

☐

Poderes, si fuere el caso.

☐

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

☐

Declaraciones. Bajo la regla 4.17. (ii) del PCT.

☒

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

☒

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

☐

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

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

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

☐

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

☐

Arte final 12 x 12.

☐

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

☐

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

☒

Otros. Búsqueda Internacional.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79. 782.747Bta T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2011/022062

Luc Berghmann
1207 Martinsville Lane
College Station, TX 77845
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Walter Bottje
3841 East Skillern Road
Fayetteville, AR 72703
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Billy Hargis
3229 Oakland Zion Rodad
Fayetteville, AR 72703
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Sherryl Layton
8111 Bainbridge Drive
Rogers, AR 72758
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

COPIA
No. 12 - 0073508
Bogotá D.C., Julio 19 de 2012 - 12:04:01

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455532593	18/07/2012	5.660.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-122137- -00000-0000

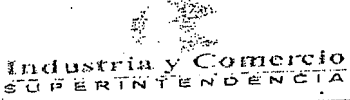
Fecha: 2012-07-19 16:11:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 19 de 2012 - 12:04:04

		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS																																																																																					
Dependencia:		Fecha:	Recorrido:																																																																																				
Tipo de Radicación:		Entrada:	Salida:																																																																																				
Radicador:		Traslado:	Convenio:																																																																																				
		Planilla:																																																																																					
<table border="1"> <thead> <tr> <th>ID</th> <th>No. Radicación</th> <th>Cons</th> <th>Item</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>12-119357-0</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>12-122137-0</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr><td>3</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>4</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>5</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>6</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>7</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>8</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>9</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>10</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>11</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>12</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>13</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>14</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>15</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>16</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>17</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>18</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>19</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>20</td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>				ID	No. Radicación	Cons	Item	1	12-119357-0			2	12-122137-0			3				4				5				6				7				8				9				10				11				12				13				14				15				16				17				18				19				20			
ID	No. Radicación	Cons	Item																																																																																				
1	12-119357-0																																																																																						
2	12-122137-0																																																																																						
3																																																																																							
4																																																																																							
5																																																																																							
6																																																																																							
7																																																																																							
8																																																																																							
9																																																																																							
10																																																																																							
11																																																																																							
12																																																																																							
13																																																																																							
14																																																																																							
15																																																																																							
16																																																																																							
17																																																																																							
18																																																																																							
19																																																																																							
20																																																																																							
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Item</th> <th>Unidad de Conservación</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>CD</td></tr> <tr><td>2</td><td>Disquetes</td></tr> <tr><td>3</td><td>DVD</td></tr> <tr><td>4</td><td>Fotos</td></tr> <tr><td>5</td><td>Libro</td></tr> <tr><td>6</td><td>Muestra Física</td></tr> <tr><td>7</td><td>Otros</td></tr> <tr><td>8</td><td>Planos</td></tr> <tr><td>9</td><td>Periódico</td></tr> <tr><td>10</td><td>Publicación Periódica</td></tr> <tr><td>11</td><td>Sobre blanco tamaño carta</td></tr> <tr><td>12</td><td>Sobre blanco tamaño oficio</td></tr> <tr><td>13</td><td>Sobre de manila</td></tr> </tbody> </table>				Item	Unidad de Conservación	1	CD	2	Disquetes	3	DVD	4	Fotos	5	Libro	6	Muestra Física	7	Otros	8	Planos	9	Periódico	10	Publicación Periódica	11	Sobre blanco tamaño carta	12	Sobre blanco tamaño oficio	13	Sobre de manila																																																								
Item	Unidad de Conservación																																																																																						
1	CD																																																																																						
2	Disquetes																																																																																						
3	DVD																																																																																						
4	Fotos																																																																																						
5	Libro																																																																																						
6	Muestra Física																																																																																						
7	Otros																																																																																						
8	Planos																																																																																						
9	Periódico																																																																																						
10	Publicación Periódica																																																																																						
11	Sobre blanco tamaño carta																																																																																						
12	Sobre blanco tamaño oficio																																																																																						
13	Sobre de manila																																																																																						
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Observaciones</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Anexo CD</td> </tr> <tr> <td></td> </tr> <tr> <td></td> </tr> </tbody> </table>				Observaciones	Anexo CD																																																																																		
Observaciones																																																																																							
Anexo CD																																																																																							

(43) International Publication Date
28 July 2011 (28.07.2011)(10) International Publication Number
WO 2011/091255 A1(51) International Patent Classification:
A61K 39/145 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/US2011/022062(22) International Filing Date:
21 January 2011 (21.01.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/297,098 21 January 2010 (21.01.2010) US(71) Applicants (for all designated States except US): **THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS** [US/US]; 2404 North University Avenue, Little Rock, AR 72207 (US). **THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM** [US/US]; 3369 Tamu, College Station, TX 77843-3369 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BERGHMAN, Luc** [US/US]; 1207 Martinsville Lane, College Station, TX 77845 (US). **BOTTJE, Walter** [US/US]; 3841 East Skillern Road, Fayetteville, AR 72703 (US). **HARGIS, Billy** [US/US]; 3229 Oakland Zion Road, Fayetteville, AR 72703 (US). **LAYTON, Sherryll** [US/US]; 8111 Bainbridge Drive, Rogers, AR 72758 (US).(74) Agent: **VANHEYNINGEN, Tambryn, K.**; Andrus, Sceales, Starke & Sawall, LLP, 100 East Wisconsin Avenue, Suite 1100, Milwaukee, WI 53202 (US).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: VACCINE VECTORS AND METHODS OF ENHANCING IMMUNE RESPONSES

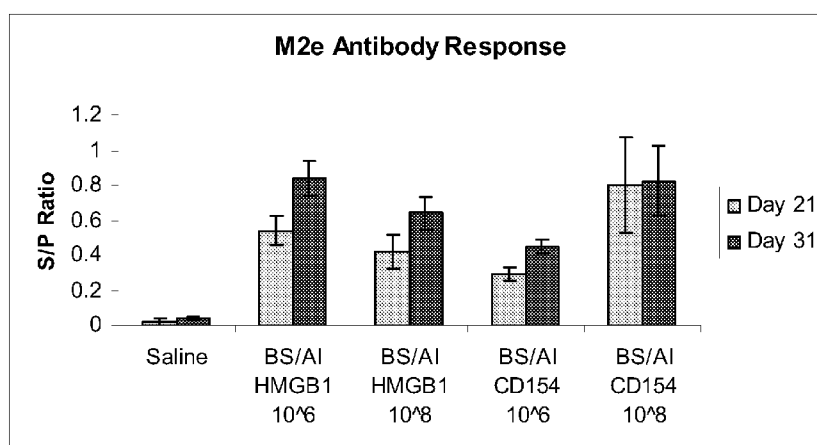


Fig. 1

(57) Abstract: Provided herein are vaccine vectors including an antigenic polypeptide and an HMGB 1 polypeptide present on the surface of the vaccine vector. Compositions comprising the vaccine vectors are also provided and include a pharmaceutically acceptable carrier, suitably a carrier for oral or nasal administration. Also provided are methods of enhancing immune responses, in particular antibody immune response and suitably an IgA response, by administering the vaccine vectors or compositions disclosed herein to a subject.

VACCINE VECTORS AND METHODS OF ENHANCING IMMUNE RESPONSES

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This patent application claims the benefit of priority of United States Provisional Patent Application No. 61/297,098, filed January 21, 2010, which is incorporated herein by reference in
5 its entirety.

INTRODUCTION

Vaccines are used to initiate an adaptive immune response against antigens, in particular antigens from pathogens, tumor cells or the like, in order to ameliorate or prevent disease. Synthetic peptides or killed or attenuated microorganism vaccines are often effective at
10 stimulating a robust immune response that is fully protective. In some cases these vaccines are not protective or only partially protective and other strategies must be used to develop protective vaccines. Attenuated microorganism based vaccines also are associated with risks of gene transfer or mutation repair and may pose risks to immunocompromised individuals. Development of new vaccines that are safe and effective at stimulating lasting protective
15 immune responses is needed.

Influenza virus infection, particularly avian influenza H5N1, presents a mounting health and economic concern. Evidence clearly indicates that H5N1 is continuing to circulate between susceptible birds and swine in widening regions of the world. Many scientists believe that if left unchecked, the current H5N1 avian influenza will mutate to allow for human to human
20 transmission and cause a world-wide pandemic. With a mortality rate of over 50%, such an outbreak would be devastating. Regardless of the ability of the virus to cause human disease,

avian influenza H5N1 is already threatening to have a huge economic impact due to the eradication of poultry flocks in affected areas. Therefore, development of a vaccine to protect humans, poultry, swine and other domesticated animals from H5N1 influenza is needed. An influenza vaccine that is capable of protecting against H5N1 as well as other influenza viruses, such as H1N1, would be optimal.

SUMMARY

Vaccine vectors and methods of stimulating an immune response and methods of reducing morbidity associated with Influenza infection are provided herein. In one aspect, a vaccine vector including an antigenic polypeptide and an HMGB1 polypeptide or a functional fragment thereof is provided. At least a portion of the antigenic polypeptide and the HMGB1 polypeptide are present on the surface of the vaccine vector. The vaccine vector may include a first polynucleotide encoding the antigenic polypeptide and a second polynucleotide encoding the HMGB1 polypeptide. The HMGB1 polypeptide and the antigenic polypeptide may be linked, such as in a fusion protein. The HMGB1 polypeptide and the antigenic polypeptide may both be inserted within an external loop of a transmembrane protein.

In another aspect, a composition comprising the vaccine vector and a pharmaceutically acceptable carrier is provided. The pharmaceutically acceptable carrier may be acceptable for oral or nasal use. The vaccine vector may be incapable of replication.

In yet another aspect, a *Bacillus* spp. vaccine vector is provided. The vaccine vector includes a first polynucleotide sequence encoding an antigenic polypeptide expressed on the surface of the vaccine vector and a second polynucleotide sequence encoding an immunostimulatory polypeptide expressed on the surface of the vaccine vector. The antigenic

polypeptide may be an Influenza M2e polypeptide, an Influenza HA polypeptide, or an Influenza NP polypeptide or a combination thereof. The immunostimulatory polypeptide may be a CD154 polypeptide or a HMGB1 polypeptide or a combination thereof. The immunostimulatory polypeptide and the antigenic polypeptide may be linked, such as in a fusion protein and may be
5 inserted with an external loop of a transmembrane protein.

In still another aspect, methods of enhancing an immune response in a subject are provided. In the method, the vaccine vectors or compositions provided herein are administered to the subject in an amount effective to enhance the immune response of the subject to the antigenic polypeptide. Suitably, the vaccine vector is administered orally or intranasally.

10 In a further aspect, methods of enhancing the immune response in a subject by administering a *Bacillus* spp. vaccine vector as described herein are provided. The vaccine vector includes a first polynucleotide sequence encoding an antigenic polypeptide expressed on the surface of the vaccine vector and a second polynucleotide sequence encoding an immunostimulatory polypeptide expressed on the surface of the vaccine vector. The antigenic
15 polypeptide may be an Influenza M2e polypeptide, an Influenza HA polypeptide, an Influenza NP polypeptide or a combination thereof. The immunostimulatory polypeptide may be a CD154 polypeptide, a HMGB1 polypeptide or a combination thereof.

In a still further aspect, methods of reducing influenza related morbidity in a subject are provided. In the methods, administration of the vaccine vectors or compositions disclosed herein
20 reduces the morbidity associated with a subsequent influenza infection.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 is a graph showing the S/P (sample to positive control) ratios of the ELISA for M2e specific antibody production by chickens after oral gavage of the indicated dosage of *Bacillus subtilis* vaccine vector expressing the Influenza A epitopes and either HMGB1 or CD154 as compared to chickens vaccinated with saline.

Figure 2 is a graph showing the S/P ratios of the ELISA for HA LB specific antibody production by chickens after oral gavage of the indicated dosage of *Bacillus subtilis* vaccine vector expressing the Influenza A epitopes and either HMGB1 or CD154 as compared to chickens vaccinated with saline.

Figure 3 is a graph showing the S/P ratios of the ELISA for HA UA specific antibody production by chickens after oral gavage of the indicated dosage of *Bacillus subtilis* vaccine vector expressing the Influenza A epitopes and either HMGB1 or CD154 as compared to chickens vaccinated with saline.

Figure 4 is a graph showing the S/P ratios of the ELISA for M2e specific antibody production by chickens after oral gavage of the indicated dosage of live or variously inactivated *Bacillus subtilis* vaccine vectors expressing the Influenza A epitopes and either HMGB1 or CD154 as compared to chickens vaccinated with the *Bacillus* vector alone(BSBB).

Figure 5 is a graph showing the S/P ratios of the ELISA for HA LB specific antibody production by chickens after oral gavage of the indicated dosage of live or variously inactivated *Bacillus subtilis* vaccine vectors expressing the Influenza A epitopes and either HMGB1 or CD154 as compared to chickens vaccinated with the *Bacillus* vector alone(BSBB).

Figure 6 is a graph showing the S/P ratios of the ELISA for HA UA specific antibody production by chickens after oral gavage of the indicated dosage of live or variously inactivated

Bacillus subtilis vaccine vectors expressing the Influenza A epitopes and either HMGB1 or CD154 as compared to chickens vaccinated with the *Bacillus* vector alone (BSBB).

Figure 7 is a graph showing the S/P ratios of the ELISA for M2e specific IgG antibody production by chickens after oral gavage of either 10^6 live or the various indicated dosages of formalin inactivated *Bacillus subtilis* vaccine vectors expressing the Influenza A epitopes and HMGB1 as compared to chickens vaccinated with the *Bacillus* vector alone (BSBB).

Figure 8 is a graph showing the S/P ratios of the ELISA for M2e specific IgA antibody production by chickens vaccinated, either orally or subcutaneously, with 10^6 live, formalin inactivated or formalin inactivated and lyophilized *Bacillus subtilis* vaccine vectors expressing the Influenza A epitopes and HMGB1 as compared to chickens vaccinated with the *Bacillus* vector alone (BSBB).

Figure 9 is a graph showing the S/P ratios of the ELISA for M2e specific IgA antibody production by chickens vaccinated, either orally or subcutaneously, with 10^6 live, formalin inactivated or formalin inactivated and lyophilized *Bacillus subtilis* vaccine vectors expressing the Influenza A epitopes and HMGB1 as compared to chickens vaccinated with the *Bacillus* vector alone (BSBB).

DETAILED DESCRIPTION

Recombinant DNA technologies enable relatively easy manipulation of many bacterial and viral species. Some bacteria and viruses are either naturally or can be selected or engineered to be mildly pathogenic or non-pathogenic, but remain capable of generating a robust immune response. These bacteria and viruses make attractive vaccine vectors for eliciting an immune response to heterologous or foreign antigens. Bacterial or viral vaccine vectors may mimic the natural infection and produce robust and long lasting immunity. Vaccine vectors are often

relatively inexpensive to produce and administer. In addition, such vectors can often carry more than one antigen and may provide protection against multiple infectious agents.

Live bacterial or viral vaccine vectors may still pose risks to immunocompromised individuals and require additional regulatory scrutiny. Thus use of vectors that are killed or inactivated or qualify as Generally Regarded As Safe (GRAS) organisms by the Food and Drug Administration (FDA) is desirable. The problem is generating a robust immune response using such vectors. As shown in the Examples, by including HMGB1 (high mobility group box 1) polypeptides on the surface of the vaccine vector we can generate a robust immune response against antigenic polypeptides using a *Bacillus* spp. vector. In fact, the Examples demonstrate that this vector can be inactivated such that it cannot replicate using a variety of methods and still elicit a robust immune response after administration.

Vaccine vectors including an antigenic polypeptide and an HMGB1 polypeptide or a functional fragment thereof are provided herein. At least a portion of the antigenic polypeptide and at least a portion of the HMGB1 polypeptide or functional fragment thereof are present on the surface of the vaccine vector. The vaccine vector may include a first polynucleotide encoding the antigenic polypeptide and a second polynucleotide encoding the HMGB1 polypeptide. The HMGB1 polypeptide and the antigenic polypeptide may be linked, such as in a fusion protein or may be expressed separately. The HMGB1 polypeptide and the antigenic polypeptide may both be inserted within an external loop of a transmembrane protein.

The vaccine vectors may be bacterial, viral or liposome-based vectors. Potential vaccine vectors include, but are not limited to, *Bacillus* (*Bacillus subtilis*), *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*), *Shigella*, *Escherichia* (*E. coli*), *Yersinia*, *Bordetella*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* (*Vibrio cholerae*), *Listeria*, adenovirus, poxvirus, herpesvirus, alphavirus, and adeno-

associated virus. Suitably, the vaccine vector is a GRAS organism. The vaccine vector may be inactivated or killed such that it is not capable of replicating. Methods of inactivating or killing bacterial or viral vaccine vectors are known to those of skill in the art and include, but are not limited to methods such as those shown in the Examples, namely formalin inactivation, antibiotic- based inactivation, heat treatment and ethanol treatment.

An antigenic polypeptide is a polypeptide that is capable of being specifically recognized by the adaptive immune system. An antigenic polypeptide includes any polypeptide that is immunogenic. The antigenic polypeptides include, but are not limited to, antigens that are pathogen-related, allergen-related, tumor-related or disease-related. Pathogens include viral, parasitic, fungal and bacterial pathogens as well as protein pathogens such as the prions. The antigenic polypeptides may be full-length proteins or portions thereof. It is well established that immune system recognition of many proteins is based on a relatively small number of amino acids, often referred to as the epitope. Epitopes may be only 8-10 amino acids. Thus, the antigenic polypeptides described herein may be full-length proteins, 8 amino acid long epitopes or any portion between these extremes. In fact the antigenic polypeptide may include more than one epitope from a single pathogen or protein.

Multiple copies of the same epitope or multiple epitopes from different proteins may be included in the vaccine vector. It is envisioned that several epitopes or antigens from the same or different pathogens or diseases may be administered in combination in a single vaccine vector to generate an enhanced immune response against multiple antigens. Recombinant vaccine vectors may encode antigens from multiple pathogenic microorganisms, viruses or tumor associated antigens. Administration of vaccine vectors capable of expressing multiple antigens has the advantage of inducing immunity against two or more diseases at the same time.

The antigenic polypeptide may be an Influenza polypeptide, suitably it is an Influenza H5N1 polypeptide or a polypeptide associated with multiple strains of the Influenza virus such as a polypeptide of the Influenza M2 protein. The ectodomain of the Influenza A virus M2 protein, known as M2e, protrudes from the surface of the virus. The M2e portion of the M2 protein
5 contains about 24 amino acids. The M2e polypeptide varies little from one isolate to the next within Influenza. In fact, only a few naturally occurring mutations in M2e have been isolated from infected humans since the 1918 flu epidemic. In addition, influenza viruses isolated from avian and swine hosts have different, yet still conserved, M2e sequences. For reviews of the M2e polypeptide sequences isolated from human, avian and swine hosts see Liu et al., *Microbes and Infection* 7:171-177 (2005) and Reid et al., *J. Virol.* 76:10717-10723 (2002) each of which
10 are incorporated herein by reference in its entirety. See also SEQ ID NO: 1-4.

Suitably the entire M2e polypeptide may be inserted into the vaccine vector or only a portion may be used. In the Examples, an eight amino acid polypeptide (LM2 having amino acid sequence: EVETPIRN, SEQ ID NO:5 or its variant M2eA having amino acid sequence
15 EVETPTRN, SEQ ID NO:6) was incorporated into the vaccine vector and demonstrated to produce an antibody response after administration to chickens. Suitably, the portion of the M2e polypeptide inserted into the vaccine vector is immunogenic. An immunogenic fragment is a peptide or polypeptide capable of eliciting a cellular or humoral immune response. Suitably, an immunogenic fragment of M2e may be the full-length M2e polypeptide, or suitably may be 20 or
20 more amino acids, 15 or more amino acids, 10 or more amino acids or 8 or more amino acids of the full-length sequence.

Other suitable epitopes for inclusion in an Influenza A vaccine vector include, but are not limited to, polypeptides of the hemagglutinin (HA) or the nuclear protein (NP) of Influenza A.

For example, the peptides of SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, or SEQ ID NO:10 may be included in a vaccine vector. In the Examples, SEQ ID NO: 7 (HAUA) and SEQ ID NO: 8 (HALB) were incorporated into the vaccine vector and demonstrated to produce an antibody response after administration to chickens. See Figures 2-3 and 5-6. In addition, the NP epitopes of SEQ ID NO: 9 (NP54) and SEQ ID NO: 10 (NP147) were incorporated into the vaccine vector in the examples. One of skill in the art will appreciate that any of these sequences may be used in combination with any other epitope including epitopes derived from other pathogens or antigens.

The HMGB1 (High Mobility Group Box-1) protein was first identified as a DNA-binding protein critical for DNA structure and stability. It is a ubiquitously expressed nuclear protein that binds DNA with no sequence specificity. The protein is highly conserved and found in plants to mammals. The zebrafish, chicken and human HMGB1 amino acid sequences are provided in SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 18 and SEQ ID NO: 29, respectively. The sequence throughout mammals is highly conserved with 98% amino acid identity and the amino acid changes are conservative. Thus an HMGB1 protein from one species can likely substitute for that from another species functionally. The full-length HMGB1 protein or a portion thereof may be used as the HMGB1 polypeptide in the vaccine vectors described herein. HMGB1 has two DNA binding regions termed A box as shown in SEQ ID NO: 23 and 24 and B box as shown in SEQ ID NO: 25 and 26. See Andersson and Tracey, *Annu. Rev. Immunol.* 2011, 29:139-162, which is incorporated herein by reference in its entirety.

HMGB1 is a mediator of inflammation and serves as a signal of nuclear damage, such as from necrotic cells. HMGB1 can also be actively secreted by cells of the monocyte/macrophage lineage in a process requiring acetylation of the protein, translocation across the nucleus and

secretion. Extracellular HMGB1 acts as a potent mediator of inflammation by signaling via the Receptor for Advanced Glycated End-products (RAGE) and via members of the Toll-like Receptor family (TLR), in particular TLR4. The RAGE binding activity has been identified and requires the polypeptide of SEQ ID NO: 27. TLR4 binding requires the cysteine at position 106
5 of SEQ ID NO: 18, which is found in the B box region of HMGB1.

The inflammatory activities of HMGB1 do not require the full-length protein and functional fragments have been identified. The B box has been shown to be sufficient to mediate the pro-inflammatory effects of HMGB1 and thus SEQ ID NO: 25 and 26 are HMGB1 polypeptides or functional fragments thereof within the context of the present invention. In
10 addition, the RAGE binding site and the pro-inflammatory cytokine activity have been mapped to SEQ ID NO: 27 and SEQ ID NO: 28, respectively. Thus, these polypeptides are functional fragments of HMGB1 polypeptides in the context of the present invention.

Those of skill in the art are capable of identifying HMGB1 polypeptides and fragments thereof capable of stimulating pro-inflammatory cytokine activity, using methods such as those
15 in International Publication No. WO02 092004, which is incorporated herein by reference in its entirety. Suitably, the HMGB1 polypeptide includes the RAGE binding domain at amino acids 150-183 of SEQ ID NO:18 (SEQ ID NO: 27 or a homolog thereof) and the pro-inflammatory cytokine activity domain between amino acids 89-109 of SEQ ID NO: 18 (SEQ ID NO: 28 or a homolog thereof). In particular, HMGB1 polypeptides and functional fragments or homologs
20 thereof include polypeptides identical to, or at least 99% identical, at least 98% identical, at least 95% identical, at least 90% identical, at least 85% identical, or at least 80% identical to the HMGB1 polypeptides of SEQ ID NOs: 18 or 23-30.

