

Alexander Agudelo
Carlos A. Parra
Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Mónica Guevara
Andrés Alvarado
Ella Ponce
Liliana Galindo
María Clara Calderón
Mauricio Ávila
José Jairo Dangond
Gina Cáceres
Isabella Herrera
Zaava Ravid
Miguel Felipe Porras
Catalina Amaya
Laura M. Escobar

Medellín

María Clara Múnera
Eddie Manotas
Adrián Santamaría

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente N°. 13-003.443

Solicitud de Patente de Invención titulada: "VACUNA Y MÉTODOS PARA REDUCIR UNA INFECCIÓN POR CAMPYLOBACTER "

Solicitante: THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS.

Nuestra Ref: P2013/000010

MEMORIAL DE ALCANCE

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad en referencia, me permito aportar un CD con la traducción al español del capítulo descriptivo y dibujos.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE
CC. No. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Adjunto: Lo enunciado.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-003443- -00006-0000

Fecha: 2014-01-24 17:05:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 1

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS		
Dependencia: 2020	Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD 2014	Recorrido:	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicator:	Planilla:		

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
(RELACIÓN DE ANEXOS)

Dependencia:

2020

Fecha:

AAAA

MM

DD

2014

Recorrido:

Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador:

Planilla:

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD X
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

Atxon

[Handwritten signature]

VACUNA Y MÉTODOS PARA REDUCIR UNA INFECCIÓN POR *CAMPYLOBACTER***REFERENCIA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS**

[0001] Esta solicitud de patente invoca prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EE.UU. N° 61/353039, presentada el 9 de junio de 2010, que se incorpora a la presente a modo de referencia.

DECLARACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO CON SUBSIDIO FEDERAL

[0002] Esta invención se realizó con apoyo gubernamental bajo el Contrato N° 208-35-201-04-683, otorgado por USDA/NRI. El gobierno de los Estados Unidos tiene algunos derechos sobre la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

A esta solicitud se adjunta un Listado de Secuencias que se incorpora a la presente en su totalidad a modo de referencia. El Listado de Secuencias se presentó en formato de archivo de texto, conjuntamente con la solicitud, el 9 de junio de 2011.

ANTECEDENTES

El repertorio de vacunas seguras y efectivas en cuanto al costo para la generación de inmunidad de mucosas contra una variedad de agentes es limitado. La principal causa bacteriana de enfermedades gastrointestinales humanas en todo el mundo es *Campylobacter*. La gastroenteritis bacteriana continúa representando una amenaza significativa para la población general en los EE.UU. y en otros países en el futuro próximo. Las infecciones por *Campylobacter jejuni* se observan con mayor frecuencia que las infecciones más conocidas debidas a especies de *Salmonella* o *Escherichia coli* 0157:H7. La carga real de enfermedad de gastroenteritis por *Campylobacter* en todo el país es de 500-850 infecciones/100.000 personas por año.

No sólo es *Campylobacter* la principal causa de gastroenteritis bacteriana, sino que se ha asociado *C. jejuni* con la enfermedad neuropatológicas, el síndrome de Guillain-Barré (GBS). Esta enfermedad amenazante para la vida puede ser una respuesta inmune a estructuras tipo gangliósido con determinadas cepas de *C. jejuni* que conducen a una respuesta autoinmune contra las células nerviosas. Aunque el GBS es la secuela crónica más importante, una infección por *Campylobacter* también está asociada con artritis reactiva, que puede progresar en el síndrome de Reiter.

La vacunación contra *Campylobacter* tiene un éxito limitado cuando se usan vacunas de células completas muertas o vacunas basadas en proteínas. Además, existe el problema del desarrollo del síndrome de Guillain-Barré u otra secuela de una vacunación de células completas. Una vacuna exitosa deberá ser efectiva en cuanto al costo, segura, eficaz con una administración por vía oral y permitir la producción de grandes cantidades en un período de tiempo muy corto. Actualmente no existe una vacuna que ofrezca estas opciones.

RESUMEN DE LA INVENCION

En la presente se proveen vectores y métodos para mejorar la resistencia a una infección por *Campylobacter* o para mejorar la respuesta inmune a *Campylobacter*.

En un aspecto, se proveen vectores que incluyen una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido antigénico no asociado en estado nativo con el vector. El polipéptido antigénico puede ser la SEQ ID N°: 7 (cjaD; cj0113; GVSITVEGNCDEWGTDEYNQA), la SEQ ID N°: 8 (cjaA; cj0982; KDIVLDAEIGGVAKGKDGKEK) o la SEQ ID N°: 9 (ACE 393; cj0420;

KVALGVAVPKDSNITSVEDLKDKTLLLNKGTTADA) o un fragmento del mismo. El vector también puede incluir un polipéptido inmunoestimulante no asociado en estado nativo con el vector. El vector de vacuna tiene la capacidad de generar una respuesta inmune en un sujeto vacunado que incluye una respuesta de anticuerpo IgA contra *Campylobacter*. La respuesta puede ser protectora contra una prueba con *Campylobacter*.

En otro aspecto, se proveen vectores que incluyen una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido antigénico no asociado en estado nativo con el vector y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido inmunoestimulante. Los polipéptidos antigénicos pueden ser un fragmento de la SEQ ID N°: 1 (cjaD), la SEQ ID N°: 2 (cjaA) o la SEQ ID N°: 3 (ACE393). El vector de vacuna tiene la capacidad de generar una respuesta inmune en un sujeto vacunado que incluye una respuesta de anticuerpo IgA contra *Campylobacter*. La respuesta puede ser protectora contra una prueba con *Campylobacter*.