At least a portion of the antigenic polypeptide and at least a portion of the HMGB1 polypeptide are present on the surface of the vaccine vector. Present on the surface of the vaccine vector includes polypeptides that are comprised within a transmembrane protein, interacting with, covalently or chemically cross-linked to a transmembrane protein, a membrane lipid or membrane anchored carbohydrate. A polypeptide can be comprised within a transmembrane protein by having the amino acids comprising the polypeptide linked via a peptide bond to the N-terminus, C-terminus or anywhere within the transmembrane protein (i.e. inserted between two amino acids of the transmembrane protein or in place of one or more amino acids of the transmembrane protein (i.e. deletion-insertion). Suitably, the polypeptides may be inserted into an external loop of a transmembrane protein. Suitable transmembrane proteins are *cotB* and *lamB*, but those of skill in the art will appreciate many suitable transmembrane proteins are available.

Alternatively, the polypeptides may be covalently or chemically linked to proteins, lipids or carbohydrates in the membrane, or capsid if a viral vector is being used through methods available to persons of skill in the art. For example, di-sulfide bonds or biotin – avidin cross-linking could be used to present the antigenic and HMGB1 polypeptides on the surface of a vaccine vector. Suitably, the antigenic polypeptide and the HMGB1 polypeptide are part of a fusion protein. The two polypeptides may be directly linked via a peptide bond or may be separated by a linker or a section of a third protein into which they are inserted.

Polynucleotides encoding the antigenic polypeptide or HMGB1 polypeptide may be inserted into the vaccine vector and expressed to generate the antigenic polypeptide and the HMGB1 polypeptide. The polynucleotides may be inserted into the chromosome of the vaccine vector or encoded on plasmids or other extrachromosomal DNA. Suitably, polynucleotides

encoding the antigenic polypeptide and/or the HMGB1 polypeptide may be expressed independently or are inserted into a vaccine vector polynucleotide that is expressed. Suitably, the vaccine vector polynucleotide encodes a polypeptide expressed on the surface of the vaccine vector such as a transmembrane protein. The polynucleotide encoding the antigenic polypeptide and/or the HMGB1 polypeptide may be inserted into the vaccine vector polynucleotide sequence to allow expression of the antigenic polypeptide and/or the HMGB1 polypeptide on the surface of the vector. For example, the polynucleotide encoding the antigenic polypeptide and the HMGB1 polypeptide may be inserted in frame into a bacterial polynucleotide in a region encoding an external loop region of a transmembrane protein such that the bacterial polynucleotide sequence remains in frame. See Example 1.

Alternatively, the polynucleotide encoding the antigenic polypeptide and/or the HMGB1 polypeptide may be inserted into a secreted polypeptide which is displayed or presented on the surface of the vaccine vector through association with a protein, lipid or carbohydrate on the surface of the vaccine vector. Those of skill in the art will appreciate that the polynucleotide encoding the antigenic polypeptide and/or the HMGB1 polypeptide could be inserted in a wide variety of vaccine vector polynucleotides to provide expression and presentation of the antigenic polypeptide and/or the HMGB1 polypeptide to the immune cells of a subject treated with the vaccine vector. In the Examples, several Influenza epitopes including an M2e epitope, a HA epitope and a NP epitope were expressed from a plasmid for vegetative expression in *Bacillus subtilis*. The resulting recombinant bacteria express the inserted epitopes as demonstrated by the immune response shown in Figures 1-6.

In the Examples, the vaccine vectors have the antigenic polypeptides (M2e, HA and NP polypeptides) and the immunostimulatory polypeptide (either CD154 or HMGB1) encoded on

the same polynucleotide and in frame with each other. In alternative embodiments, the immunostimulatory polypeptide and the antigenic polypeptide may be encoded by distinct polynucleotides. Those of skill in the art will appreciate that a variety of methods may be used to obtain expression of the antigenic polypeptide and the HMGB1 polypeptide on the surface of
5 the vaccine vector. Such methods are known to those skilled in the art.

Compositions comprising the vaccine vector and a pharmaceutically acceptable carrier are also provided. A pharmaceutically acceptable carrier is any carrier suitable for *in vivo* administration. Suitably, the pharmaceutically acceptable carrier is acceptable for oral, nasal or mucosal delivery. The pharmaceutically acceptable carrier may include water, buffered
10 solutions, glucose solutions or bacterial culture fluids. Additional components of the compositions may suitably include excipients such as stabilizers, preservatives, diluents, emulsifiers and lubricants. Examples of pharmaceutically acceptable carriers or diluents include stabilizers such as carbohydrates (e.g., sorbitol, mannitol, starch, sucrose, glucose, dextran), proteins such as albumin or casein, protein-containing agents such as bovine serum or skimmed
15 milk and buffers (e.g., phosphate buffer). Especially when such stabilizers are added to the compositions, the composition is suitable for freeze-drying or spray-drying. The vaccine vector in the compositions may not be capable of replication, suitably the vaccine vector is inactivated or killed prior to addition to the composition.

The compositions described herein may be used to enhance an immune response such as
20 an antibody response to the antigenic polypeptide. The compositions containing Influenza polypeptides may also be used to decrease the morbidity associated with subsequent Influenza infection. The compositions may prevent Influenza from causing disease or any associated morbidity in a subject to which the compositions or vaccine vectors described herein were

administered. The compositions and vaccine vectors described herein may reduce the severity of subsequent disease by decreasing the length of disease, decreasing the morbidity or mortality associated with the disease or reducing the likelihood of contracting the disease. The morbidity or mortality associated with the disease after administration of the vaccine vectors described
5 herein may be reduced by 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% or even 100% as compared to similar subjects not provided the vaccine vector.

Methods of enhancing immune responses in a subject by administering a vaccine vector are also provided. The vaccine vector may contain a HMGB1 polypeptide capable of stimulating the immune response to the vaccine vector and its associated antigenic polypeptide. The vaccine
10 vector comprising a polypeptide of HMGB1 is administered to a subject in an amount effective to enhance the immune response of the subject to the vaccine and in particular to the antigenic polypeptide. Suitably, the vaccine vector contains a polynucleotide encoding a polypeptide including amino acids 150-183 and 89-109 of the HMGB1 polypeptide (SEQ ID NO: 18) or a homolog thereof. In the Examples, a 190 amino acid polypeptide of HMGB1 was used.
15 Suitably, the polynucleotide encodes a HMGB1 polypeptide from the same species as the subject. Heterologous combinations of HMGB1 polypeptides and subjects (i.e. a human HMGB1 polypeptide for use in a chicken vaccine) may be useful in the methods of the invention because HMGB1 is highly conserved through a wide number of species. The HMGB1 polypeptide may be used to enhance the immune response in the subject to any foreign antigen or
20 antigenic polypeptide present in or on the vaccine vector. One of skill in the art will appreciate that the HMGB1 polypeptide could be used to enhance the immune response to more than one antigenic polypeptide present in a vaccine vector. The polypeptide from HMGB1 stimulates an immune response at least in part by activating dendritic cells and macrophages and thus

stimulating production of cytokines such as IL-1, IL-6, IFN- γ and TNF- α . In the Examples, a polypeptide of HMGB1 was expressed on the surface of the vaccine vector.

In addition, methods of enhancing an immune response against influenza A and methods of reducing morbidity associated with subsequent Influenza A infection are disclosed. Briefly, the methods comprise administering to a subject a vaccine vector comprising an Influenza A epitope (an antigenic polypeptide of Influenza) capable of eliciting an immune response in an amount effective to elicit the immune response. The Influenza A epitope may be a M2e polypeptide, an HA polypeptide or a NP polypeptide or another influenza polypeptide as discussed above. The insertion of the antigenic polypeptides into the vaccine vector may be accomplished in a variety of ways known to those of skill in the art, including but not limited to the scarless site-directed mutation system described in International Patent Publication No. WO 2008/036675. The bacterium may also be engineered to express Influenza polypeptides in conjunction with polynucleotides capable of enhancing the immune response as discussed above. In particular, a polypeptide of CD154 or HMGB1 may be expressed by the vaccine vector to enhance the immune response of the subject to the influenza polypeptides. The Examples demonstrate production of a robust IgA and IgG response to vaccination in chickens. We expect that such a robust response will be protective against or at least reduce the morbidity associated with subsequent infection or challenge with the source of the antigenic polypeptide (Influenza virus in the Examples).

The compositions may be administered by a variety of means including, but not limited to, orally, intranasally, and mucosally. For example, the compositions or vaccine vectors may be delivered by aerosol, by spraying, by addition to food or water, by oral gavage, or via eye drops. In some embodiments, the compositions are administered by injection such as intradermally,

parenterally, subcutaneously, intraperitoneally, intravenously, intracranially, or intramuscularly. For chickens or other poultry, the compositions may be administered *in ovo*.

Subjects include, but are not limited to, a vertebrate, suitably a mammal, suitably a human, cows, cats, dogs, pigs, or birds, suitably poultry such as chickens. Other animal models of infection may also be used. Enhancing an immune response includes, but is not limited to, inducing a therapeutic or prophylactic effect that is mediated by the immune system of the subject. Specifically, enhancing an immune response may include enhanced production of antibodies, such as demonstrated in Figures 1-3, enhanced class switching of antibody heavy chains such as production of IgA as shown in Figure 8, maturation of antigen presenting cells, stimulation of helper T cells, stimulation of cytolytic T cells or induction of T and B cell memory.

The useful dosage to be administered will vary depending on the age, weight and species of the subject, the mode and route of administration and the type of pathogen or disease against which an immune response is sought. The composition may be administered in any dose of vaccine vector sufficient to evoke an immune response. It is envisioned that doses ranging from 10^3 to 10^{10} vector copies (i.e. plaque forming or colony forming units), from 10^4 to 10^9 vector copies, or from 10^5 to 10^7 vector copies are suitable.

The composition may be administered only once or may be administered two or more times to increase the immune response. For example, the composition may be administered two or more times separated by one week, two weeks, or by three weeks, one month, two months, three months, six months or more. The bacteria may be viable prior to administration, but in some embodiments the bacteria may be killed or inactivated prior to administration. In some embodiments, the bacteria may be able to replicate in the subject, while in other embodiments

the bacteria may not be capable of replicating in the subject. As shown in the Examples, bacterial vaccine vectors may be inactivated prior to administration using formalin, ethanol, heat or antibiotics. One skilled in the art would appreciate other means of inactivating vaccine vectors could be used as well.

5 A *Bacillus* spp. vaccine vector is also provided herein. The *Bacillus* vaccine vector includes a first polynucleotide sequence encoding an antigenic polypeptide and a second polynucleotide sequence encoding an immunostimulatory polypeptide. The antigenic polypeptide and the immunostimulatory polypeptide are present on the surface of the *Bacillus* vaccine vector as described above. The antigenic polypeptide is an Influenza polypeptide as
10 described above and the immunostimulatory polypeptide is a HMGB1 polypeptide as described above or a CD154 polypeptide.

Polynucleotides encoding immunostimulatory polypeptides that are homologous to proteins of the subject and capable of stimulating the immune system to respond to the antigenic polypeptide may also be inserted into a vaccine vector. As described in more detail in the
15 Examples, a vaccine vector may include a CD154 polypeptide that is capable of binding CD40 in the subject and stimulating the subject to respond to the vaccine vector and its associated antigenic polypeptide, similar to HMGB1 described above. The *Bacillus* vaccine vector may include a HMGB1 polypeptide, a CD154 polypeptide or a combination thereof. As described above, polynucleotides encoding these polypeptides may be inserted into the chromosome of the
20 vaccine vector or maintained extrachromosomally. One of skill in the art will appreciate that these polypeptides can be inserted in a variety of polypeptides of the vaccine vector and expressed in different parts of the vaccine vector or may be secreted.

The polynucleotide encoding an immunostimulatory polypeptide capable of enhancing the immune response to an antigenic polypeptide may also encode the antigenic polypeptide. The polynucleotide encoding an immunostimulatory polypeptide may be linked to the polynucleotide encoding the antigenic polypeptide, such that in the vaccine vector the immunostimulatory polypeptide and the antigenic polypeptide are encoded by the same polynucleotide. In the Examples, a polynucleotide encoding a polypeptide of CD154, which is capable of binding to CD40, or HMGB1 also encodes an M2e epitope, an HA epitope and a NP epitope of Influenza A. See SEQ ID NOs: 19-22. In the Examples, the polynucleotide encoding the Influenza epitopes and the polynucleotide encoding the immunostimulatory polypeptide are both expressed from a plasmid for vegetative cell expression. In some embodiments, the polynucleotides are inserted in the *cotB* gene or another gene encoding a protein expressed on the surface of spores. Those of skill in the art will appreciate that bacterial polynucleotides encoding other transmembrane proteins may also be used.

As discussed above, a polynucleotide encoding an immunostimulatory polypeptide homologous to a protein of the subject that is capable of enhancing the immune response to the epitope may be included in the vaccine vector. In the Examples, a *Bacillus* vaccine vector including a polynucleotide encoding either a CD154 polypeptide capable of binding to CD40 or a polypeptide encoding HMGB1 were demonstrated to enhance the immune response to the M2e epitope and to two distinct HA epitopes as measured by increased antibody production in response to vaccination.

Suitably, the CD154 polypeptide is fewer than 50 amino acids long, more suitably fewer than 40, fewer than 30 or fewer than 20 amino acids in length. The polypeptide may be between 10 and 15 amino acids, between 10 and 20 amino acids or between 10 and 25 amino acids in

length. The CD154 sequence and CD40 binding region are not highly conserved among the various species. The CD154 sequences of chicken and human are provided in SEQ ID NO: 11 and SEQ ID NO: 12, respectively.

The CD40 binding regions of CD154 have been determined for a number of species, including human, chicken, duck, mouse and cattle and are shown in SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, respectively. Although there is variability in the sequences in the CD40 binding region between species, the Examples below indicate that the human CD154 polypeptide was able to enhance the immune response in chickens. Therefore, one may practice the invention using species specific CD154 polypeptides or a heterologous CD 154 polypeptide. In particular, CD154 polypeptides and functional fragments or homologs thereof include polypeptides identical to, or at least 99% identical, at least 98% identical, at least 95% identical, at least 90% identical, at least 85% identical, or at least 80% identical to the CD154 polypeptides of SEQ ID NOs: 11-17.

The *Bacillus* vaccine vector described herein may be used in the methods of enhancing an immune response and the methods of reducing Influenza morbidity in a subject as described above. The *Bacillus* vaccine vector may be used to make compositions for administration to subjects such as those described above as well.

Heterologous polynucleotides encoding antigenic polypeptides can be inserted in the bacterial genome at any non-essential site or alternatively may be carried on a plasmid using methods well known in the art. One suitable site for insertion of polynucleotides is within external portions of transmembrane proteins or coupled to sequences which target the heterologous polynucleotide for secretory pathways. Examples of a suitable transmembrane

protein for insertion of polynucleotides are the *cotB* gene of *Bacillus* and the *lamB* gene of *Salmonella*.

Heterologous polynucleotides include, but are not limited to, polynucleotides encoding antigens selected from pathogenic microorganisms or viruses other than the vaccine vector.

5 Such polynucleotides may be derived from pathogenic viruses such as influenza (e.g., M2e, hemagglutinin, or neuraminidase), herpesviruses (e.g., the genes encoding the structural proteins of herpesviruses), retroviruses (e.g., the gp160 envelope protein), adenoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses and the like. Heterologous polynucleotides can also be obtained from pathogenic bacteria, e.g., genes encoding bacterial proteins such as toxins, and outer
10 membrane proteins. Further, heterologous polynucleotides from parasites, such as *Eimeria* are attractive candidates for use in a vector vaccine.

Additional immunostimulatory polypeptides involved in triggering the immune system may also be included in the vaccine vectors described herein. The polynucleotides may encode immune system molecules known for their stimulatory effects, such as an interleukin, Tumor
15 Necrosis Factor or an interferon, or another polynucleotide involved in immune-regulation.

The following examples are meant only to be illustrative and are not meant as limitations on the scope of the invention or of the appended claims.

EXAMPLES

Example 1. Construction of HA/NP/M2e/cCD154 and HA/NP/M2e/HMGB1

20 *Bacillus* vectors.

Strains and Culture Conditions

All plasmids were first maintained in TOP10 *E. coli* cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) unless described otherwise. *Bacillus* spp. was used for introduction of mutations

(*Bacillus subtilis*, Poultry Health Laboratory strain designated as NP122). Bacteria carrying plasmid pDGIEF and pHT10 were grown at 37°C.

Luria-Bertani (LB) media was used for routine growth of cells, and SOC media (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for phenotypic expression after electroporation.

5 When appropriate, the following were added to the media:

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 1mM, ampicillin (Amp) at 100μg/ml, spectinomycin (SP) at 100μg/ml, and chloramphenicol (Cm) at 5μg/ml.

Plasmids

Plasmids pDGIEF (Bacillus Genetic Stock Center, Columbus, OH) and pHT10 used for
10 the present study were described previously (Zhang et al., Nuc. Acids Research 2006, 34 (9):1-8
and Nguyen et al., Curr. Micro. 2007, 55:89-93). Plasmid pDGIEF served as a template for
amplification of the *mazF* gene which was used as the counter-selectable marker during *Bacillus*
chromosomal manipulation. Plasmid pHT10 was used to code for and produce the heterologous
epitope sequences for Avian Influenza within *Bacillus* spp. This plasmid contains a CM
15 resistance gene, is induced by the addition of 1mM IPTG, and is maintained within *Bacillus* at
37°C.

Production of Heterologous Proteins for Vegetative Cell Expression:

Plasmid pHT10 purchased from MoBioTec/Boca Scientific, Boca Raton, FL (Nguyen et
al., 2007) was transformed at the multiple cloning site by addition of a *Bacillus subtilis* codon
20 optimized insertion sequence. DNA sequencing was done to confirm correct sequence insertion.
The newly modified plasmid was then transformed into *Bacillus*. Briefly, *Bacillus* cultures were
grown overnight at 37°C in HS media (Spizizen's medium supplemented with 0.5% glucose,
50μg/ml DL-tryptophan, 50μg/ml uracil, 0.02% casein hydrolysate, 0.1% yeast extract, 8μg/ml

arginine, 0.4µg/ml histidine, 1mM MgSO₄). The overnight culture (1 ml) was used to inoculate 20ml LS medium (Spizizen's medium supplemented with 0.5% glucose, 5µg/ml DL-tryptophane, 5µg/ml uracil, 0.01% casein hydrolysate, 0.1% yeast extract, 1mM MgSO₄, 2.5mM MgCl₂, 0.5mM CaCl₂) and incubated with shaking for 3-4 hours at 30 °C. To 1 ml of the
5 resulting LS culture 10µl of 0.1M EGTA was added and incubated at room temperature for 5 minutes. Then 1-2 µg plasmid DNA was added, shaken for 2 hours at 37°C, and plated on LB plates with selective antibiotics. These transformed *Bacillus* spp. now produce heterologous epitope sequences from AI when induced with 1mM IPTG.

PCR

10 All primers used for PCR are listed in Table 1. Typical PCR conditions consisted of approximately 0.1µg of purified genomic, plasmid or PCR-generated DNA (Qiagen, Valencia, CA, USA), 1x *Pfu* polymerase buffer, 5U *Pfu* polymerase (Stratagene La Jolla, CA, USA), 1mM dNTPs (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ), 1.2µM of each primer in a total volume of 50 µL. The DNA engine thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used
15 with the following amplification conditions: 94°C for 2 minutes; 30 cycles of 94°C sec for 30 sec, 58 °C for 60 sec, 72 °C for 90 sec per 1 kb; and 72 °C for 10 minutes for final extension. Each PCR product was gel purified (Qiagen, Valencia, CA, USA) and either eluted in 25µL EB buffer for preparation of templates used in overlapping extension PCR or in 50µL EB buffer, ethanol precipitated and suspended in 5µL of ddH₂O for electroporation into *Bacillus* spp.

Table 1: Primer sequences used to generate the vaccine vector

Primer	Amplified Region	Primer Sequence (SEQ ID NO:)
mazF for	<i>MazF</i> gene	5' <i>ctaaaatcttcagatgatcaatcatcctcactgcccgcgtttccagtcgggaaa</i> 3' (SEQ ID NO: 31)
mazF rev	<i>MazF</i> gene	5' <i>tgaacgtgacgaacgaccagatttccccctatgcaagggtttat</i> 3' (SEQ ID NO: 32)
CotB up for	<i>Cot B</i> up	5' <i>gaaatgctcgtgctgatga</i> 3' (SEQ ID NO: 33)
Cot B up rev	<i>Cot B</i> up	5' <i>ggatgattgatcatctgaagattttag</i> 3' (SEQ ID NO: 34)
Cot B dn for	<i>Cot B</i> down	5' <i>aaatctggctgctgcacgttca</i> 3' (SEQ ID NO: 35)
Cot B dn rev	<i>Cot B</i> down	5' <i>ttacgtttccagtgatagtctatcg</i> 3' (SEQ ID NO: 36)
BS/AI/HMGB1 for	BS/AI/HMGB1 CotB up	5' <i>aaccattcttcaattgaattgaatttgaatcagctgcctgatgatgacagttctcataatcattaaaatc gcccggatgacacagatcattgccggttgcgtgatgatgaatccatgcctgttctaaccagtgctctgttc ttgatgt ggatgattgatcatctgaagattttag</i> 3' (SEQ ID NO: 37)
BS/AI/HMGB1 rev	BS/AI/HMGB1 CotB down	5' <i>ttacaattgaagaatggtctgtcatcatcatcactgctgtcaagaattaatcattttgaaaaattcaatcat catcagaagtgaaacaccgattagaaattcatcatcatggatgacaacatcatatgcaccgacatcatcatca tcagaagttgaacaccgattagaaataaactggctggttcgtcacgttca</i> 3' (SEQ ID NO: 38)
BS/AI/CD154 for	BS/AI/CD154 CotB up	5' <i>ttcaaaatgattaattcttgacagcagtgatgatgatgacagaaccattcttcaattgtaattgaattttgaat cagctgcctgatgatgacagttctcataatcattaaaatcgcccggatgacacagatcattgccggttgc cggatgattgatcatctgaagattttag</i> 3' (SEQ ID NO: 39)
BS/AI/CD154 rev	BS/AI/CD154 CotB down	5' <i>caagaattaatcattttgaaaaaattcaatcatcatcagaagtgaaacaccgattagaaattcatcatcactgaaa gaaaaatatgaaaagatattgcagcatatagagcaaaaggcaaaagtgatgcaggcaaaaagtgtgtgcaaa agcagaaaaatcaaaaaaaatctggctggttcgtcacgttca</i> 3' (SEQ ID NO: 40)

In Table 1, italicized nucleotides are those which are complementary to either side of the *CotB* gene insertion site of *Bacillus subtilis*.

5 Electroporation

Briefly, cells were inoculated into 10 mL of LB broth and grown at 37 °C overnight. Then 100μL of overnight culture was re-inoculated into 10mL fresh LB broth at 37 °C for 3-4 hours. Cells were washed five times in ddH₂O water and resuspended in 60μL of 10% glycerol. Cells were then pulsed at 2.4-2.45kV for 1-6ms, incubated in 0.5ml SOC for 2-3 hours at 37°C and plated on LB media with appropriate antibiotics.

Chromosomal Integration of Heterologous DNA for Spore Coat Expression:

Recombinant *Bacillus* strains containing stable integrated copies of selected M2e, HA and NP epitopes were constructed using recently published methods with modification. Briefly,

Bacillus strains were transformed with the MazF cassette (Zhang et al., 2006) which generated a strain which was IPTG sensitive and spectomycin resistant. The MazF cassette flanked by approximately 300bp of homologous DNA on each side was introduced into the *CotB* gene (Isticato et al., 2001) of the *Bacillus* vector by electroporation followed by growth on media
5 containing spectomycin for positive clones which now contain the *MazF* cassette which is spectomycin resistant.

After the *MazF* mutation was confirmed in *CotB*, this region was replaced by a codon-optimized DNA sequence coding for the antigenic epitopes of AI again flanked by 300 bp of homologous DNA. This was done by creating a PCR product using overlapping and extension
10 PCR to produce the antigenic sequences flanked by approximately 300bp on each side homologous to the *Bacillus* chromosome (Cox et al., 2007). The PCR product was introduced into the *Bacillus* again by electroporation and replacement of the *MazF* cassette. Transformants were selected on plates containing IPTG, positive clones should now be unresponsive to IPTG and sensitive to spectomycin. Correct chromosomal sequence insertion was confirmed by DNA
15 sequencing.

Example 2. Vaccination Study 1 and 2.

Day-of-hatch (day 0) chicks were obtained from a local commercial hatchery and randomly distributed into treatment groups (n=15/treatment group, Exp 1 and n=20/treatment
20 group, Exp 2). All chicks in each treatment group were tagged and numbered. The chicks were orally infected by gavage with 0.25 ml of saline or 10^6 - 10^8 cfu/ml of the various *Bacillus* treatments as indicated in Table 2 for study 1 and in Table 3 for study 2.

Table 2. Challenge Dose for each treatment group in Vaccination Study 1.

Treatment Group	Challenge Dose
Saline only	
BS/AI/HMGB1	10^6 cfu/ml
BS/AI/HMGB1	10^8 cfu/ml
BS/AI/CD154	10^6 cfu/ml
BS/AI/CD154	10^8 cfu/ml

5

Table 3. Challenge Dose for each treatment group in Vaccination Study 2.

Treatment Group	Challenge Dose
BSBB (Bacillus)	10^6 cfu/ml
BS/AI/HMGB1	10^6 cfu/ml
BS/AI/CD154	10^6 cfu/ml
BS/AI/HMGB1 Heat Inactivated	10^6 cfu/ml
BS/AI/HMGB1 Formalin Inactivated	10^6 cfu/ml
BS/AI/HMGB1 Antibiotic Inactivated	10^6 cfu/ml
BS/AI/HMGB1 Ethanol Inactivated	10^6 cfu/ml

10 In study 2, the bacteria were inactivated in several different ways to assess whether replication was necessary for production of an antibody response directed to the antigenic influenza peptides. Several means of inactivation were used because the means of inactivation could result in destruction of the epitope and result in misinterpretation of the data and supporting a need for replication or viability of the Bacillus vector. The bacteria were

15 inactivated by incubation for 10 minutes in 0.022% formalin (formalin inactivated); incubation for 10 minutes at 70°C (heat inactivated); incubation in 5µg/ml gentamycin (antibiotic inactivated); or incubation for 10 minutes in 70% ethanol (ethanol inactivated).

Each treatment group was housed in an individual floor pen on fresh pine litter and provided water and feed *ad libitum*. On days 11 and 21 post-hatch, the birds were given a

20 booster vaccine of the same treatment they received on Day 0. Also on days 21 and 31/32, blood was collected from each of the tagged birds and the serum was removed.

The serum collected from the tagged birds in each treatment group was then used in an antibody capture ELISA to determine specific M2e, HAUA and HALB antibody response. In brief, individual wells of a 96-well plate were coated with 10 µg/ml of the M2e epitope, HAUA epitope or HALB epitope conjugated to BSA. Antigen adhesion was allowed to proceed overnight at 4°C. Plates were rinsed with PBS + 0.05% Tween 20, blocked with PBS Superblock (Pierce Chemical Co.) for a minimum of 2 hours and incubated for 2 hours with the serum previously collected from the birds in each of the treatment groups described above. The plates were rinsed with PBS + 0.05% Tween 20 followed by incubation with peroxidase conjugated Goat-anti-Chicken IgY secondary antibody (1:7,500 dilution) obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) for an additional hour. After subsequent rinsing, the plates were developed using a peroxidase substrate kit obtained from Fisher Scientific and absorbances read on a spectrophotometer at 450nm and 405nm.

Pooled serum samples from the groups receiving the vectored vaccine were used as positive controls and pooled serum samples from the unvaccinated groups were used as negative controls on each plate to replace the serum from the treatment groups. The absorbances obtained for the positive control, negative control and experimental samples were used to calculate Sample to Positive control ratios (S/P ratios) using the following calculation:

$$\text{S/P ratio calculation: } \frac{\text{sample mean} - \text{negative control mean}}{\text{positive control mean} - \text{negative control mean}}$$

The calculated S/P ratios for each study are shown in Figures 1-6. Figures 1-3 show the total antibody titers for M2e, HALB and HAUA for study 1, respectively, at days 21 and 31 post-hatch. The results demonstrate that robust immune responses to each of these antigens were generated after oral administration with a Bacillus expressing each of the epitopes with either CD154 or HMGB1 as the immunostimulatory peptide. Figures 4-6 show the total antibody titers

for M2e, HALB and HAUA for study 2, respectively, at days 21 and 32 post-hatch. The results demonstrate that robust immune responses to each of the epitopes were generated after oral administration of a live *Bacillus* expressing the epitope and an immunostimulatory peptide. Figures 4-6 also demonstrate that similar levels of specific antibodies were generated when the
5 vector (the *Bacillus*) was inactivated prior to administration.

Example 3. Vaccination Study 3

Day-of-hatch (day 0) chicks were obtained from a local commercial hatchery and randomly distributed into treatment groups (n=20/treatment group). All chicks in each treatment
10 group were tagged and numbered. The chicks were orally infected by gavage with 0.25 ml of saline or 10^5 - 10^8 cfu/ml of the *Bacillus* vector (BSBB), the *Bacillus* vector expressing the avian influenza epitopes and HMGB1 (BS/AI/HMGB1), or various amounts of the BS/AI/HMGB1 vector after formalin inactivation (as described above). On day 10 post-hatch, the birds were given a booster vaccine of the same treatment they received on Day 0. Also on days 21 and 32,
15 blood was collected from each of the tagged birds and the serum was removed. The serum IgG M2e specific antibody levels were determined using the method described above with a peroxidase labeled anti-chicken IgG specific secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). The results in Figure 7 show that the formalin inactivated bacteria were able to stimulate production of M2e specific IgG antibodies as well as live
20 bacteria. This result was surprising because it was generally believed that only live bacteria could stimulate a robust immune response after oral administration.

Example 4. Vaccination Study 4

Day-of-hatch (day 0) chicks were obtained from a local commercial hatchery and randomly distributed into treatment groups (n=20-35/treatment group). All chicks in each treatment group were tagged and numbered. The chicks were orally infected by gavage or
5 injected sub-cutaneously with 0.25 ml of 10^6 cfu/ml of the Bacillus vector (BSBB), the Bacillus vector expressing the avian influenza epitopes and HMGB1 (BSAI), or the BSAI vector after formalin inactivation (as described above) or after formalin inactivation followed by lyophilization (reconstituted with saline immediately prior to administration). On day 10 post-hatch, some of the birds were given a booster vaccine of the same treatment they received on
10 Day 0. On days 11, 14 and 21, blood was collected from each of the tagged birds and the serum was removed. The serum IgA and IgG M2e specific antibody levels were determined using the method described above with a peroxidase labeled anti-chicken IgA (GenTex) or a peroxidase labeled anti-chicken IgG specific secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). The results in Figure 8 show that the formalin inactivated bacteria were able
15 to stimulate production of M2e specific IgA antibodies about as well as live bacteria when given orally. In contrast when given sub-cutaneously the inactivated BSAI vector was not as efficient at stimulating an IgA antibody response and the lyophilized bacteria did not stimulate an IgA response. The results in Figure 9 show that each of the BSAI administration protocols supported robust IgG formation.

CLAIMS

We claim:

1. A vaccine vector comprising an antigenic polypeptide and an HMGB1 polypeptide or a functional fragment thereof, wherein at least a portion of the antigenic polypeptide and at least a
5 portion of the HMGB1 polypeptide are present on the surface of the vaccine vector.
2. The vaccine vector of claim 1, wherein the antigenic polypeptide is an Influenza specific polypeptide.
- 10 3. The vaccine vector of claim 2, wherein the antigenic polypeptide is an M2e, HA or NP Influenza polypeptide.
4. The vaccine vector of claim 3, wherein the Influenza M2e polypeptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, an immunogenic fragment of SEQ ID NO:1, an immunogenic fragment of
15 SEQ ID NO:2, an immunogenic fragment of SEQ ID NO:3 and an immunogenic fragment of SEQ ID NO:4.
5. The vaccine vector of claim 3, wherein the antigenic polypeptide is selected from the group consisting of SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 and an immunogenic fragment of SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, or SEQ ID NO: 10.
- 20 6. The vaccine vector of any of claims 1-5, wherein the HMGB1 polypeptide is selected from SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, a functional fragment of SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, or SEQ ID NO: 30 and a homolog thereof.
7. The vaccine vector of claim 6, wherein the functional fragment of HMGB1 is selected from SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 and SEQ ID NO: 28.
- 25 8. The vaccine vector of any of claims 1-7, wherein the vaccine vector is a bacterium.
9. The vaccine vector of claim 8, wherein the bacterium is *Bacillus* spp.

10. The vaccine vector of any of claims 1-9, wherein the antigenic polypeptide is comprised within a transmembrane protein.
11. The vaccine vector of claim 10, wherein the antigenic polypeptide is within an external loop of a transmembrane protein.
- 5 12. The vaccine vector of any of claims 1-11, wherein the HMGB1 polypeptide is comprised within a transmembrane protein.
13. The vaccine vector of claim 12, wherein the HMGB1 polypeptide is within an external loop of a transmembrane protein.
14. The vaccine vector of any of claims 10-13, wherein the transmembrane protein is *cotB*.
- 10 15. The vaccine vector of any of claims 1-14, wherein the antigenic polypeptide and the HMGB1 polypeptide are part of a fusion protein.
16. A composition comprising the vaccine vector of any of claims 1-15 and a pharmaceutically acceptable carrier.
17. The composition of claim 16, wherein the pharmaceutically acceptable carrier is
15 acceptable for oral or nasal administration.
18. The composition of claim 16 or 17, wherein the vaccine vector is not capable of replication.
19. The composition of any of claims 16-18, wherein the vaccine vector is inactivated or killed.
- 20 20. A method of enhancing an immune response in a subject comprising administering to the subject the vaccine vector of any of claims 1-15 or the composition of any of claims 16-19 in an amount effective to enhance the immune response of the subject to the antigenic polypeptide.
21. The method of claim 20, wherein the vaccine vector is administered orally or intranasally.

22. The method of claim 21, wherein the immune response is an IgA antibody response to the antigenic polypeptide.

23. The method of any of claims 20-22, wherein the vaccine vector is not capable of replication in the subject.

5 24. The method of any of claims 20-23, wherein the vaccine vector is inactivated or killed prior to administration to the subject.

25. A *Bacillus* spp. vaccine vector comprising a first polynucleotide sequence encoding an antigenic polypeptide present on the surface of the vaccine vector and a second polynucleotide sequence encoding an immunostimulatory polypeptide, wherein the antigenic polypeptide and
10 the immunostimulatory polypeptide are present on the surface of the vaccine vector, wherein the antigenic polypeptide is an Influenza polypeptide and wherein the immunostimulatory polypeptide is a CD154 polypeptide or a HMGB1 polypeptide.

26. The vaccine vector of claim 25, wherein the first polynucleotide and the second polynucleotide are inserted within a third polynucleotide sequence encoding an external portion
15 of a transmembrane protein.

27. The vaccine vector of claim 26, wherein the transmembrane protein is *cotB*.

28. The vaccine vector of any of claims 25-27, wherein the antigenic polypeptide is an Influenza M2e polypeptide, an Influenza HA polypeptide, or an Influenza NP polypeptide.

29. The vaccine vector of claim 28, wherein the Influenza M2e polypeptide is selected from
20 the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, an immunogenic fragment of SEQ ID NO:1, an immunogenic fragment of SEQ ID NO:2, an immunogenic fragment of SEQ ID NO:3 and an immunogenic fragment of SEQ ID NO:4.

30. The vaccine vector of claim 28, wherein the Influenza polypeptide comprises SEQ ID
25 NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 or SEQ ID NO: 10.

31. The vaccine vector of any of claims 25-30, wherein the HMGB1 polypeptide is selected from SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, a functional fragment of SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, or SEQ ID NO: 30 and a homolog thereof.

32. The vaccine vector of claim 31, wherein the functional fragment of HMGB1 is selected from SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 and SEQ ID NO: 28.

33. A method of enhancing an immune response in a subject comprising administering to the subject the *Bacillus* spp. vaccine vector of any of claims 25-32 in an amount effective to enhance the immune response of the subject.

34. The method of claim 33, wherein the vaccine vector is administered orally or intranasally.

35. The method of claim 34, wherein the immune response is an IgA antibody response to the antigenic polypeptide.

36. The method of any of claims 33-35, wherein the vaccine vector is not capable of replication in the subject.

37. The method of any of claims 33-36, wherein the vaccine vector is inactivated or killed prior to administration to the subject.

38. A method of reducing Influenza A-related morbidity in a subject comprising administering to the subject the vaccine vector of any of claims 1-15 or the composition of any of claims 16-19 in an amount effective to reduce Influenza A related morbidity.

39. A method of reducing Influenza A-related morbidity in a subject comprising administering to the subject a *Bacillus* spp. vaccine vector of any of claims 25-32 in an amount effective to reduce Influenza A related morbidity.

40. A method of enhancing an immune response in a subject comprising administering to the subject the vaccine vector of claim 1 in an amount effective to enhance the immune response of the subject to the antigenic polypeptide.

41. The method of claim 40, wherein the vaccine vector is administered orally or intranasally.

42. The method of claim 41, wherein the immune response is an IgA antibody response to the antigenic polypeptide.

5 43. The method of claim 42, wherein the vaccine vector is not capable of replication in the subject.