En aún otro aspecto, se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden los vectores provistos en la presente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En aún otro aspecto, se proveen métodos para mejorar una respuesta inmune dirigida contra *Campylobacter* en un sujeto. Los métodos incluyen administrar una cantidad efectiva de los vectores provistos en la presente a un sujeto. En una forma de realización, la respuesta inmune mejorada incluye una respuesta de anticuerpo IgA y la respuesta puede ser protectora.

En aún otro aspecto, se proveen en la presente métodos para mejorar la resistencia a una infección por *Campylobacter*. Los

métodos incluyen administrar una cantidad efectiva de los vectores divulgados en la presente al sujeto de manera tal que el sujeto será resistente a una infección después de una subsiguiente exposición a *Campylobacter*. En una forma de realización, la respuesta inmune mejorada incluye una respuesta de anticuerpo IgA y la respuesta puede ser protectora.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un gráfico que muestra la curva estándar para una PCR cuantitativa que muestra la cantidad de *Campylobacter jejuni* cultivable sobre el eje x determinada mediante cultivo convencional y determinación de las unidades formadoras de colonias (CFU). Sobre el eje y se muestra la cantidad de ciclos en los cuales la fluorescencia cruzó el umbral en la PCR cuantitativa.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el log de cfu/g de contenido en íleo en polluelos vacunados con salina, o vectores de *Salmonella* que expresan los péptidos de *Campylobacter* cj0420 (SEQ ID N°: 9), cj0113 (SEQ ID N°: 7) o cj0982 (SEQ ID N°: 8) (10^8 cfu/polluelo), 11 días después de la prueba con *C. jejuni* (5×10^7 cfu/ml). La PCR cuantitativa se realiza con ADN total extraído mediante métodos convencionales del revestimiento mucoso del íleo. Los resultados se presentan como la media $\pm$ SEM (n = 10). Los grupos con letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

La Figura 3 es un gráfico que muestra el log de cfu/g de

contenido en íleo en polluelos vacunados con salina, el vector de *Salmonella* sin un inserto del polipéptido antigénico o el vector de *Salmonella* con el inserto cj0113 (SEQ ID N°: 7) (10^8 cfu/polluelo), 11 días después de la prueba con *C. jejuni* (1×10^7 cfu/ml). La PCR cuantitativa se realiza con ADN total extraído mediante métodos convencionales del revestimiento mucoso del íleo. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SEM (n = 10) y el * indica una diferencia significativa ($P < 0,05$).

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

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

La Figura 6 es un gráfico que muestra los niveles de IgG en suero (relación de S/P) los días 21 y 31 de post-vacunación y los niveles de sIgA (relación de S/P) en la mucosa del íleo el día 32 de post-vacunación con salina, el vector de *Salmonella* sin un inserto

o el vector con el polipéptido antigénico, cj0113 (SEQ ID N°: 7) (10^8 cfu/polluelo). Un * indica una diferencia significativa con respecto a los controles ($P < 0,05$).

La Figura 7 es un gráfico que muestra los niveles en suero de anticuerpo IgG específico de *C. jejuni* a los 10 días de post-vacunación por gavaje oral ya sea con la cepa básica de *Bacillus subtilis* (BSBB) o con la candidato de vacuna cj0113 (SEQ ID N°: 7) en un vector de *Bacillus subtilis* a razón de 10^8 cfu/polluelo. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM, donde el * indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto a ambos controles.

La Figura 8 es un gráfico que muestra los niveles en suero de anticuerpo IgA secretor específico de *C. jejuni* a los 10 días de post-vacunación por gavaje oral ya sea con la cepa básica de *Bacillus subtilis* (BSBB) o con la candidato de vacuna cj0113 (SEQ ID N°: 7) en un vector de *Bacillus subtilis* a razón de 10^8 cfu/polluelo. La mucosa se recolectó en la región del íleo. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM, donde el * indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto a ambos controles.

La Figura 9 es un gráfico que muestra el $\log_{10}$ de CFU de *C. jejuni* por gramo de contenido en íleo indicado por una PCR cuantitativa. Las aves vacunadas ya sea con la cepa básica de *Bacillus subtilis* (BSBB) o el vector de *Bacillus subtilis* que expresa cj0113 (SEQ ID N°: 7), fueron evaluadas con *C. jejuni* a razón

de 1×10^8 cfu/polluelo una vez transcurridos 10 días por PCR. La qPCR se efectuó con ADN total extraído mediante métodos convencionales del revestimiento mucoso del íleo. Los resultados se muestran como la media del $\log_{10}$ de cfu/gramo de contenido de íleo $\pm$ SEM (n = 10) y el * indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al control.