1 / 9

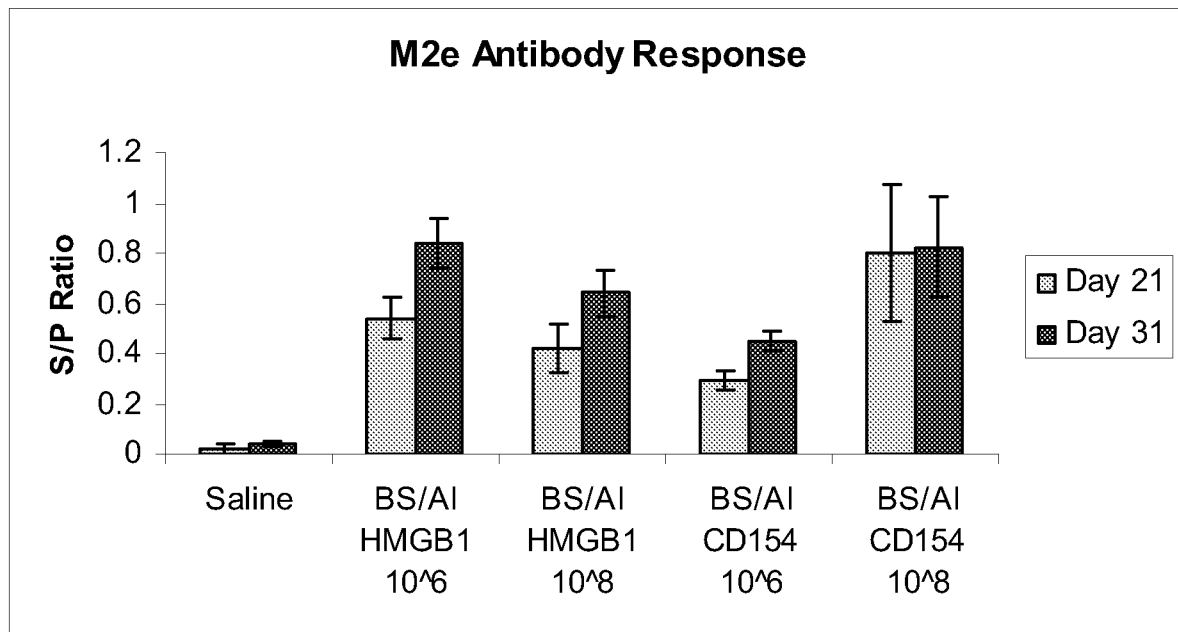


Fig. 1

2 / 9

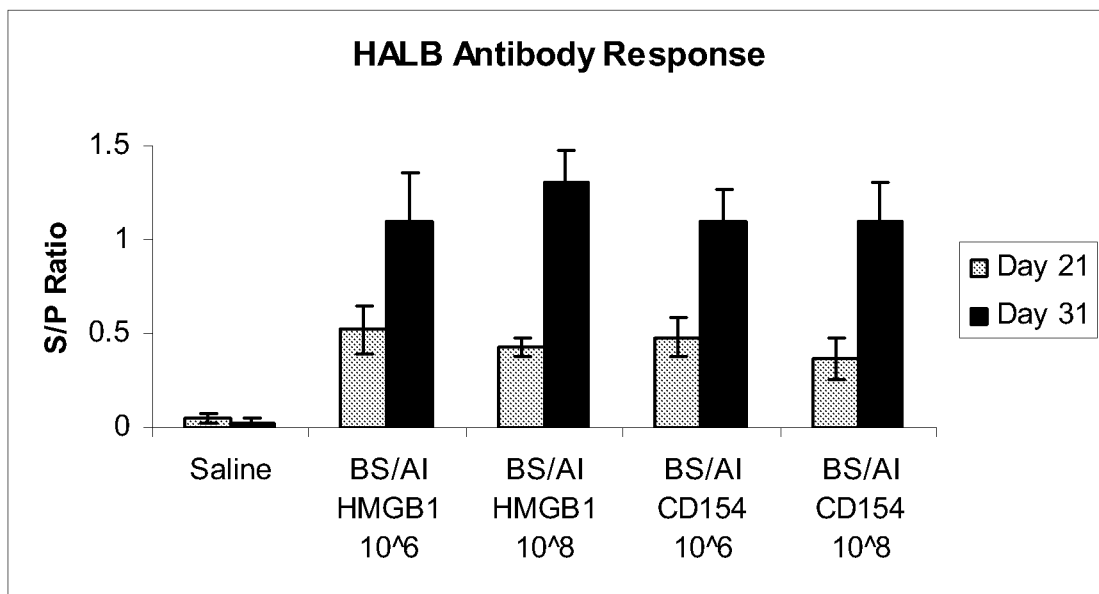


Fig. 2

3 / 9

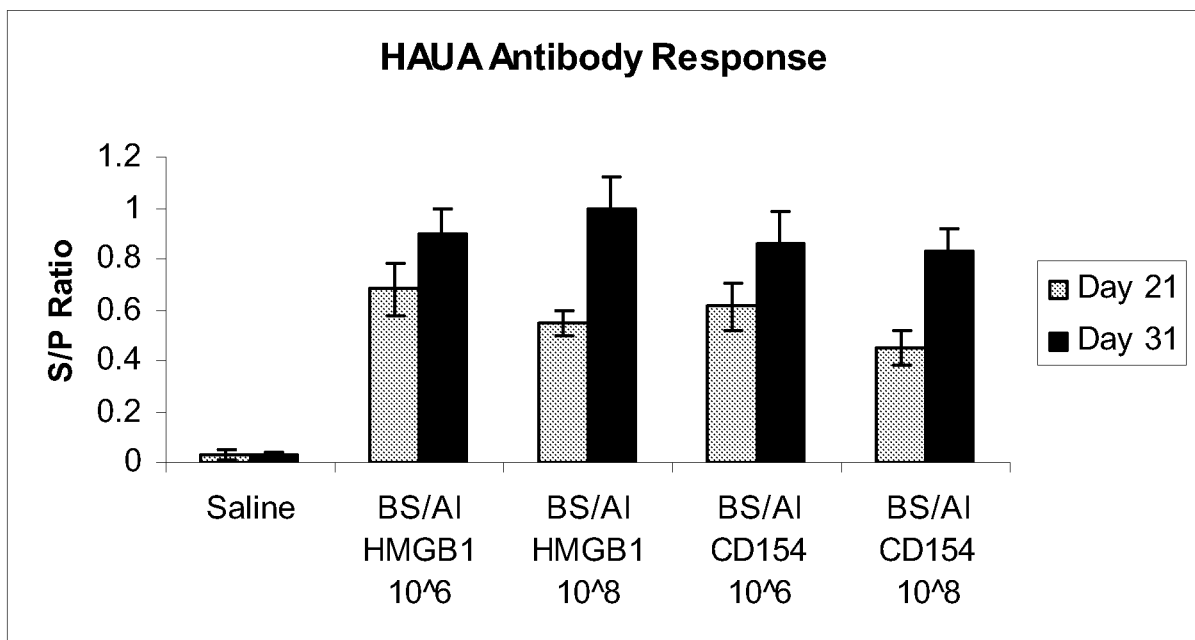


Fig.3

4 / 9

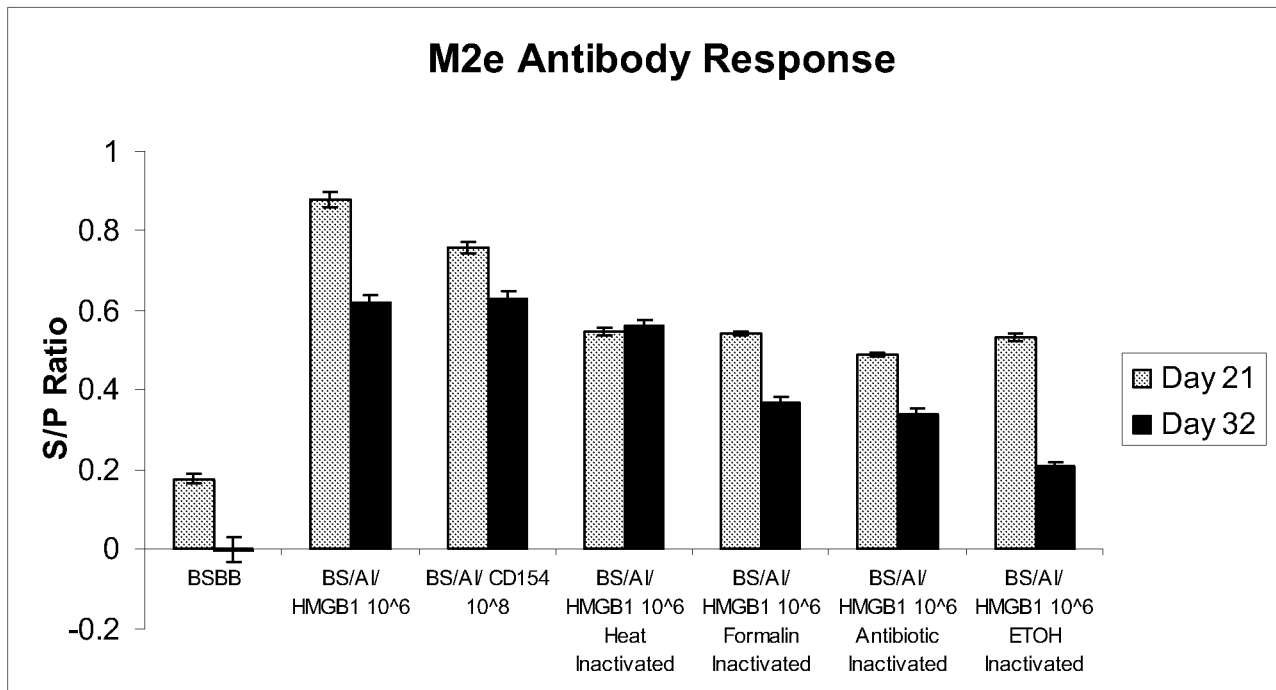


Fig.4

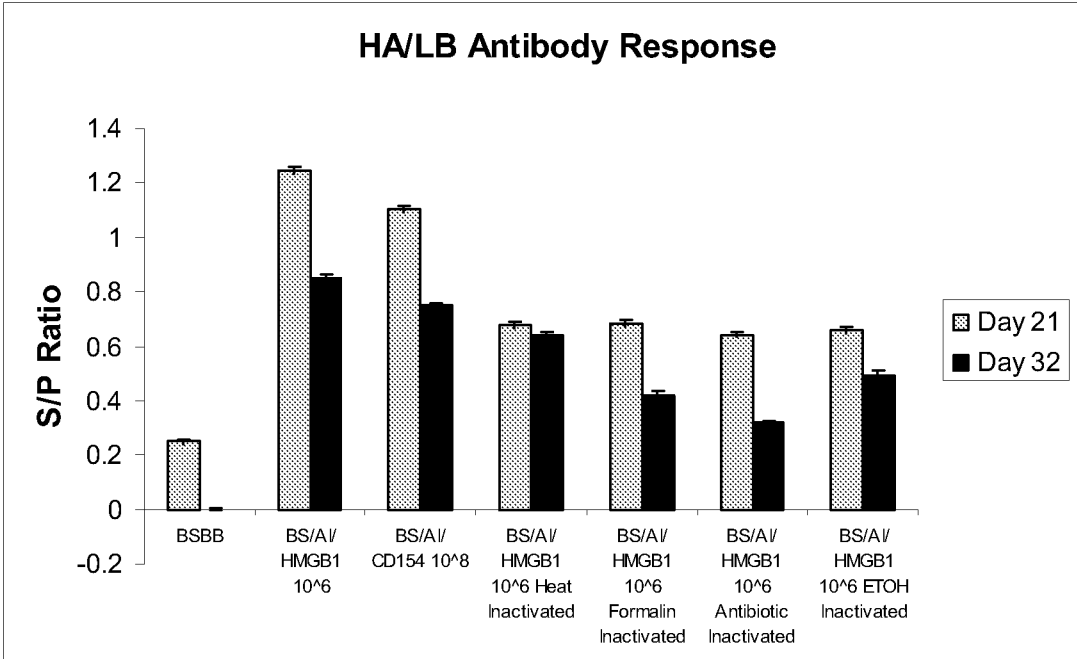


Fig.5

6/9

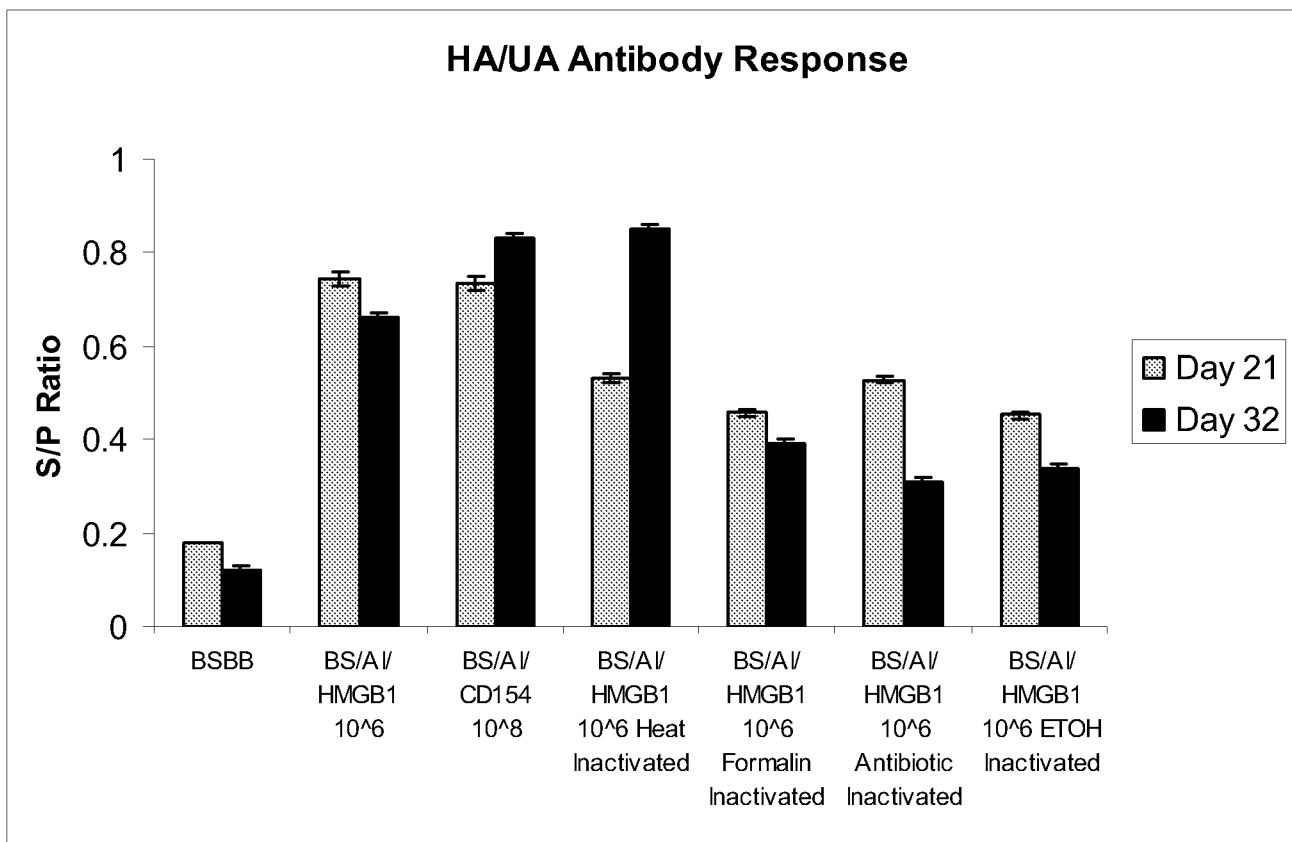


Fig.6

7/9

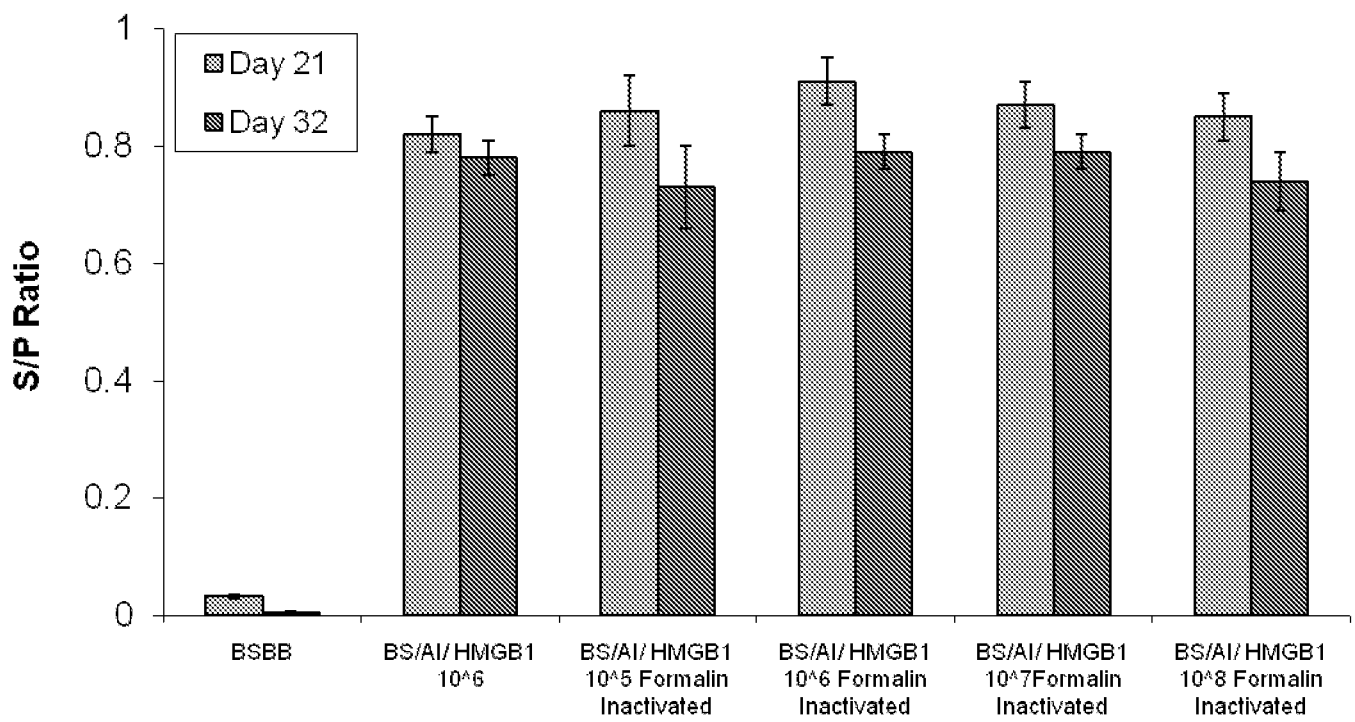


Fig. 7

8 / 9

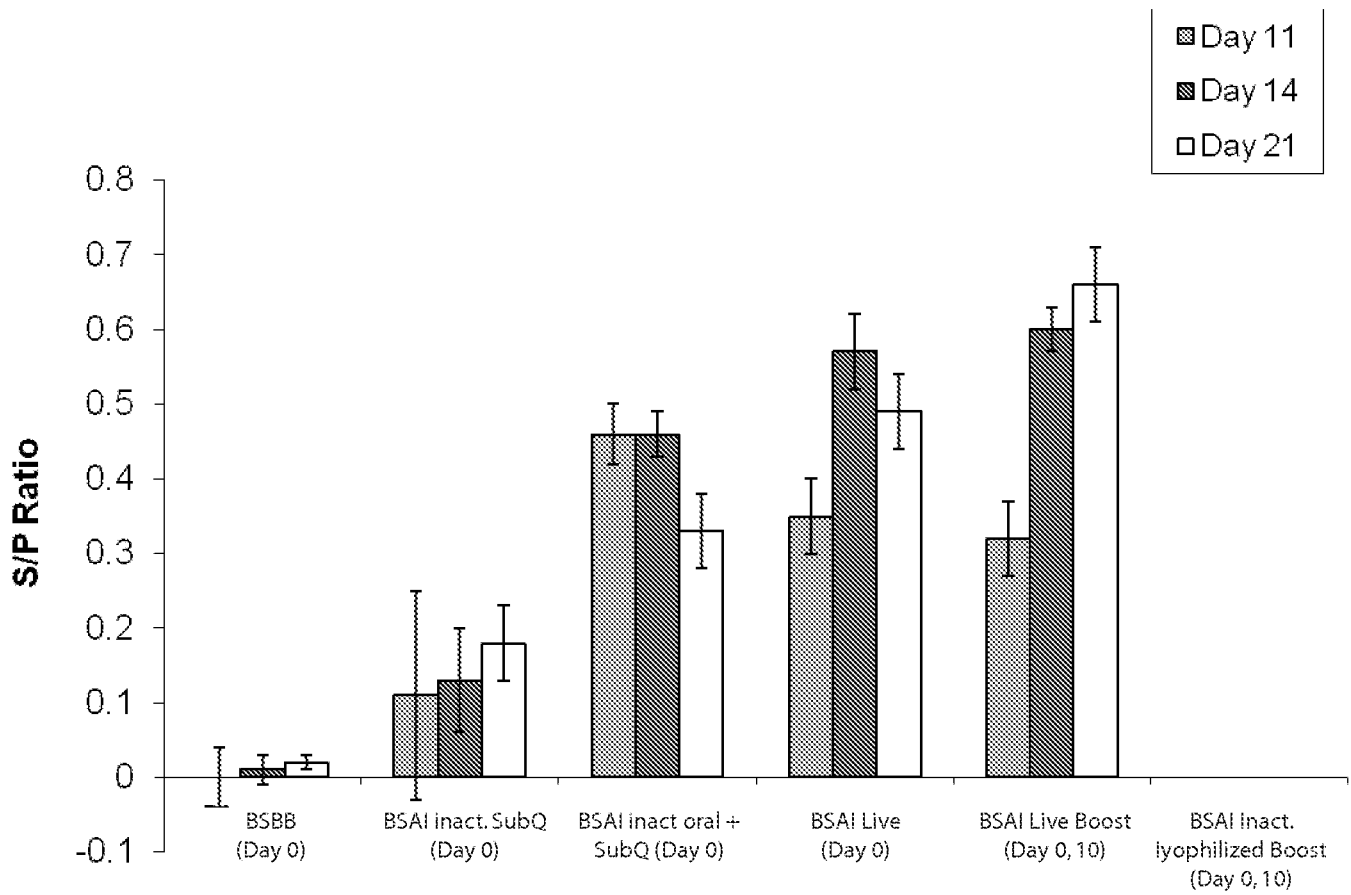


Fig. 8

9/9

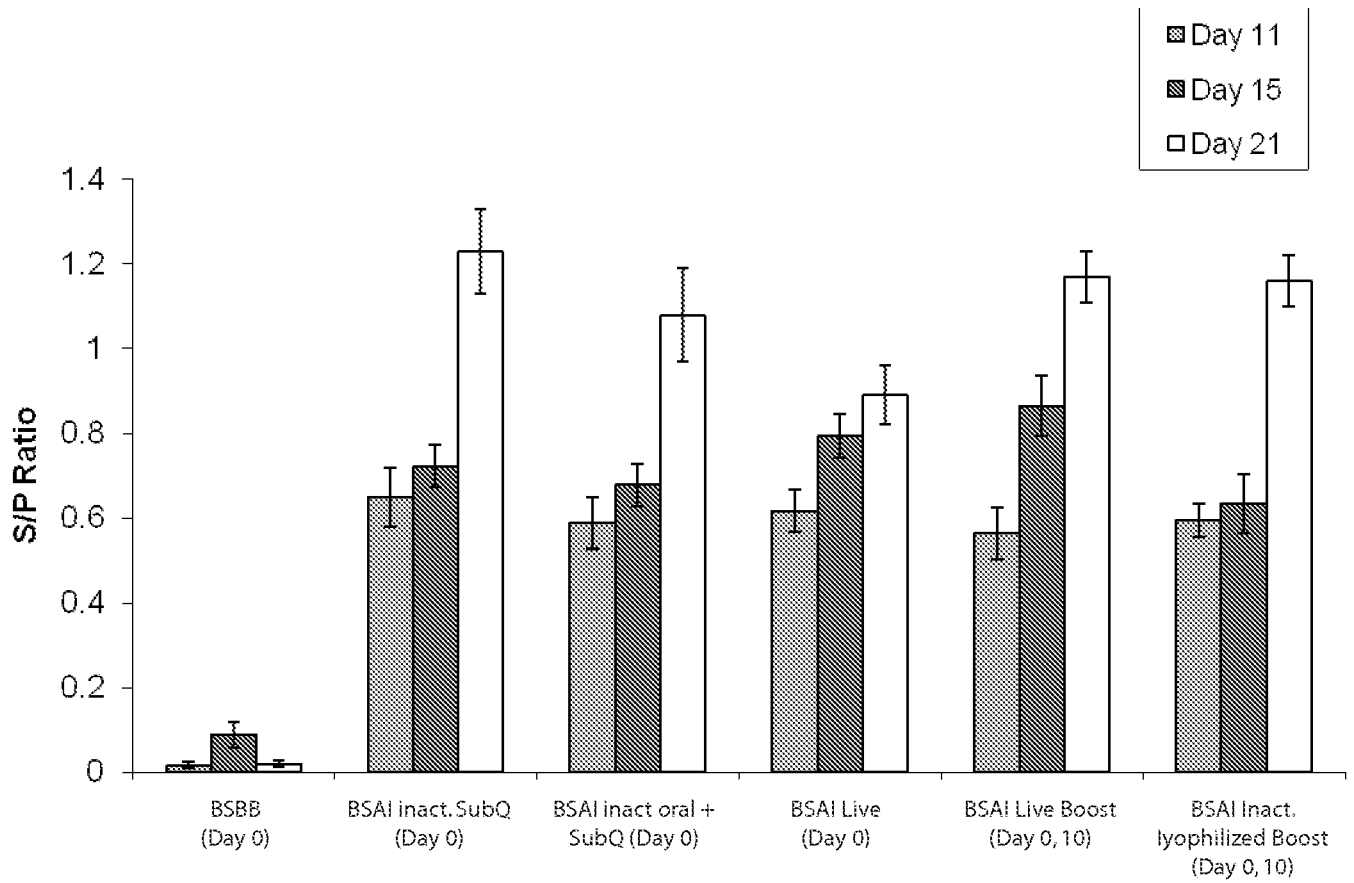


Fig. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/22062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/145 (2011.01)

USPC - 424/210.1, 209.1, 281.1

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8) - A61K 39/145 (2011.01)

USPC - 424/210.1, 209.1, 281.1

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

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

PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB), Google Scholar, Thomson Innovation

Search terms: vaccine, vector, HMGB1, high-mobility group protein B1, amphoterin, influenza, M2e, HA, NP, plasmid, Bacillus, cotB, IgA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2003/0165538 A1 (GOLDMAN et al.) 4 September 2003 (04.09.2003) para [0009], [0029], [0048], [0090], [0093], [0180].	25-28 ----- 29-30
X --- Y	US 2008/0305120 A1 (MESSMER et al.) 11 December 2008 (11.12.2008) para [0011]-[0012], [0018], [0021], [0049], [0071], [0103], [0105], [0108]; SEQ ID NO:1.	1-3, 6, 40-43 ----- 4, 5, 7
Y	WO 2008/036675 A2 (BOTTJE et al.) 27 May 2008 (27.05.2008) p 2, ln 3-6 ; Claim 8; SEQ ID NO:1.	4, 29
Y	US 2008/0069821 A1 (YANG et al.) 20 March 2008 (20.03.2008) para [0006]; SEQ ID NO:13.	5, 30
Y	US 2008/0004207 A1 (TSUNG et al.) 3 January 2008 (03.01.2008) para [0027], [0039]; Claim 11; SEQ ID NO: 37.	7
A	ROVERE-QUERINI et al., HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. EMBO Rep, August 2004, Vol 5, No 8, pp 825-830. Entire document	1, 6, 7

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 March 2011 (17.03.2011)

Date of mailing of the international search report

29 MAR 2011

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/22062

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 8-24, 31-39
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

(12) PUBLICACIÓN DE LA SOLICITUD INTERNACIONAL BAJO PCT

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
28 de julio de 2011 (28.07.2011)



(10) Número de publicación internacional
WO 2011/091255 A1

(51) Clasificación internacional de Patentes:
A61K 39/145 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/US2011/022062

(22) Fecha de la presentación internacional
21 de enero de 2011 (21.01.2011)

(25) Idioma de la presentación: inglés

(26) Idioma de la publicación: inglés

(30) Datos de la prioridad
61/297,098 21 de enero de 2010 (21.01.2010) US

(71) Solicitante (para todos los estados con excepción de US)
THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS [US/US]; 2404 North University Avenue, Little Rock, AR 72207 (US). **THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM** (US/US); 3369 Tamu, College Station, TX 77843-3369 (US).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes: (para US únicamente)
BERGHMAN, Luc [US/US]; 1207 Martinsville Lane, College Station, TX 77845 (US). **BOTTJE, Walter** [US/US]; 3841 East Skillern Road, Fayetteville, AR 72703 (US). **HARGIS, Billy** [US/US]; 3229 Oakland Zion Road, Fayetteville, AR 72703 (US). **LAYTON, Sherryll** [US/US]; 8111 Bainbridge Drive, Rogers, AR 72758 (US).

(74) Representante: **VANHEYNINGEN, Tambryn, K.**; Andrus, Sceales, Starke & Sawall, LLP, 100 East Wisconsin Avenue, Suite 11000, Milwaukee, WI 53202 (US).

(81) Estados designados (en la medida en que no se indique lo contrario para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados: (en la medida en que no se indique lo contrario para cada tipo de protección regional disponible): Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW) Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- con el informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con listado de secuencias como parte de la descripción (Rule 5.2(a))

(54) Título: Vectores para vacunas y métodos para potenciar respuestas inmunes

(57) Resumen: Vectores para vacunas que incluyen un polipéptido antigénico y un polipéptido HMGB1 que están presentes sobre la superficie del vector para vacunas. Composiciones que comprenden los vectores para vacunas e incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable, convenientemente un vehículo para administración oral o nasal. Métodos para potenciar respuestas inmunes, en particular, una respuesta inmune de anticuerpos y convenientemente una respuesta a IgA, mediante la administración a un sujeto de los vectores para vacunas o composiciones que se exponen en la presente.

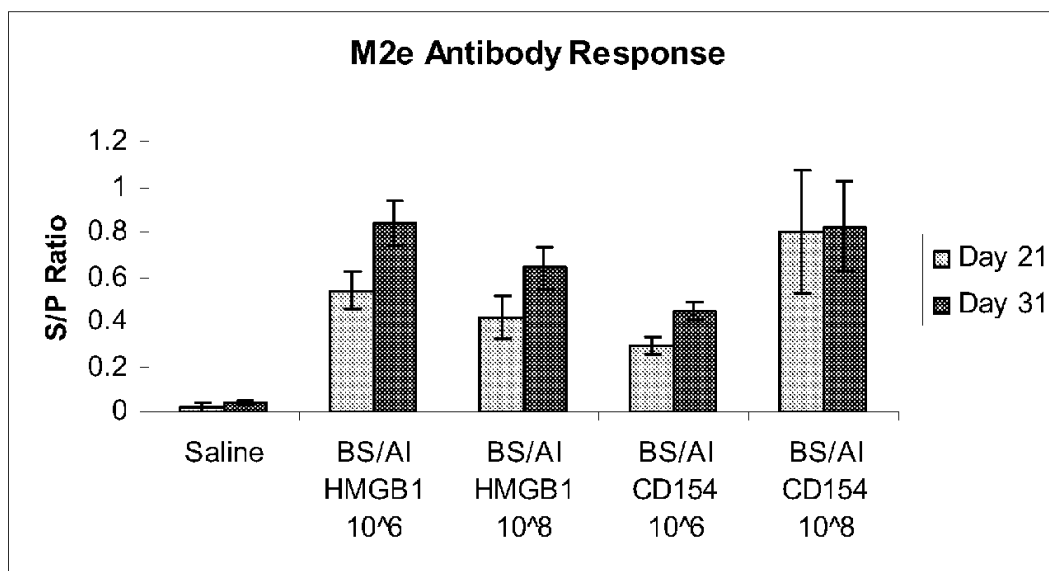


Fig. 1

MEMORIA DESCRIPTIVA

Introducción

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

La infección por virus de influenza, en particular el H5N1 de influenza aviar, representa una creciente importancia sanitaria y económica. La evidencia indica claramente que el H5N1 continua circulando entre aves y cerdos susceptibles en regiones cada vez extensas. Muchos científicos creen que si no se presta la debida atención, la influenza aviar H5N1 actual mutará para permitir la transmisión de humano a humano y para causar una pandemia mundial. Con una tasa de mortalidad de más del 50%, dicha epidemia sería devastadora. Sin importar la habilidad del virus para causar enfermedad en humanos, la influenza H5N1 aviar ya está amenazando con tener un enorme impacto económico debido a la erradicación de manadas de aves de corral en áreas afectadas.

Por lo tanto, se necesita el desarrollo de una vacuna para proteger a los humanos, aves de corral, cerdos y otros animales domésticos contra la influenza H5N1. Una vacuna para influenza que sea capaz de proteger contra H5N1 así como también contra otros virus de influenza, tal como H1N1, sería óptima.

Síntesis

En la presente se proveen vectores para vacunas y métodos para estimular una respuesta inmune y métodos para reducir la morbilidad asociada con la infección por influenza. En un aspecto, se provee un vector para vacunas que incluye un polipéptido antigénico y un polipéptido HMGB1 o un fragmento funcional de los mismos. Al menos una porción del polipéptido antigénico y del polipéptido HMGB1 está presente sobre la superficie del vector para vacunas. El vector para vacunas puede incluir un primer polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico y un segundo polinucleótido que codifica el polipéptido HMGB1. El polipéptido HMGB1 y el polipéptido antigénico pueden estar unidos, tal como en una proteína de fusión. El polipéptido HMGB1 y el polipéptido antigénico se pueden insertar ambos dentro de un bucle externo de una proteína transmembrana.