La Figura 10 es un gráfico que muestra el $\log_{10}$ de CFU de *C. jejuni* por gramo de contenido en íleo de pavo indicado por una PCR cuantitativa. Los pavos vacunados ya sea con la cepa básica o con la vacuna de cj0113 (SEQ ID N°: 7) en el vector de *Salmonella*, fueron evaluados con *C. coli* a razón de 1×10^8 cfu/polluelo al cabo de 12 días por PCR. La qPCR se efectuó con ADN total extraído mediante métodos convencionales del revestimiento mucoso del íleo. Los resultados se muestran como la media del $\log_{10}$ de cfu/gramo de contenido de íleo $\pm$ SEM (n = 10) y el * indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) con respecto al control.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los vectores de vacuna que generan respuestas inmunes de mucosa, humorales y mediadas por células contra múltiples serovariedades de *Campylobacter* ofrecen un enfoque promisorio para limitar la gastroenteritis por *Campylobacter*. Este proyecto utiliza un novedoso enfoque en el desarrollo de vacunas por inserción de secuencias de polinucleótidos que codifican epitopes lineales no nativos (polipéptidos antigénicos). Los polipéptidos antigénicos se pueden usar en combinación con un polipéptido

inmunoestimulante tal como CD154 (CD40L) o HMGB1 (caja 1 del grupo de gran movilidad) en el vector de vacuna. Convenientemente, el polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulante no son polipéptidos asociados en el estado nativo con el vector. El epítopo o polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulante se pueden expresar sobre la superficie de vectores recombinantes. Los vectores pueden ser vectores bacterianos, virales o aún de liposomas. Los vectores pueden ser vectores vivos, vivos y atenuados, o muertos antes de la administración. Los datos preliminares sustanciales, tales como los que se muestran en los Ejemplos, demuestran que las construcciones de *Salmonella* o *Bacillus* que expresan un epítopo extraño puede inducir rápidamente un título elevado de anticuerpos específicos del epítopo *in vivo*. Además, la co-expresión de CD154 o HMGB1 de superficie mejoró efectivamente la respuesta del anticuerpo contra el epítopo extraño.

Las tecnologías del ADN recombinante permiten una manipulación relativamente fácil de muchas especies de bacterias y virus. Algunas bacterias y virus son levemente patogénicos o no patogénicos, pero tienen la capacidad de generar una respuesta inmune robusta. Gracias a estas bacterias y virus los vectores para vacunas resultan atractivos para producir una respuesta inmune contra antígenos heterólogos, no nativos o extraños. Los vectores para vacunas bacterianos o virales pueden imitar la infección natural y producir una inmunidad robusta y de larga duración. A menudo los vectores para vacunas son relativamente económicos de producir y administrar. Además, con frecuencia dichos vectores pueden llevar consigo más de un antígeno y pueden proveer protección contra múltiples agentes infecciosos.

Se pueden insertar polinucleótidos que codifican antígenos de polipéptidos de cualquier cantidad de organismos patogénicos en el vector de vacuna y expresarlos para generar polipéptidos antigénicos. 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, en un sentido no 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. Es un hecho 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 o proteína individual. Convenientemente, el polipéptido antigénico es un polipéptido que no está asociado en estado nativo con el vector. Los polipéptidos no asociados en estado nativo incluyen polipéptidos antigénicos que también pueden ser nativos en el vector, pero que se expresan de manera recombinante como un epitope, que se expresan en combinación con un polipéptido diferente como una proteína de fusión para permitir una expresión diferencial y una mejora diferencial de la

respuesta inmune en comparación con el polipéptido expresado en estado nativo.

Se pueden incluir en el vector para vacunas múltiples copias del mismo epítipo o de múltiples epítipos de diferentes proteínas. Se cree que se pueden administrar diversos epítipos o antígenos del mismo patógeno o enfermedad, o de patógenos o enfermedades diferentes, en combinación con un solo vector para vacunas 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.

Los polinucleótidos se pueden insertar en el cromosoma del vector para vacunas o pueden estar codificados en plásmidos u otro ADN extracromosómico. Los polinucleótidos que codifican epítipos se pueden expresar de manera independiente (es decir, ligar operativamente a un promotor funcional en el vector) o se pueden insertar en un polinucleótido de un vector de vacuna (es decir, un polinucleótido nativo o un polinucleótido no nativo) que se expresa en el vector. 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 al polipéptido antigénico se puede insertar en marco en la secuencia de polinucleótidos del vector de vacuna para permitir la expresión del polipéptido antigénico sobre la superficie del vector. Por ejemplo, el polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico

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 de los vectores permanezca en fase. Véase más adelante los Ejemplos en los cuales los polipéptidos antigénicos se insertan en un bucle externo del gen *lamB* del vector de *Salmonella enteritidis*.

Como alternativa, el polinucleótido que codifica al polipéptido antigénico se puede insertar en un polipéptido secretado. Los especialistas en el arte podrán apreciar que el polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico se puede insertar en una amplia variedad de polinucleótidos del vector para vacunas para proveer la expresión y presentación del polipéptido antigénico a las células inmunes del sujeto que se trata con el vector para vacunas. En los Ejemplos, se insertaron diversos polinucleótidos de *Campylobacter* en la secuencia de codificación de *lamB* de *Salmonella enteritidis*. Las bacterias recombinantes resultantes expresan los polipéptidos antigénicos insertados sobre la superficie de las bacterias. Los polinucleótidos se pueden insertar en *CotB* de *Bacillus subtilis* de manera tal que las bacterias recombinantes expresaban los polipéptidos antigénicos insertados en esporas o en *slp* para su expresión sobre la superficie en bacterias vegetativas.