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

En aun otro aspecto, se provee un vector para vacunas contra *Bacillus* spp. El vector para vacunas incluye una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido

antigénico que se expresa sobre la superficie del vector para vacunas y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido inmunoestimulador que se expresa sobre la superficie del vector para vacunas. El polipéptido antigénico puede ser un polipéptido M2e de influenza, un polipéptido HA de influenza, o un polipéptido NP de influenza o una combinación de los mismos. El polipéptido inmunoestimulador puede ser un polipéptido CD154 o un polipéptido HMGB1 o una combinación de los mismos. El polipéptido inmunoestimulador y el polipéptido antigénico pueden estar unidos, tal como en una proteína de fusión y se pueden insertar en un bucle externo de una proteína transmembrana.

En aun otro aspecto, se proveen métodos para potenciar una respuesta inmune en un sujeto. En el método, se administran al sujeto, vectores para vacunas o composiciones provistas en la presente en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmune del sujeto hacia el polipéptido antigénico. Convenientemente, el vector para vacunas se administra por vía oral o por vía intranasal.

En otro aspecto, se proveen métodos para potenciar la respuesta inmune en un sujeto mediante la administración de un vector para vacunas contra *Bacillus* spp. como se describe en la presente. El vector para vacunas incluye una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido antigénico que se expresa sobre la superficie del vector para vacunas y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido inmunoestimulador que se expresa sobre la superficie del vector para vacunas. El polipéptido antigénico puede ser un polipéptido M2e de influenza, un polipéptido HA de influenza, un polipéptido

NP de influenza o una combinación de los mismos. El polipéptido inmunoestimulador puede ser un polipéptido CD154, un polipéptido HMGB1 o una combinación de los mismos.

En aun otro aspecto, se proveen métodos para reducir la morbilidad relacionada con influenza en un sujeto. En los métodos, la administración de los vectores para vacunas o composiciones que se exponen en la presente reduce la morbilidad asociada con una subsiguiente infección por influenza.

Descripción breve de las figuras

La figura 1 representa un gráfico que muestra las proporciones S/P (muestra a control positivo) del ELISA para producción de anticuerpos específicos contra M2e por parte de pollos después de la administración oral de la dosificación indicada de vector para vacunas a *Bacillus subtilis* que expresa los epitopes de influenza A y ya sea HMGB1 o CD154, en comparación con pollos vacunados con salina.

La figura 2 representa un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para producción de anticuerpos específicos contra HA LB mediante pollos después de la administración oral de la dosificación indicada de vector para vacunas a *Bacillus subtilis* que expresa los epitopes de influenza A y ya sea HMGB1 o CD154 en comparación con pollos vacunados con salina.

La figura 3 representa un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para la producción de anticuerpos específicos contra HA UA mediante pollos después de la administración oral de la dosificación

indicada de vector para vacunas a *Bacillus subtilis* que expresa los epitopes de influenza A y ya sea HMGB1 o CD154 en comparación con pollos vacunados con solución salina.

La figura 4 representa un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para producción de anticuerpos específicos contra M2e mediante pollos después de la administración oral de la dosificación indicada de vectores para vacunas a *Bacillus subtilis* vivos o diversamente inactivados que expresan los epitopes de influenza A y ya sea HMGB1 o CD154 en comparación con pollos vacunados con el vector de *Bacillus* solo (BSBB).

La figura 5 representa un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para producción de anticuerpos específicos contra HA LB mediante pollos después de la administración oral de la dosificación indicada de vectores para vacunas a *Bacillus subtilis* vivos o diversamente inactivados que expresan los epitopes de influenza A y ya sea HMGB1 o CD154 en comparación con pollos vacunados con el vector de *Bacillus* solo (BSBB).

La figura 6 representa un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para producción de anticuerpos específicos contra HA UA mediante pollos después de la administración oral de la dosificación indicada de vectores para vacunas a *Bacillus subtilis* vivos o diversamente inactivados que expresan los epitopes de influenza A y ya sea HMGB1

o CD154 en comparación con pollos vacunados con el vector de *Bacillus* solo (BSBB).

La figura 7 representa un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para la producción de anticuerpos a IgG específicos contra M2e mediante pollos después de la administración oral de 10^6 vectores para vacunas a *Bacillus subtilis*, ya sea vivos o bien inactivados por las diferentes dosificaciones de formalina que se indican, que expresan los epitopes de influenza A y HMGB1 en comparación con pollos vacunados con el vector de *Bacillus* solo (BSBB).

La figura 8 representa un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para producción de anticuerpo a IgA específico contra M2e mediante pollos vacunados, ya sea por vía oral o por vía subcutánea, con 10^6 vectores para vacunas a *Bacillus subtilis* vivos, inactivados con formalina o inactivados con formalina y liofilizados que expresan los epitopes de influenza A y HMGB1 en comparación con pollos vacunados con el vector de *Bacillus* solo (BSBB).

La figura 9 representa un gráfico que muestra las proporciones S/P del ELISA para producción de anticuerpo a IgA específico contra M2e mediante pollos vacunados, ya sea por vía oral o por vía subcutánea, con 10^6 vectores para vacunas a *Bacillus subtilis* vivos, inactivados con formalina o inactivados con formalina y liofilizados que expresan los epitopes

de influenza A y HMGB1 en comparación con pollos vacunados con el vector de *Bacillus* solo (BSBB).

Descripción detallada

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

Los vectores de para vacuna de bacterias o virus vivos pueden poseer aun riesgos para individuos inmunocomprometidos y pueden requerir observaciones reguladoras adicionales. Por lo tanto, es deseable el uso de vectores que estén muertos o inactivados o que califiquen como organismos generalmente vistos como seguros (GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA). El problema es generar una respuesta inmune robusta usando dichos vectores. Como se muestra en los ejemplos, mediante la inclusión de polipéptidos HMGB1 (*high mobility group box 1*) sobre la superficie del vector para vacunas los inventores pueden generar una respuesta inmune robusta contra los polipéptidos antigénicos

usando un vector de *Bacillus* spp. De hecho, los ejemplos demuestran que este vector se puede inactivar, de modo que el mismo no se pueda replicar, usando una variedad de métodos, y aun producir una respuesta inmune robusta después de su administración.

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

Los vectores para vacunas pueden ser bacterianos, virales o a base de liposomas. Los vectores para vacunas potenciales incluyen, sin carácter limitativo, *Bacillus* (*Bacillus subtilis*), *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*), *Shigella*, *Escherichia* (*E. coli*), *Yersinia*, *Bordetella*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* (*Vibrio cholerae*), *Listeria*, adenovirus, poxvirus, herpesvirus, alfavirus y virus adenoasociados. Convenientemente, el vector para vacunas es un organismo GRAS. El vector para vacunas puede estar inactivado o muerto de modo que no sea capaz de replicarse. Los métodos para inactivar o matar vectores para vacunas de bacterias o virus son conocidos para las personas con experiencia

en el arte e incluyen, sin carácter limitativo, métodos tales como los que se muestran en los ejemplos, a saber inactivación por formalina, inactivación a base de antibióticos, tratamiento con calor y tratamiento con etanol.

Un polipéptido antigénico es un polipéptido capaz de ser reconocido específicamente por el sistema inmune adaptativo. Un polipéptido antigénico incluye cualquier polipéptido inmunogénico. Los polipéptidos antigénicos incluyen, sin carácter limitativo, antígenos relacionados con patógenos, con alérgenos, con tumores o con enfermedades. Los patógenos incluyen patógenos virales, parasíticos, fúngicos y bacterianos así como también patógenos proteicos tales como los priones. Los polipéptidos antigénicos pueden ser proteínas de longitud completa o porciones de las mismas. Está bien establecido que el reconocimiento mediante el sistema inmune de muchas proteínas se basa en un número relativamente pequeño de aminoácidos, con frecuencia denominados epitope. Los epitopes pueden ser de entre solo 8 y 10 aminoácidos. Por lo tanto, los polipéptidos antigénicos que se describen en la presente pueden ser proteínas de longitud completa, epitopes de 8 aminoácidos de longitud o cualquier porción entre estos extremos. De hecho, el polipéptido antigénico puede incluir más de un epitope de un patógeno individual o proteína.

Se pueden incluir en el vector para vacunas múltiples copias del mismo epitope o de múltiples epitopes de diferentes proteínas. Se cree que se pueden administrar varios epitopes o antígenos del mismo o diferentes patógenos o enfermedades en combinación con un vector para vacunas individual para generar una respuesta inmune potenciada contra múltiples antígenos. Los

vectores para vacunas recombinantes pueden codificar antígenos de múltiples antígenos asociados a microorganismos patogénicos, virus o tumores. La administración de vectores para vacunas capaces de expresar múltiples antígenos tiene la ventaja de inducir inmunidad contra dos o más enfermedades al mismo tiempo.

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

Convenientemente se puede insertar el polipéptido M2e completo en el vector para vacunas o se puede usar solamente una porción. En los ejemplos, se incorporó un polipéptido de ocho aminoácidos (LM2 que tiene la secuencia de aminoácidos: EVETPIRN, SEQ ID NO:5 o su variante M2eA que tiene la secuencia de aminoácidos EVETPTRN, SEQ ID NO:6) en el vector para vacunas y se

demostró que produce una respuesta con anticuerpos después de su administración a pollos. Convenientemente, la porción del polipéptido M2e que se insertó en el vector para vacunas es inmunogénica. Un fragmento inmunogénico es un péptido o polipéptido que es capaz de producir una respuesta inmune celular o humoral. Convenientemente, un fragmento inmunogénico de M2e puede ser el polipéptido M2e de longitud completa, o convenientemente puede ser de 20 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos, 10 o más aminoácidos u 8 o más aminoácidos de la secuencia de longitud completa.

Otros epitopes apropiados para su inclusión en un vector para vacunas de influenza A incluyen, sin carácter limitativo, polipéptidos de la hemaglutinina (HA) o de la proteína nuclear (NP) de influenza A. Por ejemplo, se pueden incluir los péptidos de SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, o SEQ ID NO:10 en un vector para vacunas. En los ejemplos, se incorporaron SEQ ID NO: 7 (HAUA) y SEQ ID NO: 8 (HALB) en el vector para vacunas y demostraron producir una respuesta con anticuerpos después de su administración a pollos. Véanse las figuras 2-3 y 5-6. Además, en los ejemplos, se incorporaron en el vector para vacunas los epitopes NPs de SEQ ID NO: 9 (NP54) y SEQ ID NO: 10 (NP147). Una persona con experiencia en el arte apreciará que cualquiera de estas secuencias se puede usar en combinación con cualquier otro epitope que incluya epitopes que derivan de otros patógenos o antígenos.

La proteína HMGB1 (*High Mobility Group Box-1*) se identificó primero como una proteína de unión a ADN que es crítica para la estructura y estabilidad del ADN. Es una proteína nuclear que se expresa en forma ubicua que se une al ADN sin especificidad de

secuencia. La proteína está altamente conservada y se la encuentra en plantas hasta en mamíferos. Las secuencias de aminoácidos de HMGB1 de pez zebra, pollo y humano se proveen en SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 29, respectivamente. La secuencia está altamente conservada en mamíferos con 98% de identidad de aminoácidos y los cambios de aminoácidos son conservativos. Por lo tanto, una proteína HMGB1 de una especie probablemente puede sustituir funcionalmente a la de otras especies. La proteína HMGB1 de longitud completa o una porción de la misma, se puede usar como polipéptido HMGB1 en el vector para vacunas como se describe en la presente. HMGB1 tiene dos regiones de unión a ADN denominadas caja A, como se muestra en SEQ ID NO: 23 y 24 y caja B como se muestra en SEQ ID NO: 25 y 26. Véase Andersson and Tracey, Annu. Rev. Immunol. 2011, 29:139-162, la que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

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

Las actividades inflamatorias de HMGB1 no requieren de la de

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

Las personas con experiencia en el arte son capaces de identificar polipéptidos HMGB1 y fragmentos de los mismos que sean capaces de estimular actividad de citoquina proinflamatoria, usando métodos tales como los de la Publicación Internacional Nro. WO02 092004, la que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad. Convenientemente, el polipéptido HMGB1 incluye el dominio de unión a RAGE en los aminoácidos 150 a 183 de SEQ ID NO:18 (SEQ ID NO: 27 o un homólogo de la misma) y el dominio de actividad citoquina proinflamatoria entre los aminoácidos 89 y 109 de SEQ ID NO: 18 (SEQ ID NO: 28 o un homólogo de la misma). En particular, los polipéptidos HMGB1 y fragmentos funcionales u homólogos del mismo incluyen a polipéptidos idénticos, o al menos 99% idénticos, al menos 98% idénticos, al menos 95% idénticos, al menos 90% idénticos, al menos 85% idénticos, o al menos 80% idénticos a los polipéptidos HMGB1 de SEQ ID NOs: 18 o 23-30.

Al menos una porción del polipéptido antigénico y al menos una porción del polipéptido HMGB1 están presentes sobre la superficie del vector para vacunas. Presente sobre la superficie

del vector para vacunas incluye a polipéptidos que están comprendidos dentro de una proteína transmembrana, que interaccionan con la misma, covalentemente o químicamente entrecruzados con una proteína transmembrana, un lípido de membrana o carbohidrato anclado a membrana. Un polipéptido puede estar comprendido en una proteína transmembrana teniendo los aminoácidos que comprenden el polipéptido unidos a través de un enlace peptídico con el N-terminal, C-terminal o con cualquier parte dentro de la proteína transmembrana (o sea insertado entre dos aminoácidos de la proteína transmembrana o en el lugar de uno o más aminoácidos de la proteína transmembrana (o sea delección-inserción). Convenientemente, los polipéptidos se pueden insertar en un bucle externo de una proteína transmembrana. Proteínas transmembrana adecuadas son *cotB* y *lamB*, pero las personas con experiencia en el arte apreciarán que hay disponibles muchas proteína transmembranas apropiadas.

Alternativamente, los polipéptidos pueden unirse covalentemente o químicamente a proteínas, lípidos o carbohidratos en la membrana, o cápside, si es que se usa un vector viral, a lo largo de los métodos disponibles para las personas con experiencia en el arte. Por ejemplo, se pueden usar enlaces disulfuro o entrecruzamientos de biotina - avidina para presentar los polipéptidos antigénicos y HMGB1 sobre la superficie de un vector para vacunas. Convenientemente, el polipéptido antigénico y el polipéptido HMGB1 son parte de una proteína de fusión. Los dos polipéptidos se puede unir directamente a través de un enlace peptídico o puede estar separados por un adaptador o por una sección de una tercera proteína en la cual están insertados.

Los polinucleótidos que codifican el polipéptido antigénico

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

De forma alternativa, el polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico y/o el polipéptido HMGB1 se puede insertar en un polipéptido secretado que se expone o presenta sobre la superficie del vector para vacunas a través de la asociación con una proteína, lípido o carbohidrato sobre la superficie del vector para vacunas. Las personas con experiencia en el arte apreciarán que el polinucleótido que codifica el polipéptido

antigénico y/o el polipéptido HMGB1 se puede insertar en una amplia variedad de polinucleótidos del vector para vacunas para proveer la expresión y presentación del polipéptido antigénico y/o el polipéptido HMGB1 a las células inmunes del sujeto que se trata con el vector para vacunas. En los ejemplos, se expresaron varios epitopes de influenza, que incluyen un epítopo M2e, un epítopo HA y un epítopo NP, a partir de un plásmido para expresión vegetativa en *Bacillus subtilis*. La bacteria recombinante resultante expresa los epitopes insertados según se demuestra mediante la respuesta inmune que se muestra en las figuras 1 a 6.

En los ejemplos, los vectores para vacunas tienen los polipéptidos antigénicos (polipéptidos M2e, HA y NP) y el polipéptido inmunoestimulador (ya sea CD154 o bien HMGB1) codificados por el mismo polinucleótido y en fase uno con el otro. En formas de realización alternativas, el polipéptido inmunoestimulador y el polipéptido antigénico pueden estar codificados por polinucleótidos diferentes. Las personas con experiencia en el arte apreciarán que se puede usar una variedad de métodos para obtener la expresión del polipéptido antigénico y el polipéptido HMGB1 sobre la superficie del vector para vacunas. Dichos métodos son conocidos por las personas con experiencia en el arte.

También se proveen composiciones que comprenden el vector para vacunas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es cualquier vehículo apropiado para administración *in vivo*. Convenientemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es aceptable para administración oral, nasal o a través de mucosa. El vehículo

farmacéuticamente aceptable puede incluir agua, soluciones amortiguadas, soluciones de glucosa o fluidos de cultivo bacteria Nro. Otros componentes de las composiciones convenientemente pueden incluir excipientes tales como estabilizantes, preservantes, diluyentes, emulsionantes y lubricantes. Entre los ejemplos de vehículos o diluyentes aceptables para el uso farmacéutico se incluye a estabilizantes tales como carbohidratos (por ejemplo, sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas tales como albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas tales como suero bovino o leche descremada y soluciones amortiguadoras (p.ej., solución amortiguadora de fosfatos). En especial cuando se agregan dichos estabilizantes a las composiciones, la composición es apropiada para secado por congelación o secado por atomizado. El vector para vacunas en las composiciones puede no ser capaz de replicarse, convenientemente el vector para vacunas se inactiva o mata antes de su agregado a la composición.

Las composiciones que se describen en la presente se pueden usar para potenciar una respuesta inmune tal como una respuesta con anticuerpos hacia el polipéptido antigénico. Las composiciones que contienen polipéptidos de influenza también se pueden usar para disminuir la morbilidad asociada con la subsiguiente infección por influenza. Las composiciones pueden prevenir que la influenza cause enfermedad o cualquier morbilidad asociada en un sujeto al cual se administraron las composiciones o el vector para vacunas como se describe en la presente. Las composiciones y el vector para vacunas como se describen en la presente pueden reducir la severidad de la enfermedad subsiguiente mediante la disminución de la longitud de la

enfermedad, disminuyendo la morbilidad o mortalidad asociadas con la enfermedad o reduciendo la posibilidad de contraer la enfermedad. La morbilidad o mortalidad asociadas con la enfermedad después de la administración del vector para vacunas como se describe en la presente se pueden reducir en 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso 100% en comparación con sujetos similares que no recibieron el vector para vacunas.

También se proveen métodos para potenciar las respuestas inmunes en un sujeto mediante la administración de un vector para vacunas. El vector para vacunas puede contener un polipéptido HMGB1 capaz de estimular la respuesta inmune contra el vector para vacunas y su polipéptido antigénico asociado. El vector para vacunas que comprende un polipéptido de HMGB1 se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmune del sujeto contra la vacuna y en particular hacia el polipéptido antigénico. Convenientemente, el vector para vacunas contiene un polinucleótido que codifica un polipéptido que incluye los aminoácidos 150 a 183 y 89 a 109 del polipéptido HMGB1 (SEQ ID NO: 18) o un homólogo del mismo. En los ejemplos, se usó un polipéptido de 190 aminoácidos de HMGB1. Convenientemente, el polinucleótido codifica un polipéptido HMGB1 de la misma especie que el sujeto. Las combinaciones heterólogas de polipéptidos HMGB1 y sujetos (o sea un polipéptido HMGB1 humano para usar en una vacuna para pollos) pueden ser útiles en los métodos de la invención debido a que HMGB1 está altamente conservado a través de un amplio número de especies. El polipéptido HMGB1 se puede usar para potenciar la respuesta inmune en el sujeto hacia cualquier antígeno o polipéptido antigénico foráneo que esté presente en, o sobre el vector para vacunas. Una persona con

experiencia en el arte apreciará que el polipéptido HMGB1 se puede usar para potenciar la respuesta inmune hacia más de un polipéptido antigénico presente en un vector para vacunas. El polipéptido de HMGB1 estimula una respuesta inmune al menos en parte mediante la activación de células dendríticas y macrófagos y por lo tanto estimulando la producción de citoquinas tales como IL-1, IL-6, IFN- γ y TNF- α . En los ejemplos, se expresó un polipéptido de HMGB1 sobre la superficie del vector para vacunas.

Además, se exponen métodos para potenciar una respuesta inmune contra influenza A y métodos para reducir la morbilidad asociada con la subsiguiente infección por influenza A. Brevemente, los métodos comprenden administrar a un sujeto un vector para vacunas que comprende un epítopo de influenza A (un polipéptido antigénico de influenza) que sea capaz de producir una respuesta inmune en una cantidad eficaz para producir la respuesta inmune. El epítopo de influenza A puede ser un polipéptido M2e, un HA polipéptido o un NP polipéptido u otro polipéptido de influenza como se expuso previamente. La inserción de los polipéptidos antigénicos en el vector para vacunas se puede llevar a cabo en una variedad de formas que son conocidas para las personas con experiencia en el arte, que incluyen, sin carácter limitativo, el sistema de mutagénesis sin cicatrices dirigida a sitio, que se describe en la Publicación de Patente Internacional Nro. WO 2008/036675. Las bacterias también se pueden manipular por ingeniería para que expresen polipéptidos de influenza junto con polinucleótidos capaces de potenciar la respuesta inmune como se expuso previamente. En particular, se puede expresar un polipéptido de CD154 o HMGB1 mediante el vector para vacunas para potenciar la respuesta inmune del sujeto contra

los polipéptidos de influenza. Los ejemplos demuestran la producción de una respuesta robusta a IgA e IgG ante la vacunación en pollos. Los inventores esperan que dicha respuesta robusta sea protectora, o que al menos reduzca la morbilidad asociada con la subsiguiente infección o desafío con la fuente del polipéptido antigénico (virus de influenza en los ejemplos).

Las composiciones se pueden administrar mediante una variedad de medios que incluyen, sin carácter limitativo, por vía oral, por vía intranasal, y a través de mucosa. Por ejemplo, las composiciones o vectores para vacunas se pueden administrar mediante aerosol, mediante atomizado, mediante su agregado a comida o agua, mediante alimentación oral, o a través de gotas oculares. En algunas formas de realización, las composiciones se administran mediante inyección tal como intradérmica, parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intracraneal, o intramuscular. Para los pollos u otras aves de corral, las composiciones se pueden administrar *in ovo*.

Los sujetos incluyen, sin carácter limitativo, un vertebrado, convenientemente un mamífero, convenientemente un humano, vacas, gatos, perros, cerdos, o aves, convenientemente aves de corral tal como pollos. También se pueden usar otros modelos animales de infección. La potenciación de la respuesta inmune incluye, sin carácter limitativo, inducir un efecto profiláctico o terapéutico que está mediado por el sistema inmune del sujeto. Específicamente, la potenciación de una respuesta inmune puede incluir la producción aumentada de anticuerpos, tal como se demuestra en las figuras 1 a 3, aumento de cambio de clase de las cadenas pesadas de anticuerpo tal como la producción de IgA como se muestra en la figura 8, maduración de células

presentadoras de antígenos, estimulación de células T *helper*, estimulación de células T citotóxicas o inducción de memoria de células T y B.

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

La composición se puede administrar solo una vez o se pueden administrar dos o más veces para incrementar la respuesta inmune. Por ejemplo, la composición se puede administrar dos o más veces, separadas por una semana, dos semanas, o por tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, seis meses o más. La bacteria puede ser viable antes de la administración, pero en algunas formas de realización la bacteria se puede matar o inactivar antes de la administración. En algunas formas de realización, la bacteria puede ser capaz de replicarse en el sujeto, mientras que en otras formas de realización la bacteria puede no ser capaz de replicarse en el sujeto. Como se muestra en los ejemplos, los vectores para vacunas bacterianas se pueden inactivar antes de la administración usando formalina, etanol, calor o antibióticos. Una persona con experiencia en el arte apreciará que también se pueden usar otros métodos para inactivar vectores para vacunas.

En la presente también se provee un vector para vacunas

contra *Bacillus* spp. El vector para vacunas a *Bacillus* incluye una primera secuencia de polinucleótidos que codifican un polipéptido antigénico y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifican para un polipéptido inmunoestimulador. El polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulador están presentes sobre la superficie del vector para vacunas a *Bacillus* como se describió previamente. El polipéptido antigénico es un polipéptido de influenza como se describió previamente y el polipéptido inmunoestimulador es un polipéptido HMGB1 como se describió previamente o un polipéptido CD154.