Los vectores pueden incluir un polinucleótido que codifica proteínas de *Campylobacter* de longitud completa incluyendo *cjaD* (SEQ ID N°: 1), *cjaA* (SEQ ID N°: 2) y ACE393 (SEQ ID N°: 3) o un polipéptido antigénico de estas proteínas. En los Ejemplos, se usaron los siguientes polipéptidos antigénicos derivados de las proteínas de longitud completa: la SEQ ID N°: 7 (un polipéptido

cjaD denominado cj0113); la SEQ ID N°: 8 (un polipéptido cjaA denominado cj0982); y la SEQ ID N°: 9 (un polipéptido ACE 393 denominado cj0420). Los polinucleótidos usados en los Ejemplos se proveen como las SEQ ID N°: 4-6, respectivamente. En los polinucleótidos usados en los Ejemplos, los polipéptidos antigénicos de las SEQ ID N°: 7-9 estaban separados por conectores de serina y ligados a los CD154 aminoácidos 140-149 (tres aminoácidos antes, después y entre el polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulante).

Convenientemente, la porción del polipéptido antigénico que se insertó en el vector para vacunas es inmunogénica o antigénica. Un fragmento inmunogénico es un péptido o polipéptido que es capaz de generar una respuesta inmune celular o humoral. Convenientemente, un polipéptido antigénico puede ser la proteína 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. Convenientemente, la respuesta inmune generada contra el patógeno blanco es una respuesta inmune protectora. Una respuesta inmune protectora es una respuesta capaz de bloquear o reducir la morbilidad o la mortalidad causada por una subsiguiente infección con el patógeno blanco, es decir *Campylobacter*.

Un especialista en el arte podrá apreciar que se puede usar cualquiera de estas secuencias de polinucleótidos en combinación con cualquier otro polipéptido antigénico incluyendo polipéptidos de otros patógenos u organismos heterólogos y también se pueden usar junto con polinucleótidos que codifican polipéptidos inmunoestimulantes, tal como un polipéptido CD154 o HMGB1, tal como se describe en las Solicitudes de Patente Internacional N°:

PCT/US07/078785 y PCT/US2011/022062, ambas incorporadas por completo en la presente a modo de referencia.

Los polinucleótidos que codifican polipéptidos inmunoestimulantes homólogas de las proteínas del sujeto y que pueden estimular el sistema inmune para responder al epítopo extraño también se pueden insertar en un vector. Como se describirá con detalle más adelante, el vector pueden incluir un polipéptido CD154 capaz de unir CD40 en el sujeto y estimular al sujeto para que responda al vector y su polipéptido antigénico extraño asociado. Además, el vector puede incluir un polipéptido HMGB1 o un fragmento funcional del mismo. Según se describió previamente con respecto a los polipéptidos antigénicos, los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos se pueden insertar en el cromosoma del vector o se pueden mantener extracromosómicamente. Un especialista en el arte podrá apreciar que estos polinucleótidos se pueden insertar en una variedad de polinucleótidos de vectores para su expresión en diferentes partes del vector o para la secreción de los polipéptidos.

El polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimulante capaz de potenciar la respuesta inmune hacia un polipéptido antigénico no nativo puede también codificar el polipéptido antigénico. El polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimulante se puede ligar al polinucleótido que codifica al polipéptido antigénico, de manera tal que en el vector de vacuna el polipéptido inmunoestimulante y el polipéptido antigénico extraño estarán presentes sobre el mismo polinucleótido. Por ejemplo, el polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulante pueden ser porciones de una proteína de fusión. En los Ejemplos, el polinucleótido que

codifica un polipéptido de CD154 capaz de unirse a CD40 también codifica un polipéptido antigénico de *cjaD*, *cjaA* o ACE 393 de *Campylobacter*. Véanse las SEQ ID N°: 10-12 en el listado de secuencias adjunto por algunos ejemplos de secuencias de polipéptidos potenciales y las SEQ ID N°: 4-6 por secuencias de polinucleótidos que codifican conectores de serina opcionales entre el polipéptido antigénico, el polipéptido inmunoestimulante y el polipéptido huésped.

En los Ejemplos, el polinucleótido que codifica los polipéptidos antigénicos de *Campylobacter* y el polinucleótido que codifica al polipéptido inmunoestimulante están insertados ambos en el bucle externo del gen *lamB* transmembrana. Los especialistas en el arte podrán apreciar que también se pueden usar polinucleótidos de vectores que codifican otras proteínas transmembrana. Además, los polinucleótidos antigénicos pueden ser extracromosómicos o secretados por el vector. En los Ejemplos, el polinucleótido que codifica el antígeno *cj0113* de *Campylobacter* (SEQ ID N°: 7) y el péptido inmunoestimulante HMGB1 (SEQ ID N°: 20) fueron expresados a partir de un plásmido llevado por un vector de *Bacillus* y expresado sobre la superficie celular.

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 la SEQ ID N°: 13 y la SEQ ID N°: 14, respectivamente.

Se han determinado las regiones de unión a CD40 de CD154 para diversas especies, incluyendo humanos, pollos, patos, ratones y bovinos, y se muestran en la SEQ ID N°: 15, la SEQ ID N°: 16, la SEQ ID N°: 17, la SEQ ID N°: 18 y la SEQ ID N°: 19, respectivamente. Aunque hay variabilidad entre las secuencias en la región de unión CD40 entre especies, se ha informado unión cruzada entre especies de CD154 con CD40. Por ejemplo, el polipéptido CD154 humano pudo mejorar la respuesta inmune en pollos. Por lo tanto, se puede practicar la invención usando polipéptidos CD154 específicos de la especie o un polipéptido CD154 heterólogo.

La proteína HMGB1 (Caja 1 del grupo de gran movilidad [*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 de expresión ubicua que se une al ADN sin especificidad de secuencia. La proteína está altamente conservada y se la puede encontrar en plantas y en animales hasta mamíferos. Las secuencias de aminoácidos de HMGB1 de pez zebra, pollo y humano se proveen en la SEQ ID N°: 28, SEQ ID N°: 20 y SEQ ID N°: 27, respectivamente. La secuencia está altamente conservada en mamíferos con 98% de identidad de aminoácidos y los cambios de aminoácidos son conservadores. 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 la SEQ ID N°: 21 y 22 y caja B como se muestra en la SEQ ID N°: 23 y 24. Véase Andersson y Tracey, *Annu.*

Rev. Immunol. 2011, 29: 139-162, incorporada por completo en la presente a modo de referencia.

HMGB1 es un mediador de la inflamación y sirve como una señal de daño nuclear, tal como en células necróticas. HMGB1 también se puede secretar activamente en células del linaje de monocitos/macrófagos 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 la SEQ ID N°: 25. La unión a TLR4 requiere de la cisteína de la posición 106 de la SEQ ID N°: 20, que se encuentra en la región de la caja B de HMGB1.

Las actividades inflamatorias de HMGB1 no requieren de la proteína de longitud completa y se han identificado fragmentos funcionales. Se ha demostrado que la caja B es suficiente para mediar los efectos proinflamatorios de HMGB1 y por lo tanto las SEQ ID N°: 23 y 24 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 la SEQ ID N°: 25 y SEQ ID N°: 26, respectivamente. Por lo tanto, estos polipéptidos son fragmentos funcionales del polipéptido HMGB1 en el contexto de la presente invención.

Los especialistas en el arte podrán identificar polipéptidos HMGB1, y fragmentos de los mismos, capaces de estimular la actividad de citoquinas pro-inflamatorias, usando métodos tales

como los de la Publicación Internacional N° WO02 092004, incorporada por completo a la presente a modo de referencia. Convenientemente, el polipéptido HMGB1 incluye el dominio de unión a RAGE en los aminoácidos 150 a 183 de la SEQ ID N°: 20 (SEQ ID N°: 25 o un homólogo de la misma) y el dominio de actividad citoquina proinflamatoria entre los aminoácidos 89 y 109 de la SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 26 o un homólogo de la misma). En particular, los polipéptidos HMGB1, y fragmentos funcionales u homólogos de los mismos, incluyen polipéptidos idénticos, o al menos 99% idénticos, al menos 98% idénticos, al menos 95% idénticos, al menos 90% idénticos, al menos 85% idénticos o al menos 80% idénticos a los polipéptidos HMGB1 de las SEQ ID N°: 20-28.

Un especialista en el arte podrá apreciar que el polipéptido HMGB1 se puede usar para potenciar la respuesta inmune a más de un polipéptido antigénico presente en un vector. El polipéptido de HMGB1 estimula una respuesta inmune al menos en parte por activación de células dendríticas y macrófagos y por ende estimula la producción de IL-1, IL-6, IFN- γ y TNF- α . Convenientemente, se puede expresar HMGB1 sobre la superficie del vector.

Al menos una porción del polipéptido antigénico y al menos una porción del polipéptido HMGB1 u otro polipéptido inmunoestimulante pueden estar presentes sobre la superficie del vector para vacunas. La presencia sobre la superficie del vector para vacunas incluye polipéptidos que están comprendidos dentro de una proteína transmembrana, que interaccionan con la misma, entrecruzados covalentemente o químicamente con una proteína transmembrana, un lípido de membrana o un carbohidrato anclado a membrana. Un polipéptido puede estar comprendido en una proteína

transmembrana por tener los aminoácidos que comprenden al polipéptido unidos a través de un enlace peptídico con el extremo N-terminal, C-terminal o con cualquier parte 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 supresión-inserción). Convenientemente, los polipéptidos se pueden insertar en un bucle externo de una proteína transmembrana. Las proteínas transmembrana adecuadas son *cotB* y *lamB*, pero los especialistas en el arte podrán apreciar que hay muchas proteínas transmembrana apropiadas disponibles.

Como alternativa, 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, mediante los métodos disponibles para los especialistas 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.

En los Ejemplos, algunos de los vectores contienen a los polipéptidos antigénicos de *Campylobacter* (cj0113, cj0420 y cj0982) y al polipéptido inmunoestimulante (aminoácidos 140-149 de CD154 o HMGB1 o un fragmento funcional de los mismos) codificados sobre el mismo polinucleótido (*lamB*) de manera tal que las secuencias se encuentran en marco entre sí y con el

polinucleótido de *Salmonella* en el cual eran insertados. En algunas formas de realización, se pueden agregar conectores entre las secuencias de polinucleótidos que codifican al polipéptido antigénico y al polipéptido inmunoestimulante de manera tal que en el polipéptido expresado hay varios aminoácidos que separan los dos polipéptidos. El conector puede ser de 3 nucleótidos que codifican un solo aminoácido, o puede ser mucho más largo, por ejemplo de 30 nucleótidos que codifican 10 o más aminoácidos. En los Ejemplos se usó un conector de 9 nucleótidos y codificaba tres residuos de serina. Los especialistas en el arte podrán prever rápidamente muchos otros tipos de conectores que se podrían usar.