También se pueden insertar dentro del polinucleótido del vector para vacunas que codifica polipéptidos inmunoestimuladores homólogos a proteínas del sujeto y que son capaces de estimular al sistema inmune para responder al polipéptido antigénico. Como se describe en más detalle en los ejemplos, un vector para vacunas puede incluir un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40 en el sujeto y estimular al sujeto para responder contra el vector para vacunas y su polipéptido antigénico asociado, similar a HMGB1 descrito previamente. El vector para vacunas a *Bacillus* puede incluir un polipéptido HMGB1, un polipéptido CD154 o una combinación de los mismos. Como se describió previamente, los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos se pueden insertar en el cromosoma del vector para vacunas o se pueden mantener extracromosómicamente. Una persona con experiencia en el arte apreciará que estos polipéptidos se pueden insertar en una variedad de polipéptidos del vector para vacunas y expresarse en diferentes partes del vector para vacunas, o que se pueden secretar.

El polinucleótido que codifica un polipéptido

inmunoestimuladorio capaz de potenciar la respuesta inmune hacia un polipéptido antigénico puede también codificar para el polipéptido antigénico. El polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimuladorio puede estar unido al polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico, de forma que en el vector para vacunas, el polipéptido inmunoestimuladorio y el polipéptido antigénico están codificados por el mismo polinucleótido. En los ejemplos, un polinucleótido que codifica para un polipéptido de CD154, que es capaz de unirse a CD40, o HMGB1, también codifica para un epítopo M2e, un epítopo HA y un epítopo NP de influenza A. Véanse las SEQ ID NOs: 19 a 22. En los ejemplos, el polinucleótido que codifica los epítopos de influenza y el polinucleótido que codifica el polipéptido inmunoestimuladorio se expresan ambos a partir de un plásmido para expresión en células vegetativas. En algunas formas de realización, los polinucleótidos se insertan en el gen *cotB* u otro gen que codifique para una proteína que se expresa sobre la superficie de los esporos. Las personas con experiencia en el arte apreciarán que también se pueden usar polinucleótidos bacterianos que codifican otras proteínas transmembrana.

Como se expuso previamente, se puede incluir un polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimuladorio homólogo a una proteína del sujeto que es capaz de potenciar la respuesta inmune hacia el epítopo en el vector para vacunas. En los ejemplos, se demostró que un vector para vacunas a *Bacillus* que incluye un polinucleótido que codifica ya sea un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40 o un polipéptido que codifica HMGB1, potencia la respuesta inmune contra el epítopo M2e y contra los dos diferentes epítopos HA, según medida de incremento de la

producción de anticuerpos en respuesta a la vacunación.

Convenientemente, el polipéptido CD154 tiene menos de 50 aminoácidos de longitud, más convenientemente menos de 40, menos de 30 o menos de 20 aminoácidos de longitud. El polipéptido puede ser de entre 10 y 15 aminoácidos, entre 10 y 20 aminoácidos o entre 10 y 25 aminoácidos de longitud. La secuencia de CD154 y la región de unión de CD40 no están altamente conservadas entre las diferentes especies. Las secuencias de CD154 de pollo y humana se proveen en SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, respectivamente.

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

El vector para vacunas a *Bacillus* que se describe en la presente se puede usar en los métodos para potenciar una respuesta inmune y los métodos para reducir la morbilidad por influenza en un sujeto como se describió previamente. El vector para vacunas a *Bacillus* se puede usar para hacer composiciones

para administración a sujetos tales como los que también se describen previamente.

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

Los polinucleótidos heterólogos incluyen, sin carácter limitativo, polinucleótidos que codifican antígenos que se seleccionan de microorganismos o virus patógenos distintos al vector para vacunas. Dichos polinucleótidos pueden derivar de virus patogénicos tales como influenza (por ejemplo, M2e, hemaglutinina, o neuraminidasa), herpesvirus (p.ej., los genes que codifican las proteínas estructurales de herpesvirus), retrovirus (p.ej., la proteína de cubierta gp160), adenovirus, paramixovirus, coronavirus y similares. Los polinucleótidos heterólogos también se pueden obtener a partir de bacterias patogénicas, por ejemplo, genes que codifican proteínas bacterianas tales como toxinas, y proteínas de membrana externa. Además, los polinucleótidos heterólogos de parásitos, tales como *Eimeria* son candidatos atractivos para usar en una vacuna a base de vector.

También se pueden incluir polipéptidos inmunoestimulatorios

adicionales involucrados en el disparo del sistema inmune en el vector para vacunas como se describe en la presente. Los polinucleótidos pueden codificar moléculas del sistema inmune que sean conocidas por sus efectos estimulatorios, tales como una interleuquina, factor de necrosis tumoral o un interferón, u otro polinucleótido involucrado en la regulación inmune.

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

EJEMPLOS

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

Vectores de *Bacillus*.

Cepas y condiciones de cultivo

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

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

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

Plásmidos

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

Producción de proteínas heterólogas para expresión en células vegetativas:

Se transformó el plásmido pHT10 adquirido de MoBioTec/Boca Scientific, Boca Raton, FL (Nguyen et al., 2007) en el sitio de clonado múltiple mediante el agregado de una secuencia de inserción optimizada por codón para *Bacillus subtilis*. Se hizo secuenciación de ADN para confirmar la inserción correcta de la secuencia. El plásmido recién modificado se transformó entonces en *Bacillus*. Brevemente, se desarrollaron cultivos de *Bacillus* durante una noche a 37°C en medio HS (medio de Spizizen suplementado con glucosa al 0,5%, DL-triptofano 50 µg/ml, uracilo 50 µg/ml, hidrolizado de caseína al 0,02%, extracto de levadura al 0,1%, arginina 8 µg/ml, histidina 0,4 µg/ml, MgSO₄ 1 mM). Se usó el cultivo de una noche (1 ml) para inocular 20 ml de medio LS (Medio de Spizizen suplementado con glucosa al 0,5%, DL-triptofano 5 µg/ml, uracilo 5 µg/ml, hidrolizado de caseína al 0,01%, extracto de levadura al 0,1%, MgSO₄ 1 mM, MgCl₂ 2,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM) y se incubó con agitación

entre 3 y 4 horas a 30 °C. A 1 ml del cultivo de LS resultante se agregó 10 µl de EGTA 0,1 M y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se agregó entre 1 y 2 µg de ADN plasmídico, se agitó durante 2 horas a 37°C, y se plaqueó en placas de LB con antibióticos de selección. Estos *Bacillus* spp. transformados ahora producen secuencias de epitopes heterólogos a partir de AI cuando se los induce con IPTG 1 mM.

PCR

Todos los cebadores que se usaron para PCR se listan en la tabla 1. Las condiciones típicas de PCR consisten en aproximadamente 0,1 µg de ADN genómico purificado, plasmídico o generado por PCR (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.), solución amortiguadora para *Pfu* polimerasa 1x, 5 U de *Pfu* polimerasa (Stratagene La Jolla, CA, EE.UU.), dNTPs 1 mM (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ), 1,2 µM de cada cebador en un volumen total de 50 µL. Se usó el DNA engine thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) con las siguientes condiciones de amplificación: 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 60 segundos, 72°C durante 90 segundos por cada 1 kb; y 72°C durante 10 minutos para la extensión final. Cada producto de PCR se purificó por gel (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.) y se eluyó o bien con 25 µL de solución amortiguadora EB para la preparación de los moldes que se usan en la PCR de extensión solapada, o con 50 µL de solución amortiguadora EB, se precipitó con etanol y se resuspendió en 5 µL de ddH₂O para electroporación en *Bacillus* spp.

Tabla 1: secuencias de cebadores que se usaron para generar el vector para vacunas

Ceba- dor	Re- gión ampli-	Secuencia de cebador (SEQ ID NO:)
--------------	-----------------------	------------------------------------

	ficada	
mazF directo	gen MazF	5'ctaaaaatcttcagatgatcaatcatcctcactgcccgctttccagtcgggaaa3' (SEQ ID NO: 31)
mazF reverso	gen MazF	5'tgaacgtgacgaacgaccagatttccccctatgcaagggtttat3' (SEQ ID NO: 32)
CotB arriba directo	Cot B arriba	5' gaaatgctcgatgctgatga 3' (SEQ ID NO: 33)
Cot B arriba reverso	Cot B arriba	5'ggatgattgatcatctgaagatttttag3' (SEQ ID NO: 34)
Cot B dn directo	Cot B abajo	5'aaatctggtcggttcgtcacgttca3' (SEQ ID NO: 35)
Cot B dn reverso	Cot B abajo	5' ttacgtttccagtgatagtctatcg3' (SEQ ID NO: 36)
BS/AI/HMGB1 directo	BS/AI / HMGB1 CotB arriba	5'aaccattctttcaattgtaattgaattttgaatcagtcctgcctgatgatgacag ttcttcataatcattaaaatc gcccggatagcacagatcatttgccggatttgctgatgatgaatccatgcctgttct aaccagtgtctcttgttc tttgatatgt <i>ggatgattgatcatctgaagatttttag3'</i> (SEQ ID NO: 37)
BS/AI/HMGB1 reverso	BS/AI / HMGB1 CotB abajo	5'ttacaattgaaagaatggttctgtcatcatcatcactgctgtcaagaattaatca ttttgaaaaaattcaatcat catcagaagttgaaacaccgattagaaattcatcatcatggatgacaacatcatatg caccgacatcatcatca tcagaagttgaaacaccgattagaaataaatctggtcggttcgtcacgttca3' (SEQ ID NO: 38)
BS/AI/CD154 directo	BS/AI / CD154 CotB arriba	5'ttcaaaatgattaattcttgacagcagtgatgatgatgacagaaccattctttca attgtaattgaattttgaaat cagtcctgcctgatgatgacagttcttcataatcattaaaatcgcccggatagcacag atcatttgccggatttg <i>cggatgattgatcatctgaagatttttag3'</i> (SEQ ID NO: 39)
BS/AI/CD154 reverso	BS/AI / CD154 CotB abajo	5'caagaattaatcattttgaaaaaattcaatcatcatcagaagttgaaacaccgat tagaaattcatcatcactgaaa gaaaaatatgaaaaagatattgcagcatatagagcaaaaggcaaagttgat gcaggcaaaaaagttgttgcaaa agcagaaaaatcaaaaaaaaatctggtcggttcgtcacgttca3' (SEQ ID NO: 40)

En la tabla 1, los nucleótidos en itálica son los que son complementarios a cada lado del sitio de la inserción del gen *CotB* de *Bacillus subtilis*.

Electroporación

Brevemente, se inocularon las células en 10 mL de caldo LB y se crecieron a 37°C durante una noche. Luego, se reinocularon 100 µL del cultivo obtenido durante una noche en 10 mL de caldo LB fresco a 37°C entre 3 y 4 horas. Se lavaron las células cinco veces con agua ddH₂O y se resuspendieron en 60 µL de glicerol al 10%. Luego se sometió a las células a pulsos de entre 2,4 y 2,45

kV entre 1 y 6 ms, se incubaron en 0,5 ml de SOC entre 2 y 3 horas a 37°C y se plaquearon en medio LB con antibióticos apropiados.

Integración cromosomal de ADN heterólogo para expresión de cubierta de esporo:

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

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

secuenciación de ADN.

Ejemplo 2. Estudio de vacunación 1 y 2.

Se obtuvieron polluelos recién nacidos (día 0) de un granja comercial local y se distribuyeron al azar en los grupos de tratamiento (n=15/grupo de tratamiento, exp. 1 y n=20/grupo de tratamiento, exp. 2). Se marcaron y numeraron todos los polluelos de cada grupo de tratamiento. Se infectaron los polluelos por vía oral mediante alimentación con 0,25 ml de solución salina o entre 10^6 y 10^8 ufc/ml de los diferentes tratamientos con *Bacillus* según se indica en la tabla 2 para el estudio 1 y en la tabla 3 para el estudio 2.

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

Grupo de tratamiento	Dosis de desafío
Solución salina sola	
BS/AI/HMGB1	10^6 ufc/ml
BS/AI/HMGB1	10^8 ufc/ml
BS/AI/CD154	10^6 ufc/ml
BS/AI/CD154	10^8 ufc/ml

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

Grupo de tratamiento	Dosis de desafío
BSBB (<i>Bacillus</i>)	10^6 ufc/ml
BS/AI/HMGB1	10^6 ufc/ml
BS/AI/CD154	10^6 ufc/ml
BS/AI/HMGB1 inactivado por calor	10^6 ufc/ml
BS/AI/HMGB1 inactivado por	10^6 ufc/ml

formalina	
BS/AI/HMGB1 inactivado por antibiótico	10^6 ufc/ml
BS/AI/HMGB1 inactivado por etanol	10^6 ufc/ml

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

Cada grupo de tratamiento se alojó en un piso de gallinero individual sobre lecho de pino fresco y se proveyó con agua y alimento *ad libitum*. En los días 11 y 21 después de la eclosión, las aves recibieron una vacuna de refuerzo del mismo tratamiento que habían recibido en el día 0. También en los días 21 y 31/32, se colectó sangre de cada una de las aves marcadas y se separó el suero.

El suero que se colectó a partir de las aves marcadas de cada grupo de tratamiento se usó entonces en un ELISA de captura de anticuerpo para determinar la respuesta específica de anticuerpos contra M2e, HAUA y HALB. Brevemente, se recubrieron

los pocillos individuales de una placa de 96 pocillos con 10 µg/ml de epítopo M2e, epítopo HAUA o epítopo HALB conjugado a BSA. Se dejó que los antígenos procedan a adherirse durante una noche a 4°C. Se lavaron las placas con PBS + Tween 20 al 0,05%, se bloquearon con PBS Superblock (Pierce Chemical Co.) durante un mínimo de 2 horas y se incubaron durante 2 horas con el suero previamente colectado de las aves de cada uno de los grupos de tratamiento que se describió previamente. Se lavaron las placas con PBS + Tween 20 al 0,05% seguido por incubación con anticuerpo secundario de cabra anti IgY de pollo (dilución 1:7.500) conjugado con peroxidasa, obtenido de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) durante una hora adicional. Después del subsiguiente lavado, se desarrollaron las placas usando un conjunto de componentes con sustrato para peroxidasa que se obtuvo de Fisher Scientific y se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro a 450 nm y 405 nm.

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

cálculo de relación S/P:

media de muestras - media de control negativo

media de control positivo - media de control negativo

Las relaciones S/P que se calcularon para cada estudio se muestran en las figuras 1 a 6. Las figuras 1 a 3 muestran los

títulos de anticuerpos totales contra M2e, HALB y HAUA para el estudio 1, respectivamente, en los días 21 y 31 después de la eclosión. Los resultados demuestran que se generaron respuestas inmunes robustas contra cada uno de estos antígenos después de la administración con un *Bacillus* que expresa cada uno de los epitopes ya sea con CD154 o bien con HMGB1 como péptido inmunoestimulador. Las figuras 4 a 6 muestran los títulos de anticuerpo total contra M2e, HALB y HAUA para el estudio 2, respectivamente, en los días 21 y 32 después de la eclosión. Los resultados demuestran que se generaron respuestas inmunes robustas hacia cada uno de los epitopes después de la administración oral de un *Bacillus* vivo que expresa el epitope y un péptido inmunoestimulador. Las figuras 4 a 6 también demuestran que se generaron niveles similares de anticuerpos específicos cuando el vector (el *Bacillus*) se inactivó antes de la administración.

Ejemplo 3. Estudio de vacunación 3

Se obtuvieron polluelos recién nacidos (día 0) de una granja comercial local y se distribuyeron al azar en grupos de tratamientos (n=20/grupo de tratamiento). Se marcaron y numeraron todos los polluelos de cada grupo de tratamiento. Se infectaron los polluelos por vía oral mediante alimentación con 0,25 ml de solución salina o entre 10^5 y 10^8 ufc/ml del vector de *Bacillus* (BSBB), el vector de *Bacillus* que expresa los epitopes de influenza aviar y HMGB1 (BS/AI/HMGB1), o diferentes cantidades del vector BS/AI/HMGB1 después de inactivación por formalina (como se describió previamente). En el día 10 después de la eclosión, las aves recibieron una vacuna de refuerzo del mismo tratamiento que habían recibido en el día 0. También en los días

21 y 32, se colectó sangre de cada una de las aves marcadas y se separó el suero. Se determinaron los niveles séricos de anticuerpo IgG específico contra M2e usando el método que se describió previamente con un anticuerpo secundario específico anti IgG de pollo marcado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Los resultados de la figura 7 muestran que las bacterias inactivadas con formalina fueron capaces de estimular la producción de anticuerpos IgG específicos contra M2e así como también las bacterias vivas. Este resultado fue sorprendente debido a que en general se cree que solamente las bacterias vivas pueden estimular una respuesta inmune robusta después de administración oral.

Ejemplo 4. Estudio de vacunación 4

Se obtuvieron polluelos recién nacidos (día 0) de una granja comercial local y se distribuyeron al azar en los grupos de tratamiento (n=20-35/grupo de tratamiento). Se marcaron y numeraron todos los polluelos de cada grupo de tratamiento. Se infectaron los polluelos por vía oral mediante alimentación o se inyectaron por vía subcutánea con 0,25 ml de 10^6 ufc/ml del vector de *Bacillus* (BSBB), el vector de *Bacillus* que expresa los epitopes influenza aviar y HMGB1 (BSAI), o el vector de BSAI después de inactivación por formalina (como se describió previamente) o después de inactivación por formalina seguido por liofilización (reconstituido con solución salina inmediatamente antes de la administración). En el día 10 después de la eclosión, algunas de las aves recibieron una vacuna de refuerzo del mismo tratamiento que habían recibido en el día 0. En los días 11, 14 y 21, se colectó sangre de cada una de las aves marcadas y se separó el suero. Se determinaron los niveles de anticuerpos

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

Reivindicaciones

1. Un vector para vacunas que comprende un polipéptido antigénico y un polipéptido HMGB1 o un fragmento funcional de los mismos, en donde al menos una porción del polipéptido antigénico y al menos una porción del polipéptido HMGB1 están presentes sobre la superficie del vector para vacunas.

2. El vector para vacunas de la reivindicación 1, en donde el polipéptido antigénico es un polipéptido específico de influenza.

3. El vector para vacunas de la reivindicación 2, en donde el polipéptido antigénico es un polipéptido de influenza M2e, HA o NP.

4. El vector para vacunas de la reivindicación 3, en donde el polipéptido M2e de influenza se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO:1, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO:2, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO:3 y un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO:4.

5. El vector para vacunas de la reivindicación 3, en donde el polipéptido antigénico se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.

6. El vector para vacunas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido HMGB1 se selecciona entre SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, un fragmento funcional de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, o SEQ ID NO: 30 y un homólogo del mismo.

7. El vector para vacunas de la reivindicación 6, en donde

el fragmento funcional de HMGB1 se selecciona entre SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28.

8. El vector para vacunas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el vector para vacunas es una bacteria.

9. El vector para vacunas de la reivindicación 8, en donde la bacteria es *Bacillus* spp.

10. El vector para vacunas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el polipéptido antigénico está comprendido dentro de una proteína transmembrana.

11. El vector para vacunas de la reivindicación 10, en donde el polipéptido antigénico está dentro de un bucle externo de una proteína transmembrana.

12. El vector para vacunas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el polipéptido HMGB1 está comprendido dentro de una proteína transmembrana.

13. El vector para vacunas de la reivindicación 12, en donde el polipéptido HMGB1 se encuentra dentro de un bucle externo de una proteína transmembrana.

14. El vector para vacunas de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde la proteína transmembrana es *cotB*.

15. El vector para vacunas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el polipéptido antigénico y el polipéptido HMGB1 son parte de una proteína de fusión.

16. Una composición que comprende el vector para vacunas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17. La composición de la reivindicación 16, en donde el vehículo farmacéuticamente aceptable es aceptable para administración oral o nasal.

18. La composición de la reivindicación 16 o 17, en donde el vector para vacunas no es capaz de replicación.

19. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde el vector para vacunas se inactiva o elimina.

20. Un método para potenciar una respuesta inmune en un sujeto que comprende administrar al sujeto el vector para vacunas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmune del sujeto contra el polipéptido antigénico.

21. El método de la reivindicación 20, en donde el vector para vacunas se administra por vía oral o por vía intranasal.

22. El método de la reivindicación 21, en donde la respuesta inmune es una respuesta con anticuerpos IgA contra el polipéptido antigénico.

23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en donde el vector para vacunas no es capaz de replicarse en el sujeto.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en donde el vector para vacunas se inactiva o se elimina antes de la administración al sujeto.

25. Un vector para vacunas contra *Bacillus* spp. que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido antigénico que está presente sobre la superficie del vector para vacunas y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido inmunoestimulador, en donde el polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulador están presentes sobre la superficie del vector para vacunas, en donde el polipéptido antigénico es un polipéptido de influenza y en donde el polipéptido inmu-

noestimuladorio es un polipéptido CD154 o un polipéptido HMGB1.

26. El vector para vacunas de la reivindicación 25, en donde el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido se insertan dentro de una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica una porción externa de una proteína transmembrana.

27. El vector para vacunas de la reivindicación 26, en donde la proteína transmembrana es *cotB*.

28. El vector para vacunas de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en donde el polipéptido antigénico es un polipéptido M2e de influenza, un polipéptido HA de influenza, o un polipéptido NP de influenza.

29. El vector para vacunas de la reivindicación 28, en donde el polipéptido M2e de influenza se selecciona del grupo que consiste de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO:1, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO:2, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO:3 y un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO:4.

30. El vector para vacunas de la reivindicación 28, en donde el polipéptido de influenza comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10.

31. El vector para vacunas de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, en donde el polipéptido HMGB1 se selecciona entre SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, un fragmento funcional de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 29, o SEQ ID NO: 30 y un homólogo del mismo.

32. El vector para vacunas de la reivindicación 31, en donde el fragmento funcional de HMGB1 se selecciona entre SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28.

33. Un método para potenciar una respuesta inmune en un

sujeto que comprende administrar al sujeto el vector para vacunas contra *Bacillus* spp. de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32 en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmune del sujeto.

34. El método de la reivindicación 33, en donde el vector para vacunas se administra por vía oral o por vía intranasal.

35. El método de la reivindicación 34, en donde la respuesta inmune es una respuesta con anticuerpos IgA hacia el polipéptido antigénico.

36. El método de cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, en donde el vector para vacunas no es capaz de replicarse en el sujeto.

37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, en donde el vector para vacunas se inactiva o se elimina antes de la administración al sujeto.

38. Un método para reducir la morbilidad relacionada con influenza A en un sujeto, que comprende administrar al sujeto el vector para vacunas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en una cantidad eficaz para reducir la morbilidad relacionada con influenza A.

39. Un método para reducir la morbilidad relacionada con influenza A en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un vector para vacunas contra *Bacillus* spp. de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32 en una cantidad eficaz para reducir la morbilidad relacionada con influenza A.

40. Un método para potenciar una respuesta inmune en un sujeto que comprende administrar al sujeto el vector para vacunas de la reivindicación 1 en una cantidad eficaz para potenciar la respuesta inmune del sujeto contra el polipéptido antigénico.

41. El método de la reivindicación 40, en donde el vector para vacunas se administra por vía oral o por vía intranasal.

42. El método de la reivindicación 41, en donde la respuesta inmune es una respuesta con anticuerpos IgA contra el polipéptido antigénico.

43. El método de la reivindicación 42, en donde el vector para vacunas no es capaz de replicarse en el sujeto.

VECTORES PARA VACUNAS Y MÉTODOS PARA POTENCIAR RESPUESTAS INMUNES

Resumen

Vectores para vacunas que incluyen un polipéptido antigénico y un polipéptido HMGB1 que están presentes sobre la superficie del vector para vacunas. Composiciones que comprenden los vectores para vacunas e incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable, convenientemente un vehículo para administración oral o nasal. Métodos para potenciar respuestas inmunes, en particular, una respuesta inmune de anticuerpos y convenientemente una respuesta a IgA, mediante la administración a un sujeto de los vectores para vacunas o composiciones que se exponen en la presente.