Además, los polinucleótidos pueden estar presentes en una sola copia o en múltiples copias. Por ejemplo, se pueden observar tres copias del polipéptido antigénico y tres copias del polipéptido inmunoestimulante en el mismo bucle externo de una proteína transmembrana o expresar en varias proteínas de vector diferentes. En formas de realización alternativas, el polipéptido inmunoestimulante y el polipéptido antigénico pueden estar codificados por polinucleótidos diferentes.

Los vectores para vacunas potenciales para su uso en los métodos incluyen, en un sentido no limitativo, *Bacillus*, *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*), *Shigella*, *Escherichia* (*E. coli*), *Yersinia*, *Bordetella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *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 los especialistas en el arte e incluyen, en un sentido no limitativo, métodos tales como inactivación por formalina, inactivación a base de antibióticos, tratamiento con calor y tratamiento con etanol. En algunas formas de realización el vector de vacuna puede ser un vector basado en liposomas.

También se proveen composiciones que comprenden al vector y a un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es cualquier vehículo apropiado para su administración *in vivo*. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir agua, soluciones amortiguadas, soluciones de glucosa o fluidos de cultivo bacteriano. Otros componentes de las composiciones convenientemente pueden incluir excipientes tales como estabilizantes, conservantes, diluyentes, emulsionantes y lubricantes. Los ejemplos de vehículos o diluyentes aceptables para el uso farmacéutico incluyen estabilizantes tales como carbohidratos (p.ej., 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 aspersión.

También se proveen métodos para potenciar las respuestas inmunes a *Campylobacter* en un sujeto mediante la administración de un vector como se describe en la presente. El vector puede contener un polipéptido HMGB1 o un polipéptido CD154 capaz de estimular la respuesta inmune al vector y a los polipéptidos antigénicos descritos previamente. El vector es administrado a

un sujeto en una cantidad eficaz para mejorar la respuesta inmune del sujeto a los polipéptidos antigénicos no nativos. Convenientemente, mejora la respuesta inmune para la evaluación con *Campylobacter*.

Una mejora en la respuesta inmune incluye, pero en un sentido no limitativo, una mejora en las respuestas de anticuerpos. Convenientemente mejora la respuesta de IgA, más convenientemente mejora la respuesta secretora de IgA después de la administración del vector en comparación con un control. El control puede ser el mismo sujeto antes de la administración del vector, un sujeto comparable a quien se le administró solamente un vector o un vector que expresa un polipéptido antigénico de *Campylobacter* irrelevante o que no es de *Campylobacter*. La respuesta de anticuerpo, convenientemente la respuesta de IgA, puede aumentar tanto como dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o más en comparación con la respuesta de un sujeto control. La respuesta inmune mejorada también puede dar como resultado una reducción de la capacidad de *Campylobacter* de crecer o replicarse y colonizar al sujeto después de la administración de los vectores que se describen en la presente. Dicha reducción se puede evaluar mediante pruebas en un sujeto a quien se le administra el vector con una infección de *Campylobacter* y monitorear la capacidad de las bacterias para colonizar y replicarse, es decir infectar, el sujeto en comparación con un sujeto control. El crecimiento de *Campylobacter* en el sujeto se puede reducir en 1 log, 2 logs, 3 logs, 4 logs, 5 logs o aún más. El crecimiento de *Campylobacter* en un sujeto a quien se le ha administrado el vector puede hallarse por debajo del nivel de detección.

Además, se divulgan métodos para mejorar la resistencia a una infección por *Campylobacter*. Brevemente, los métodos comprenden administrarle a un sujeto los vectores descritos previamente que comprenden polipéptidos antigénicos de *Campylobacter* en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmune. Una mejora en la resistencia a una infección por *Campylobacter* incluye, pero en un sentido no limitativo, reducir la incidencia de las infecciones por *Campylobacter*, limitando la dispersión de las infecciones por *Campylobacter* de un huésped a otro, reduciendo la replicación de *Campylobacter* en el sujeto, la invasión o dispersión dentro de un solo huésped, reducir la morbilidad asociada con infecciones por *Campylobacter* y reducir la duración de una infección por *Campylobacter*.

La administración del vector puede prevenir que el sujeto sea afectado por *Campylobacter* o que exhiba cualquier signo aparente de enfermedad, tal como gastroenteritis o GBS. Una mayor resistencia a *Campylobacter* también puede incluir una mayor producción de anticuerpos, convenientemente una producción de IgA. La respuesta de anticuerpo, convenientemente la respuesta de IgA, se puede incrementar tanto como dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces o más en comparación con la respuesta de un sujeto control. La respuesta inmune mejorada también puede dar como resultado una reducción de la capacidad de *Campylobacter* de crecer o replicarse y colonizar al sujeto después de la administración de los vectores que se describen en la presente. Dicha reducción se puede evaluar mediante pruebas en un sujeto a quien se le administra el vector con una infección de *Campylobacter* y monitorear la capacidad de las bacterias para colonizar y replicarse, es decir infectar, el sujeto en

comparación con un sujeto control. El crecimiento de *Campylobacter* en el sujeto se puede reducir en 1 log, 2 logs, 3 logs, 4 logs, 5 logs o aún más. El crecimiento de *Campylobacter* en un sujeto a quien se le ha administrado el vector puede hallarse por debajo del nivel de detección.