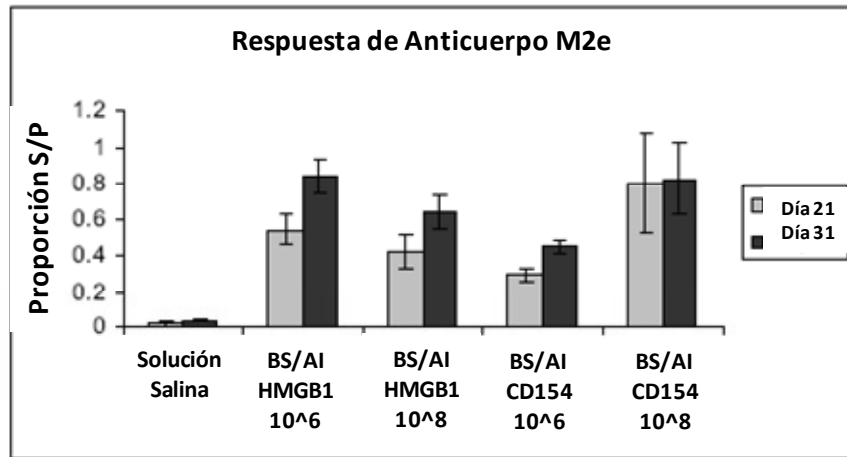


Fig. 1

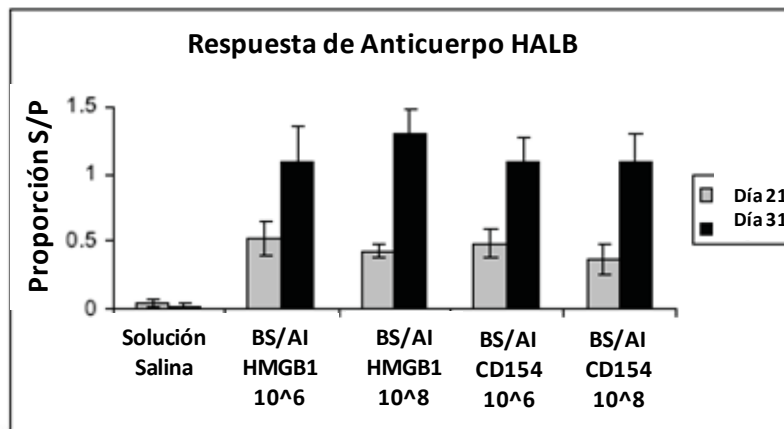


Fig. 2

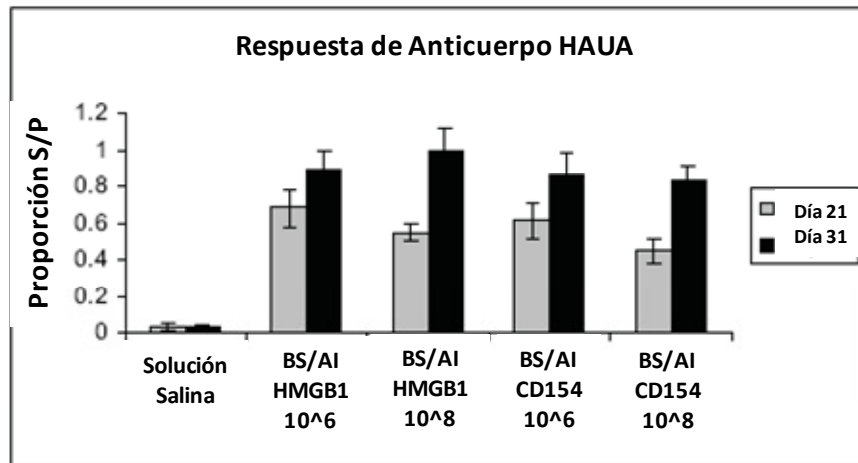


Fig.3

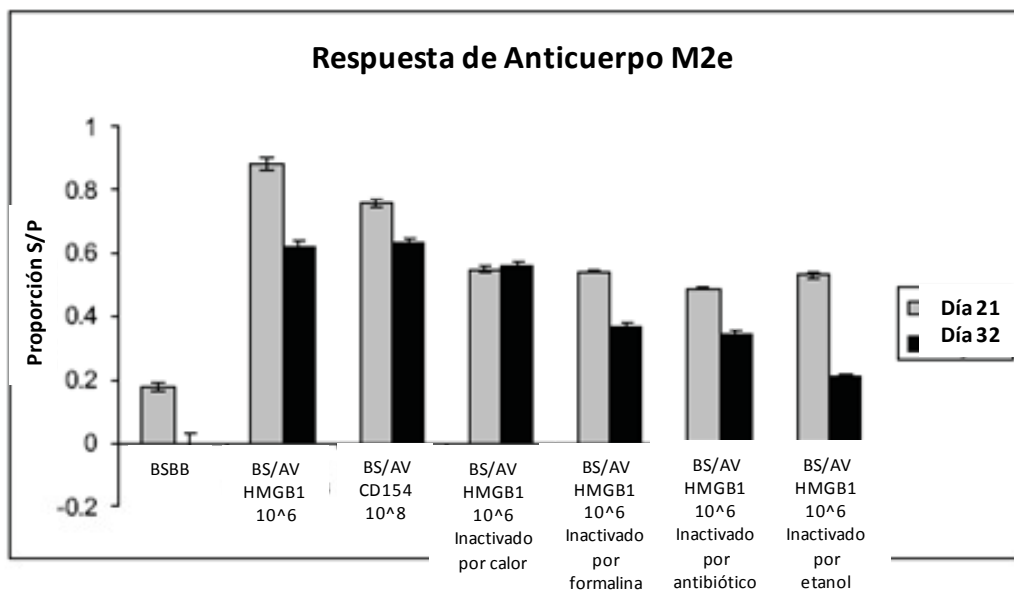


Fig.4

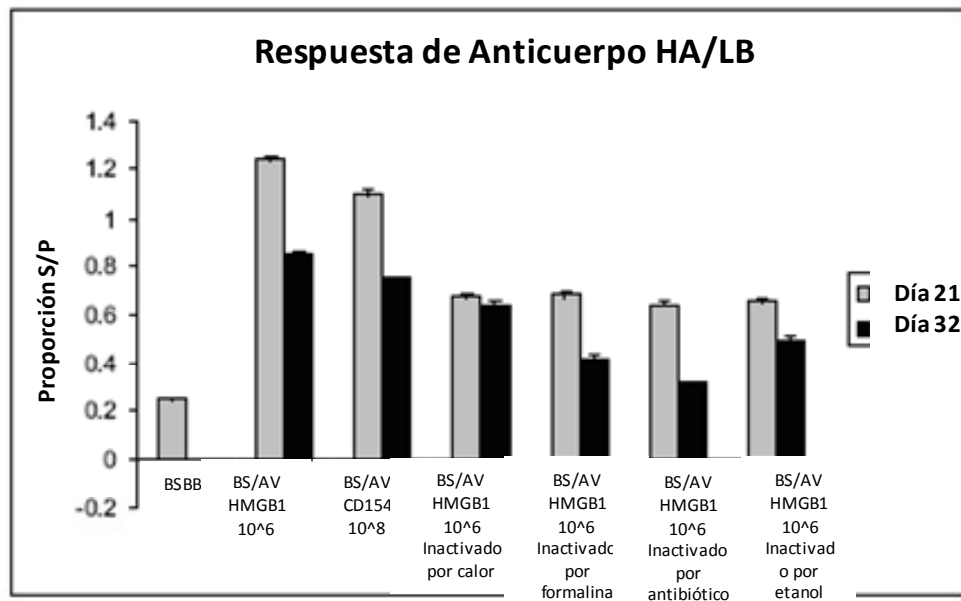


Fig. 5

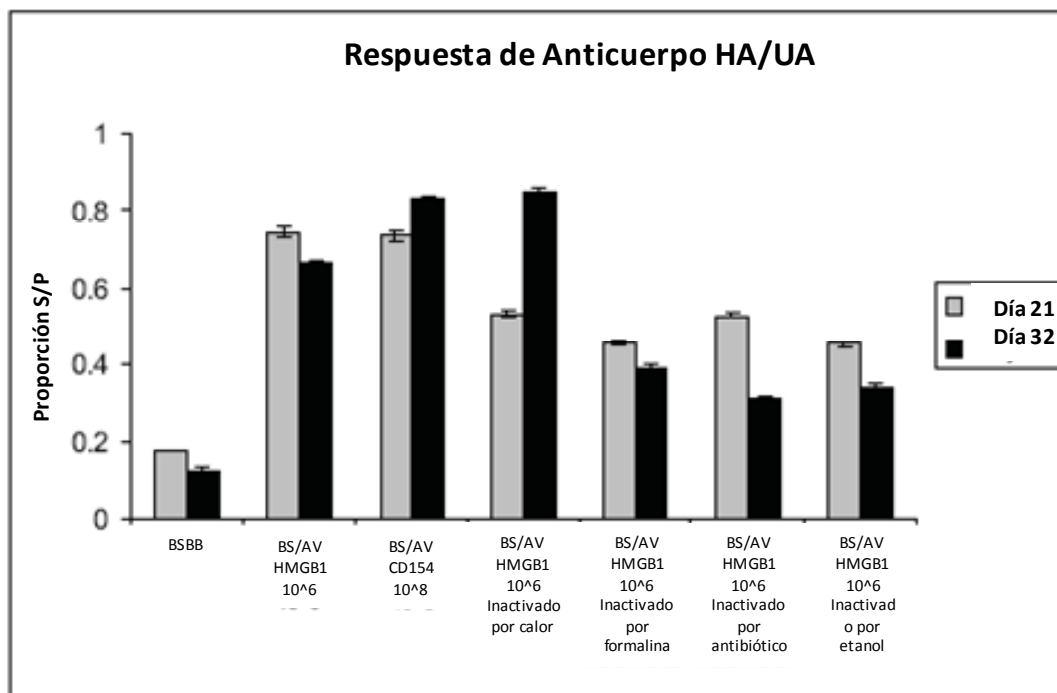


Fig. 6

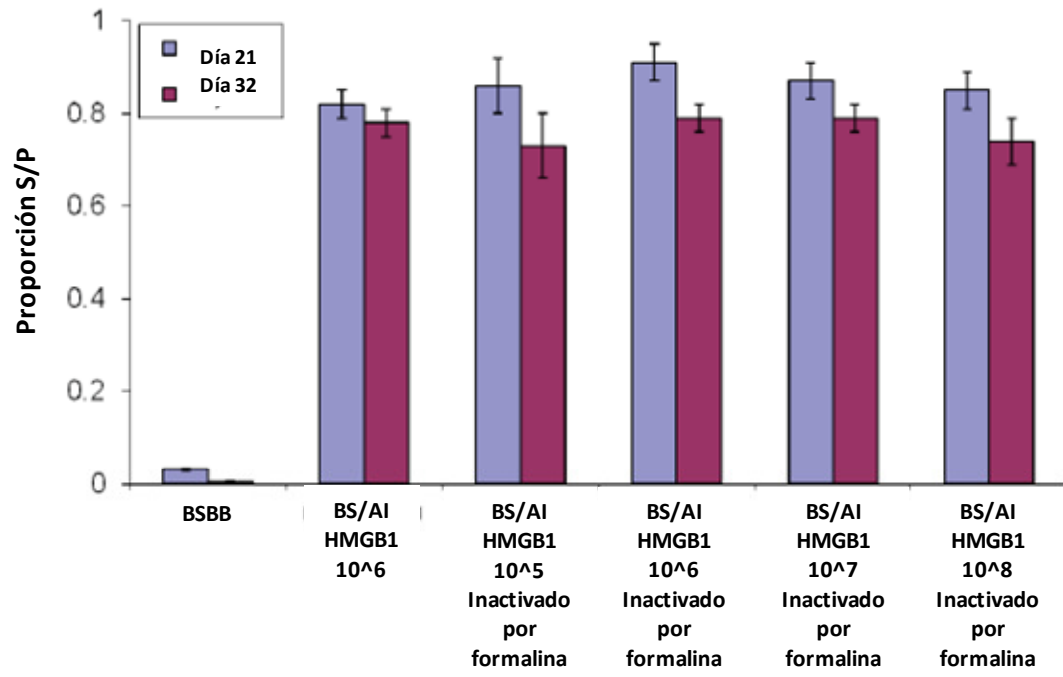


Fig.7

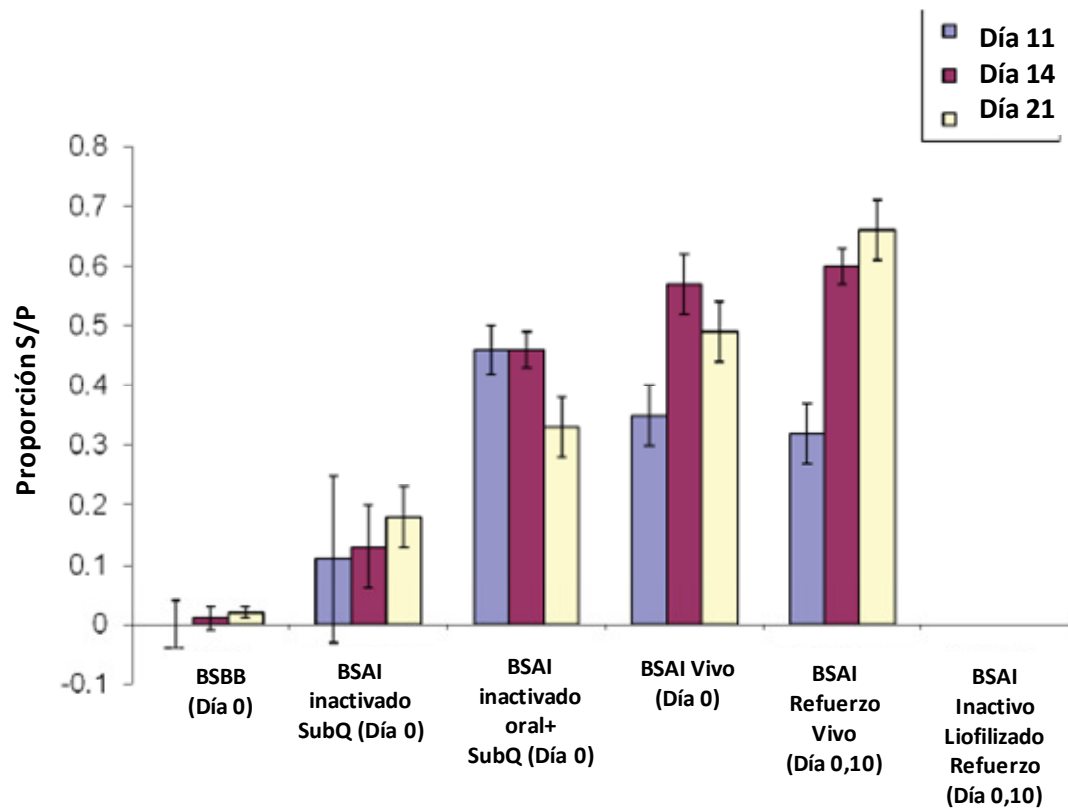


Fig. 8

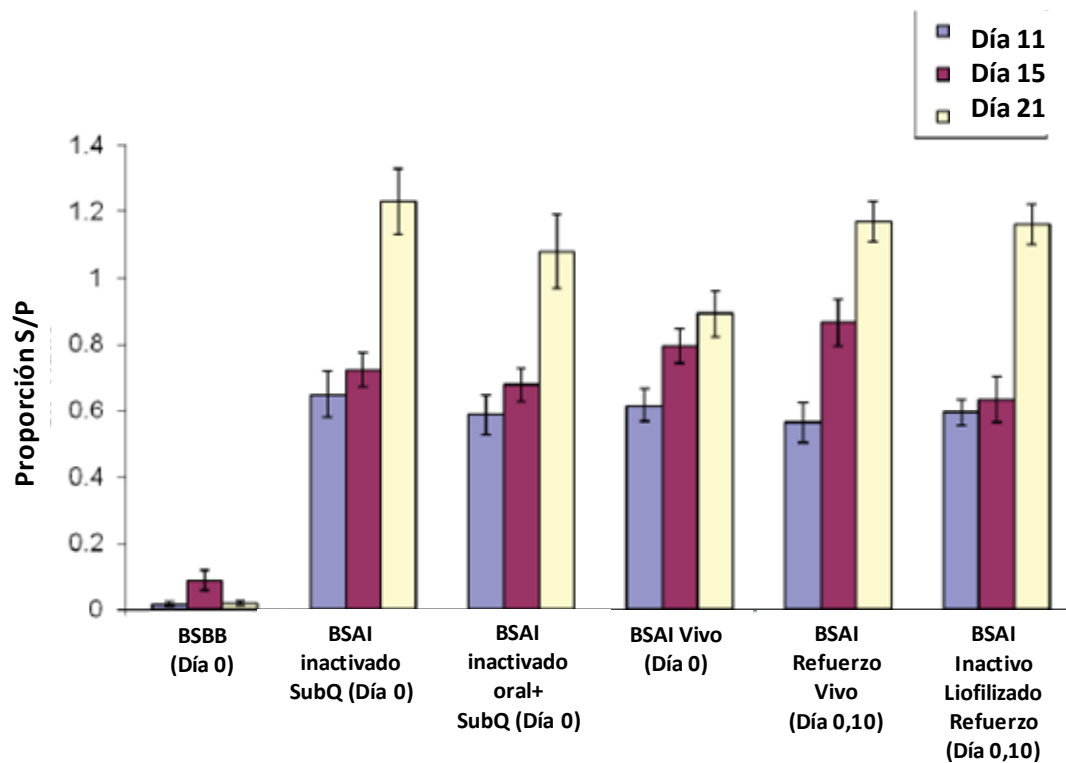


Fig.9

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITY OF ARKANSAS

THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM

<120> VACCINE VECTORS AND METHODS OF ENHANCING IMMUNE RESPONSES

<130> 5658-00099

<150> US 61/297,098

<151> 2010-01-21

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Avian influenza virus

<220>

<221> misc_feature

<223> M2e

<400> 1

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> Avian Influenza virus

<220>

<221> misc_feature

<223> M2e

<400> 2

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 3

<211> 24

<212> PRT

<213> Avian Influenza virus

<220>

<221> misc_feature

<223> M2e

<400> 3

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Avian Influenza virus

<220>

<221> misc_feature

<223> M2e

<400> 4

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Avian Influenza virus

<220>

<221> misc_feature

<223> M2e

<400> 5

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Avian Influenza virus

<220>

<221> misc_feature

<223> M2e

<400> 6

Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn

1 5

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Avian Influenza virus

<220>

<221> misc_feature

<223> HA5 UA

<400> 7

Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln

1 5 10

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> Avian Influenza virus

<220>

<221> misc_feature

<223> HA5 LB

<400> 8

Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr

1 5 10 15

Glu Glu Leu

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Avian Influenza virus

<220>

<221> misc_feature

<223> NP 54-69

<400> 9

Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser

1 5 10 15

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Avian Influenza virus

<220>

<221> misc_feature

<223> NP 147-160

<400> 10

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp

1 5 10

<210> 11

<211> 272

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<220>

<221> misc_feature

<223> CD154 chicken

<400> 11

Met Asn Glu Ala Tyr Ser Pro Ala Ala Pro Arg Pro Met Gly Ser Thr

1 5 10 15

Ser Pro Ser Thr Met Lys Met Phe Met Cys Phe Leu Ser Val Phe Met

20 25 30

Val Val Gln Thr Ile Gly Thr Val Leu Phe Cys Leu Tyr Leu His Met

35 40 45

Lys Met Asp Lys Met Glu Glu Val Leu Ser Leu Asn Glu Asp Tyr Ile

50 55 60

Phe Leu Arg Lys Val Gln Lys Cys Gln Thr Gly Glu Asp Gln Lys Ser

65 70 75 80

Thr Leu Leu Asp Cys Glu Lys Val Leu Lys Gly Phe Gln Asp Leu Gln

85 90 95

Cys Lys Asp Arg Thr Ala Ser Glu Glu Leu Pro Lys Phe Glu Met His

100 105 110

Arg Gly His Glu His Pro His Leu Lys Ser Arg Asn Glu Thr Ser Val

115 120 125

Ala Glu Glu Lys Arg Gln Pro Ile Ala Thr His Leu Ala Gly Val Lys

130 135 140

Ser Asn Thr Thr Val Arg Val Leu Lys Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala

145 150 155 160

Pro Thr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr His Glu Gly Lys Leu Lys Val Glu

165 170 175

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

180 185 190

Ala Ala Ala Ser Ala Pro Phe Thr Leu Tyr Ile Tyr Leu Tyr Leu Pro

195 200 205

Met Glu Glu Asp Arg Leu Leu Met Lys Gly Leu Asp Thr His Ser Thr

210

215

220

Ser Thr Ala Leu Cys Glu Leu Gln Ser Ile Arg Glu Gly Gly Val Phe

225

230

235

240

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

245

250

255

Ala Val Asn Val Asn Pro Gly Asn Thr Tyr Phe Gly Met Phe Lys Leu

260

265

270

<210> 12

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Human CD154

<400> 12

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

85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu

100

105

110

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

115

120

125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly

130

135

140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln

145

150

155

160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr

165

170

175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser

180

185

190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala

195

200

205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His

210

215

220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn

225

230

235

240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe

245

250

255

Gly Leu Leu Lys Leu

260

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Human CD154 peptide

<400> 13

Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Cys

1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<220>

<221> misc_feature

<223> Chicken CD154 peptide

<400> 14

Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Anas sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> Duck CD154 peptide

<400> 15

Trp Asn Lys Thr Ser Tyr Ala Pro Met Asn

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> Mouse CD154 peptide

<400> 16

Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys

1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> misc_feature

<223> Cow CD154 peptide

<400> 17

Trp Ala Pro Lys Gly Tyr Tyr Thr Leu Ser

1 5 10

<210> 18

<211> 190

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<220>

<221> misc_feature

<223> Chicken HMGB1 amino acid

<400> 18

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

<210> 19

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide: BS/AI/CD154 = HA/NP/M2e/cCD154: SSS serine
spacer

<400> 19

Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met

1 5 10 15

Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp

20 25 30

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn

35 40 45

Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser

50 55 60

Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr

65 70 75 80

Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser

85 90 95

Ser Ser Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser Ser Ser

100 105 110

<210> 20

<211> 302

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide: BS/AI/HMGB1 = HA/NP/M2e/HMGB1

<400> 20

Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met

1 5 10 15

Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp

20 25 30

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn

35 40 45

Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser

50 55 60

Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr

65 70 75 80

Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser

85 90 95

Ser Ser Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser Ser Ser Ser

100 105 110

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr

115 120 125

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro

130 135 140

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg

145 150 155 160

Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala

165 170 175

Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro

180 185 190

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys

195 200 205

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys

210 215 220

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys

225 230 235 240

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

245 250 255

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala

260 265 270

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala

275 280 285

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp

290 295 300

<210> 21

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide: BS/AI/CD154

<400> 21

Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met

1 5 10 15

Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp

20 25 30

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn

35 40 45

Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser

50 55 60

Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr

65 70 75 80

Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser

85

90

95

Ser Ser Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser Ser Ser

100

105

110

<210> 22

<211> 290

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide: BS/Al/HMGB1

<400> 22

Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met

1

5

10

15

Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp

20

25

30

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn

35 40 45

Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser

50 55 60

Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr

65 70 75 80

Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser

85 90 95

Ser Ser Ser Ser Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys

100 105 110

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

115 120 125

Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys

130 135 140

Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe

145 150 155 160

Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys

165 170 175

Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro

180 185 190

Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu

195 200 205

Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp

210 215 220

Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp

225 230 235 240

Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu

245

250

255

Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys

260

265

270

Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu

275

280

285

Glu Asp

290

<210> 23

<211> 85

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide: HMGB1 box a1

<400> 23

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr

1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro

20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg

35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala

50 55 60

Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro

65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr

85

<210> 24

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide: HMGB1 box a2

<400> 24

Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu

1 5 10 15

Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met

20 25 30

Ala Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val

35 40 45

Pro Pro Lys Gly Glu Thr

50

<210> 25

<211> 73

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide: HMGB1 box b1

<400> 25

Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe

1 5 10 15

Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu

50 55 60

Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr

65 70

<210> 26

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide: HMGB1 box b2

<400> 26

Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu

1 5 10 15

Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp

20 25 30

Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp

35 40 45

Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu

50 55 60

Lys Asp Ile Ala Ala

65

<210> 27

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide: HMGB1 RAGE Binding domain