Los polipéptidos antigénicos de utilidad en todos los métodos descritos en la presente pueden ser de cjaD, cjaA o ACE 393 como se describió previamente. La inserción de los polipéptidos antigénicos en el vector se puede lograr de una variedad de maneras conocidas por los especialistas en el arte, incluyendo pero en un sentido no limitativo el sistema de mutación dirigida al sitio sin cicatrices que se describe en la publicación de Patente Internacional N°: WO2008/036675, cuyo contenido se incorpora por completo en la presente a modo de referencia. El vector puede ser una bacteria manipulada mediante ingeniería genética para expresar polipéptidos antigénicos de *Campylobacter* junto con polinucleótidos capaces de mejorar la respuesta inmune como se describió previamente. En particular, se puede expresar un polipéptido de CD154 o HMGB1 mediante el vector para potenciar la respuesta inmune del sujeto contra los polipéptidos antigénicos. Los vectores usados en estos métodos se pueden atenuar o matar antes de la administración o el uso en los métodos.

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 contra el que se busca una respuesta inmune. La composición se puede administrar en cualquier dosis de vector que sea suficiente para producir una respuesta inmune. En el caso de los vectores bacterianos, se

prevé que son convenientes las dosis que varían en un rango entre 10^3 y 10^{10} bacterias, entre 10^4 y 10^9 bacterias o entre 10^5 y 10^7 bacterias. 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 o más semanas. Convenientemente, los vectores bacterianos son viables antes de la administración, pero en algunas formas de realización los vectores de bacterias se pueden matar antes de la administración. En algunas formas de realización, los vectores de bacterias pueden replicarse en el sujeto, en tanto en otras formas de realización los vectores de bacterias pueden estar atenuados y/o no tendrán capacidad para replicarse en el sujeto.

Para su administración a animales o seres humanos, las composiciones se pueden administrar mediante una variedad de medios incluyendo, pero en un sentido no limitativo, por vía intranasal, mucosa, rociado, intradérmica, parenteral, subcutánea, oral, con aerosol o por vía intramuscular. La administración por medio de gotas oftalmológicas o por adición al agua para beber o a un alimento constituyen medios de administración adecuados adicionales. En el caso de los pollos, las composiciones se pueden administrar *in ovo*.

Con respecto a los métodos, un sujeto incluye, pero en un sentido no limitativo, un vertebrado, convenientemente un mamífero, convenientemente un ser humano, o aves, convenientemente aves de corral tales como pollos o pavos. También se pueden usar otros modelos de infección en animales. La potenciación de la respuesta inmune incluye, en un sentido no limitativo, inducir un efecto profiláctico o terapéutico que está

mediado por el sistema inmune del sujeto. Por ejemplo, una respuesta inmune mejora si el sujeto queda protegido contra una subsiguiente infección con *Campylobacter*. Específicamente, la potenciación de una respuesta inmune puede incluir la producción aumentada de anticuerpos, tal como se demuestra en las figuras 4 a 8, aumento de intercambio de clases de las cadenas pesadas de anticuerpo, maduración de células presentadoras de antígenos, estimulación de células T auxiliares [*helper*], estimulación de células T citotóxicas o inducción de memoria de células T y B. En los Ejemplos, se observó un incremento en la cantidad de IgA secretora después de la administración del vector y se correlacionó con la protección contra una subsiguiente infección por *Campylobacter*.

Se cree que se pueden administrar diversos epitopes, o antígenos del mismo, o diferentes patógenos en combinación con un vector individual para generar una respuesta inmune potenciada contra múltiples antígenos y patógenos asociados. 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.

Se pueden insertar polinucleótidos que codifican antígenos heterólogos en el genoma del vector para vacunas en cualquier sitio no esencial o, como alternativa, se pueden transportar 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 las vías secretoras. Un ejemplo de una proteína transmembrana adecuada para la inserción de polinucleótidos es el gen *lamB* de *Salmonella*. Los polinucleótidos heterólogos incluyen, en un sentido no limitativo, polinucleótidos que codifican antígenos que se seleccionan entre microorganismos o virus patógenos distintos al vector para vacunas, es decir, polinucleótidos no nativos que codifican polipéptidos no nativos.

Los siguientes ejemplos solamente se ofrecen a efectos ilustrativos y no representan limitaciones del alcance de la invención o de las reivindicaciones adjuntas. Todas las referencias citadas en la presente se incorporan por completo aquí a modo de referencia.

Ejemplos

Atenuación de las cepas candidato de vacunas de *Salmonella*

El tipo de fago 13A de *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*) se atenuó por introducción de mutaciones de supresión definidas, irreversibles en el gen *aroA* y/o el gen *htrA* del genoma de *S. enteritidis* según se describió previamente (disponible como ATCC, N° Depósito: PTA-7871, PTA-7872 y PTA-7873). Brevemente, la secuencia del gen blanco en el genoma bacteriano de *S. enteritidis* se reemplazó por la secuencia genética de resistencia a kanamicina (Km^R). Esto se efectuó usando 3S-PCR y electroporación de los productos de la 3S-PCR en células electrocompetentes de *Salmonella* que contienen al plásmido pKD46. La mezcla de células resultante se plaqueó sobre placas de agar LB suplementado con Km para seleccionar los clones positivos que contienen un gen Km^R . El gen Km^R se insertó en la región genómica que contiene a los genes de interés (*aroA* o *htrA*) flanqueando el gen Km^R con secuencias homólogas de los genes de

interés. Una vez obtenidos los mutantes Km^R , las mutaciones de supresión fueron confirmadas por PCR y secuenciación de ADN. Todos los genes Km^R se eliminaron antes de comenzar la inserción del epítopo.