<400> 27

Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe

1 5 10 15

Cys Ser Glu Phe Arg

20

<210> 28

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic peptide: HMGB1 proinflammatory cytokine activity

<400> 28

Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly

1 5 10 15

Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser Lys

20 25 30

Lys

<210> 29

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> HMGB1

<400> 29

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr

1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro

20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg

35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala

50 55 60

Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro

65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys

85

90

95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys

100

105

110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys

115

120

125

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

130

135

140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala

145

150

155

160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val

165

170

175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu

180 185 190

Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu

195 200 205

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu

210 215

<210> 30

<211> 205

<212> PRT

<213> Danio rerio

<220>

<221> misc_feature

<223> Zebra fish HMGB1

<400> 30

Met Gly Lys Asp Pro Thr Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala

1 5 10 15

Tyr Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Glu

20 25 30

Ala Thr Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp

35 40 45

Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys

50 55 60

Leu Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Asn Tyr Ile Pro Pro

65 70 75 80

Lys Gly Glu Lys Lys Lys Arg Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg

85 90 95

Pro Pro Ser Ala Phe Phe Ile Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Val

100 105 110

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

115 120 125

Gly Glu Met Trp Asn Lys Ile Ser Ser Glu Glu Lys Gln Pro Tyr Glu

130 135 140

Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala

145 150 155 160

Tyr Arg Ser Lys Gly Lys Val Gly Gly Gly Ala Ala Lys Ala Pro Ser

165 170 175

Lys Pro Asp Lys Ala Asn Asp Glu Asp Glu Asp Asp Asp Glu Glu Glu

180 185 190

Asp Glu Asp Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Asp Asp Glu

195 200 205

<210> 31

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer: mazF for - MazF gene

<400> 31

ctaaaatctt cagatgatca atcatcctca ctgcccgctt tccagtcggg aaa 53

<210> 32

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer: mazF rev - MazF gene

<400> 32

tgaacgtgac gaacgaccag atttccccct atgcaagggt ttat 44

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer: CotB up for - Cot B up

<400> 33

gaaatgctcg atgctgatga 20

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer: Cot B up rev - Cot B up

<400> 34

ggatgattga tcatctgaag attttag 27

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer: Cot B dn for - Cot B down

<400> 35

aaatctggtc gttcgtcacg ttca

24

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer: Cot B dn rev - Cot B down

<400> 36

ttacgtttcc agtgatagtc tatcg

25

<210> 37

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer: BS/AI/HMGB1 for - BS/AI/HMGB1 CotB up

<400> 37

aaccattctt tcaattgtaa ttgaattttg aatcagtctg cctgatgatg acagttcttc 60

ataatcatta aaatcgcccg gatagcacag atcatttgcc ggatttgctg atgatgaatc 120

catgcctggt ctaaccagtg ctcttggtct ttgatatgtg gatgattgat catctgaaga 180

ttttag 186

<210> 38

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer: BS/AI/HMGB1 rev - BS/AI/HMGB1 CotB down

<400> 38

ttacaattga aagaatgggt ctgtcatcat catcactgct gtcaagaatt aatcattttg 60

aaaaaattca atcatcatca gaagttgaaa caccgattag aaattcatca tcatggatga 120

caacatcata tgcaccgaca tcatcatcat cagaagttga aacaccgatt agaaataaat 180

ctggtcgttc gtcacgttca 200

<210> 39

<211> 177

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer: BS/AI/CD154 for - BS/AI/CD154 CotB up

<400> 39

ttcaaatga ttaattcttg acagcagtga tgatgatgac agaaccattc tttcaattgt 60

aattgaattt tgaatcagtc tgcctgatga tgacagttct tcataatcat taaaatcgcc 120

cggatagcac agatcatttg ccggatttgc ggatgattga tcatctgaag attttag 177

<210> 40

<211> 194

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer: BS/AI/CD154 rev - BS/AI/CD154 CotB down

<400> 40

caagaattaa tcattttgaa aaaattcaat catcatcaga agttgaaaca ccgattagaa 60

attcatcatc actgaaagaa aaatatgaaa aagatattgc agcatataga gcaaaaggca 120

aagttgatgc aggcaaaaaa gttgttgcaa aagcagaaaa atcaaaaaaa aaatctggtc 180

gttcgtcacg ttca

194

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> VECTORES PARA VACUNAS Y MÉTODOS PARA POTENCIAR RESPUESTAS INMUNES

<130> 5658-00099

<150> US 61/297,098
<151> 2010-01-21

<160> 40

<170> Patente versión 3.5

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

<220>
<221> característica miscelánea
<223> M2e

<400> 1

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

Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
 20

<210> 2
<211> 24
<212> PRT
<213> Virus de influenza aviar

<220>
<221> característica miscelánea
<223> M2e

<400> 2

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

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
 20

<210> 3
<211> 24
<212> PRT
<213> Virus de influenza aviar

<220>
<221> característica miscelánea
<223> M2e

<400> 3

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

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 4
<211> 24
<212> PRT
<213> Virus de influenza aviar

<220>
<221> característica miscelánea
<223> M2e

<400> 4

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

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Virus de influenza aviar

<220>
<221> característica miscelánea
<223> M2e

<400> 5

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn
1 5

- <210> 6
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Virus de influenza aviar

- <220>
- <221> característica miscelánea
- <223> M2e

<400> 6

Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn
1 5

- <210> 7
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Virus de influenza aviar

- <220>
- <221> característica miscelánea
- <223> HA5 UA

<400> 7

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

- <210> 8
- <211> 19
- <212> PRT
- <213> Virus de influenza aviar

- <220>
- <221> característica miscelánea
- <223> HA5 LB

<400> 8

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

Glu Glu Leu

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Virus de influenza aviar

<220>
<221> característica miscelánea
<223> NP 54-69

<400> 9

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

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> Virus de influenza aviar

<220>
<221> característica miscelánea
<223> NP 147-160

<400> 10

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

<210> 11
<211> 272
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<220>
<221> característica miscelánea
<223> CD154 de pollo

<400> 11

Met Asn Glu Ala Tyr Ser Pro Ala Ala Pro Arg Pro Met Gly Ser Thr
1 5 10 15

Ser Pro Ser Thr Met Lys Met Phe Met Cys Phe Leu Ser Val Phe Met
20 25 30

Val Val Gln Thr Ile Gly Thr Val Leu Phe Cys Leu Tyr Leu His Met
35 40 45

Lys Met Asp Lys Met Glu Glu Val Leu Ser Leu Asn Glu Asp Tyr Ile
50 55 60

Phe Leu Arg Lys Val Gln Lys Cys Gln Thr Gly Glu Asp Gln Lys Ser
65 70 75 80

Thr Leu Leu Asp Cys Glu Lys Val Leu Lys Gly Phe Gln Asp Leu Gln
85 90 95

Cys Lys Asp Arg Thr Ala Ser Glu Glu Leu Pro Lys Phe Glu Met His
100 105 110

Arg Gly His Glu His Pro His Leu Lys Ser Arg Asn Glu Thr Ser Val
115 120 125

Ala Glu Glu Lys Arg Gln Pro Ile Ala Thr His Leu Ala Gly Val Lys
130 135 140
Ser Asn Thr Thr Val Arg Val Leu Lys Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala
145 150 155 160

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

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

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

Met Glu Glu Asp Arg Leu Leu Met Lys Gly Leu Asp Thr His Ser Thr
210 215 220

Ser Thr Ala Leu Cys Glu Leu Gln Ser Ile Arg Glu Gly Gly Val Phe
225 230 235 240

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

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

<210> 12
<211> 261
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> característica miscelánea
<223> CD154 humana

<400> 12

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
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240
Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> característica miscelánea
<223> péptido CD154 humano

<400> 13

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

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<220>
<221> característica miscelánea
<223> péptido CD154 de pollo

<400> 14

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

<210> 15

<211> 10
<212> PRT
<213> Anas sp.

<220>
<221> característica miscelánea
<223> péptido CD154 de pato

<400> 15

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

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

<220>
<221> característica miscelánea
<223> péptido CD154 de ratón

<400> 16

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

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>
<221> característica miscelánea
<223> péptido CD154 de vaca

<400> 17

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

<210> 18
<211> 190
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<220>
<221> característica miscelánea
<223> aminoácidos de HMGB1 de pollo

<400> 18

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

<210> 19
<211> 111
<212> PRT

<213> Secuencia articial

<220>

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

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20
<211> 302
<212> PRT
<213> Secuencia articial

<220>

<223> Péptido sintético: BS/AI/HMGB1 = HA/NP/M2e/HMGB1

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
115 120 125

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
130 135 140

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala
275 280 285
Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp
290 295 300

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

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

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22

<211> 290
<212> PRT
<213> Secuencia articial

<220>
<223> Péptido sintético: BS/AI/HMGB1

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asp
290

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

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

<400> 23

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

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

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

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

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

Pro Lys Gly Glu Thr
85

<210> 24
<211> 54
<212> PRT
<213> Secuencia articial

<220>
<223> Péptido sintético: caja HMGB1 a2

<400> 24

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

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

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

Pro Pro Lys Gly Glu Thr
50

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

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

<400> 25

Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe
1 5 10 15
Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser
20 25 30

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

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

Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr
65 70

<210> 26
<211> 69
<212> PRT
<213> Secuencia articial

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

<400> 26

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

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

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

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

Lys Asp Ile Ala Ala
65

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

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

<400> 27

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

Cys Ser Glu Phe Arg
20

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

<220>
<223> Péptido sintético: actividad de sitoquina proinflamatoria de HMGB1

<400> 28

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

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

Lys

<210> 29
<211> 215
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> característica miscelánea
<223> HMGB1

<400> 29

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

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
20 25 30
Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
210 215

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

<220>
<221> característica miscelánea
<223> HMGB1 de Pez zebra

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 31
- <211> 53
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>

<223> Cebador sintético: mazF directo - gen MazF

<400> 31
ctaaaatctt cagatgatca atcatcctca ctgcccgtt tccagtcggg aaa 53

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

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

<400> 32
tgaacgtgac gaacgaccag atttcccct atgcaagggt ttat 44

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

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

<400> 33
gaaatgctcg atgctgatga 20

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

<220>
<223> Cebador sintético: Cot B arriba reverso - Cot B arriba

<400> 34
ggatgattga tcactgaag attttag 27

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

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

<400> 35
aaatctggtc gttcgtcacg ttca 24

<210> 36

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

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

<400> 36
ttacgtttcc agtgatagtc tatcg 25

<210> 37
<211> 186
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético: BS/AI/HMGB1 directo - BS/AI/HMGB1 CotB arriba

<400> 37
aaccattctt tcaattgtaa ttgaattttg aatcagtctg cctgatgatg acagttcttc 60

ataatcatta aaatcgcccg gatagcacag atcatttgcc ggatttgctg atgatgaatc 120

catgcctggt ctaaccagtg ctcttggtct ttgatatgtg gatgattgat catctgaaga 180

ttttag 186

<210> 38
<211> 200
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético: BS/AI/HMGB1 reverso - BS/AI/HMGB1 CotB abajo

<400> 38
ttacaattga aagaatggtt ctgtcatcat catcactgct gtcaagaatt aatcattttg 60

aaaaaattca atcatcatca gaagttgaaa caccgattag aaattcatca tcatggatga 120

caacatcata tgcaccgaca tcatcatcat cagaagttga aacaccgatt agaaataaat 180

ctggtcgttc gtcacgttca 200

<210> 39
<211> 177
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético: BS/AI/CD154 directo - BS/AI/CD154 CotB arriba

<400> 39

ttcaaaatga ttaattcttg acagcagtga tgatgatgac agaaccattc ttcaattgt 60

aattgaattt tgaatcagtc tgcctgatga tgacagttct tcataatcat taaaatcgcc 120

cggatagcac agatcatttg ccggatttgc ggatgattga tcatctgaag attttag 177

<210> 40

<211> 194

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético: BS/AI/CD154 reverso - BS/AI/CD154 CotB abajo

<400> 40

caagaattaa tcattttgaa aaaattcaat catcatcaga agttgaaaca ccgattagaa 60

attcatcatc actgaaagaa aaatatgaaa aagatattgc agcatataga gcaaaaggca 120

aagttgatgc aggcaaaaaa gttgttgcaa aagcagaaaa atcaaaaaaa aaatctggtc 180

gttcgtcacg ttca 194

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 5658-00099	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 11/22062	International filing date (<i>day/month/year</i>) 21 January 2011 (21.01.2011)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 21 January 2010 (21.01.2010)
Applicant THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed.

☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/22062

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)



on paper



in electronic form

b. (time)



in the international application as filed



together with the international application in electronic form



subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/22062

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 8-24, 31-39
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/22062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/145 (2011.01)

USPC - 424/210.1, 209.1, 281.1

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8) - A61K 39/145 (2011.01)

USPC - 424/210.1, 209.1, 281.1

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

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

PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB), Google Scholar, Thomson Innovation

Search terms: vaccine, vector, HMGB1, high-mobility group protein B1, amphoterin, influenza, M2e, HA, NP, plasmid, Bacillus, cotB, IgA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2003/0165538 A1 (GOLDMAN et al.) 4 September 2003 (04.09.2003) para [0009], [0029], [0048], [0090], [0093], [0180].	25-28 ----- 29-30
X --- Y	US 2008/0305120 A1 (MESSMER et al.) 11 December 2008 (11.12.2008) para [0011]-[0012], [0018], [0021], [0049], [0071], [0103], [0105], [0108]; SEQ ID NO:1.	1-3, 6, 40-43 ----- 4, 5, 7
Y	WO 2008/036675 A2 (BOTTJE et al.) 27 May 2008 (27.05.2008) p 2, ln 3-6 ; Claim 8; SEQ ID NO:1.	4, 29
Y	US 2008/0069821 A1 (YANG et al.) 20 March 2008 (20.03.2008) para [0006]; SEQ ID NO:13.	5, 30
Y	US 2008/0004207 A1 (TSUNG et al.) 3 January 2008 (03.01.2008) para [0027], [0039]; Claim 11; SEQ ID NO: 37.	7
A	ROVERE-QUERINI et al., HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. EMBO Rep, August 2004, Vol 5, No 8, pp 825-830. Entire document	1, 6, 7

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 March 2011 (17.03.2011)

Date of mailing of the international search report

29 MAR 2011

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

**TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES**

PCT

Informe de Búsqueda Internacional

(Artículo PCT 18, así como reglas PCT 43 y 44)

Referencia del solicitante o del agente 5658-00099	PROCEDER Ver notificación formulario PCT/ISA/220, así como, en tanto corresponda, el punto 5.abajo	
Solicitud Internacional N°: PCT/US 2011/022062	Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) 21 de enero de 2011 (21.01.2011)	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año) 21 de enero de 2010 (21.01.2010)
Solicitante THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS		

Este Informe de Búsqueda Internacional fue elaborado por el Organismo de Búsqueda Internacional y, de acuerdo con el artículo 18, es enviado al solicitante. Se envía una copia a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda Internacional comprende, en total, 4 hojas.

☐ Además se adjunta una copia de cada uno de los documentos del estado de la técnica mencionados en este informe

1. Fundamentos del Informe

a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional fue llevada a cabo sobre la base de:

- ☒ la solicitud internacional en el idioma en que fue presentada
☐ una traducción de la solicitud internacional al _____, que es el idioma de una traducción suministrada a los fines de la búsqueda internacional (reglas 12.3(a) y 23.1 (b)).

b. ☐ Este informe de búsqueda internacional ha sido confeccionado teniendo en consideración la **rectificación de un error obvio**, autorizada por o notificada a este organismo según la regla 91 (regla 43.6bis(b))

c. ☒ Con respecto a los **nucleótidos y/o aminoácidos** revelados en la solicitud internacional, ver campo N° 1

2. ☒ **Determinadas reivindicaciones no eran investigables** (ver campo II).

3. ☐ **La invención carece de unidad** (ver campo III).

4. Con respecto al **título**,

- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por el organismo como sigue:

5. Con respecto al **resumen**,

- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por el organismo, de acuerdo con la regla 38.2 b), en la versión indicada en el campo IV. El solicitante puede presentar una posición ante el organismo durante el transcurso de un mes a partir de la fecha de envío de este Informe de Búsqueda Internacional.

6. Con respecto a las **ilustraciones**

a. Con el resumen se debe publicar la siguiente figura de Las **ilustraciones**: figura N° ~~1~~.

- ☒ sugerida por el solicitante.
☐ seleccionada por el organismo, dado que el mismo solicitante no sugiere ninguna figura.
☐ seleccionada por el organismo, dado que esta figura caracteriza mejor la invención.

b. ☐ con el resumen no se publica ninguna de las ilustraciones

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/US 2011/022062

Campo I: Secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos (continuación del ítem 1.b de la hoja 1)

- 1- Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la solicitud internacional y necesarios para la invención reivindicada, la búsqueda internacional fue llevada a cabo basada sobre:
- a. (medios)
- ☒ en papel
☒ en forma electrónica
- b. (Momento)
- ☒ contenido en la solicitud internacional tal como fue presentada
☒ presentado con la solicitud internacional en forma electrónica
☐ suministrado posteriormente a los propósitos de la búsqueda
2. ☐ Adicionalmente, en caso de que fueran presentadas o suministradas más de una versión o copia del listado de secuencia y/o tabla relacionada a éste, se suministra la declaración requerida de que la información incluida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella incluida en la solicitud tal como fue presentada o no supera la solicitud tal como fue presentada, lo que sea apropiado.
3. Comentarios adicionales

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/US 2011/022062

Campo II: Observaciones acerca de porque determinadas reivindicaciones no eran investigables (continuación del ítem 2 de la hoja 1)

Este Informe de Búsqueda Internacional no fue realizado con respecto a algunas reivindicaciones, según el artículo 17(2)(a), por las siguientes razones:

1. ☐ Reivindicaciones N°:
porque se refieren a objetos que no requieren ser investigados por este Organismo, a saber:
2. ☐ Reivindicaciones N°:
porque se refieren a partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos prescritos en una extensión que no permite llevar a cabo una búsqueda internacional, específicamente:
3. ☒ Reivindicaciones N°: 8-24, 31-39
porque son reivindicaciones dependientes y no están desarrolladas en acordanza con la segunda y la tercera frase de la regla 6.4(a).

Campo III: Observaciones por falta de uniformidad de la invención (continuación del ítem 3 de la hoja 1)

Este Organismo de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Como todas las tasas adicionales requeridas fueron abonadas en término por el solicitante, este Informe de Búsqueda Internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Como todas las reivindicaciones investigables pueden ser investigadas sin un esfuerzo que justifique una tasa adicional, este Organismo no solicita ningún pago o tasa adicional.
3. ☐ Como solo algunas de las tasas adicionales fueron abonadas en término por el solicitante, este Informe de Búsqueda Internacional cubre solo aquellas reivindicaciones para los cuales fueron abonadas las tasas, específicamente, las reivindicaciones N°:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas fue abonada en término por el solicitante. En consecuencia, este Informe de Búsqueda Internacional está restringido a la invención mencionada inicialmente en las reivindicaciones; la misma está cubierta por las reivindicaciones N°:

Observaciones sobre protestas

- ☐ Las tasas adicionales fueron acompañadas por la protesta del solicitante
- ☐ Las tasas adicionales no fueron acompañadas por ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°:

PCT/US 2011/022062

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD IPC(8) – A61K 39/145 (2011.01) USPC – 424/210.1.209.1.281.1		
Según la clasificación internacional de patentes (IPC) o las clasificaciones nacional e IPC		
B. ÁMBITOS INVESTIGADOS		
Documentación mínima investigada (Sistema de clasificación y símbolos de clasificación) IPC(8) – A61K 39/145 (2011.01) USPC – 424/210.1.209.1.281.1		
Publicaciones investigadas pero no pertenecientes al material mínimo investigado, en tanto pertenezcan al ámbito investigado		
Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y expresiones de búsqueda eventualmente empleadas) PubWEST(USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Scholar, Thomson Innovation Términos de búsqueda: vacuna, vector, HMGB1, high-mobility group protein B1, anfoterina, gripe, M2a, HA, NP, plásmido, bacilo, cotB, IgA		
C. ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser apropiado, indicación de los pasajes relevantes	Relevante para reivindicación N°:
X	US 2003/0165538 A1 (GOLDMAN et al) 4 de septiembre de 2003	25-28
----	(04.09.2003) párrafos [0009], [0029], [0048], [0090], [0093], [0180]	----
Y		29-30

X	US 2008/0305120 A1 (MESSMER et al) 11 de diciembre de 2008	1-3, 6, 40-43
----	(11.12.2008) párrafos [0011]-[0012], [0018], [0021], [0049], [0071],	----
Y	[0103], [0105], [0108]; SEQ ID N°: 1	4, 5, 7

Y	WO 2008/036675 A2 (BOTTJE et al) 27 de mayo de 2008	4-29
	(27/05/2008) p. 2, r. 3-6; reiv. 8; SEQ ID N°: 1	

Y	US 2008/0069821 A1 (YANG et al) 20 de marzo de 2008 (20.03.2008)	5-30
	) párrafo [0006];,; SEQ ID N°: 13	

Y	US 2008/0004207 A1 (TSUNG et al) 3 de enero de 2008	7
	(03.01.2008) párrafos [0027], [0039]; reiv. 11; SEQ ID N°: 37	

A	ROVERE-QUERINI et al: HMGB1 is an endogenous immune	1, 6, 7
	adjuvant released by necrotic cells. EMBO Rep, August 2004, vol. 5,	
	N°8, pp. 825-810. Todo el documento	

☐ Otras publicaciones están listadas en la continuación del campo C		
☐ Ver familia de patentes en el anexo		
* Categorías particulares indicadas en publicaciones “A” publicación que define el estado general de la técnica pero no considerada como particularmente importante “B” documento anterior pero publicado recién o después de la de la fecha de presentación internacional “L” publicación adecuada para hacer aparecer como dudosa una reivindicación de prioridad, o mediante la cual debe ser considerada la fecha de divulgación de otra publicación mencionada en el informe de búsqueda o que es indicada por otra razón particular (como realizada) “O” publicación que se refiere a una revelación oral, a una utilización, a una exposición o a otras disposiciones “P” publicación realizada antes de la fecha de presentación internacional pero luego de la fecha de prioridad reivindicada		
“T” publicaciones posteriores a las difundidas en la fecha de presentación internacional o de la fecha de prioridad y que no colisionan con la solicitud, sino que solo están indicadas para mayor entendimiento del principio fundamental de la invención o de la teoría sobre la cual se basa “X” publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada, solo como consecuencia de esta publicación, como novedosa o apoyarse en una actividad inventiva “Y” publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada como apoyada en una actividad inventiva cuando puede ser relacionada con una o varias otras publicaciones de esta categoría y tal relación es notoria para un especialista “&” publicación que es miembro de la misma familia		
Fecha de finalización de la búsqueda internacional 17 de marzo de 2011 (17.03.2011)		Fecha de envío del Informe de Búsqueda Internacional 29 MAR 2011 (sellado)
Nombre y Dirección Postal del ISA/ Mail Stop PCT, Attn. ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Fax: 571-273-3201		Funcionario Apoderado Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 Teléfono N°: PCT OSP: 571-272-7774