Construcción de candidatos de vacunas recombinantes

Se seleccionaron tres polipéptidos antigénicos candidato potenciales: Omp18/cjaD (cj0113), cjaA (cj0982) y ACE393 (cj0420). Los polipéptidos seleccionados fueron: cj0113 (GVSITVEGNCDEWGTDEYNQAWMTTSYAPTS; SEQ ID N°: 10), cj0982c (KDIVLDAEIGGVAKGKDGKEKWMTTTSYAPTS; SEQ ID N°: 11) y cj0420 (KVALGVAVPKDSNITSVEDLKDKTLLLNKGTTADAWMTTSYAPTS; SEQ ID N°: 12), todos los insertos contienen además una secuencia para los aminoácidos 140-149 de CD154.

Se construyeron cepas recombinantes de *S. enteritidis* que contienen copias integradas de manera estable de cj0113-CD154 (cj0113), cj0420-CD154 (cj0420) o cj0982c-CD154 (cj0982) usando el método de Cox et al., *Scarless and site-directed mutagenesis in Salmonella enteritidis chromosome.*, *BMC Biotechnol* 2007; 7: 59. Brevemente, se introdujo un sitio para la enzima I-SceI junto con un gen Km^R en el Bucle 9 del gen *lamB* por diseño de un producto de PCR que contenía al sitio de la enzima I-SceI y el gen Km^R flanqueados a cada lado por aproximadamente 200-300 pares de bases de ADN, homólogo de las regiones 5' y 3' del Bucle 9. Los cebadores usados se muestran más adelante en la Tabla I. El producto de la PCR se electroporó en células electrocompetentes atenuadas de *Salmonella* que contienen al plásmido pKD46 y la mezcla de células resultante se plaqueó sobre placas de agar LB suplementado con Km para seleccionar los clones positivos que ahora contiene al gen Km^R . Después de introducir una mutación

Sce-I/Km en el Bucle 9, esta región se reemplazó por una secuencia de ADN de un epítopo extraño de codones optimizados (Burns DM, Beacham IR. *Rare codons in E. coli and S. typhimurium signal sequences. FEBS Lett* 1985; 189(2): 318-24.). Esta segunda reacción de 3S-PCR produjo el inserto del epítopo extraño flanqueado por regiones 5' y 3' del Bucle 9, y el producto de PCR resultante se electroporó en SE13A electrocompetentes que contienen a la mutación Sce-I/Km descrita previamente. El plásmido pBC-I-SceI también se electroporó en las células junto con el inserto ya que el plásmido produce la enzima I-SceI que reconoce y cliva una secuencia creando un hueco en el sitio de la enzima I-SceI en la región del Bucle 9 del gen LamB donde se insertan las secuencias de epítopo extrañas en el genoma SE13A. El plásmido también contiene al gen de resistencia a cloramfenicol (Cm) (Cm^R) ya que en los insertos que reemplazarán al gen Km^R las mutaciones deben tener un nuevo marcador de selección para contra-seleccionar la mutación I-SceI/Km anterior. Después de la electroporación, las células se plaquearon sobre placas de agar LB que contienen Cm 25 µg/ml para la selección de los mutantes positivos.

Tabla I. Cebadores para PCR

Cebador	Región amplificada	Secuencia del cebador (SEQ ID N°)
lam-up-f	Bucle 9 5'	5'TGTACAAGTGGACGCCAATC 3' (SEQ ID N°: 29)
lam-up-r	Bucle 9 5'	5'GTTATCGCCGTCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID N°: 30)
lam-dn-f	Bucle 9 3'	5'ATTTCCCGTTATGCCGCAGC3' (SEQ ID N°: 31)
lam-dn-r	Bucle 9 3'	5'GTTAAACAGAGGGCGACGAG 3'(SEQ ID N°: 32)
Km-f	gen I-SceI/Km ^r	5'GCTATATCAAAGACGGCGATAAC TAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGA ATTTCCGGGGATCCGTCGA 3' (SEQ ID N°: 33)
Km-r	gen I-SceI/Km ^r	5'GCTGCGGCATAACGGGAAA TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3' (SEQ ID N°: 34)
Kan4f	Interior del gen Km ^r	5'CAAAAGCGCTCTGAAGTTCC 3' (SEQ ID N°: 35)
Kan4r	Interior del gen Km ^r	5'GCGTGAGGGGATCTTGAAGT 3' (SEQ ID N°: 36)

lam 3f	Regiones externas del bucle 9	5'GCCATCTCGCTTGGTGATAA 3' (SEQ ID N°: 37)
lam 3r	Regiones externas del bucle 9	5'CGCTGGTATTTTGCGGTACA 3' (SEQ ID N°: 38)
Cj0113f	Inserto con el bucle 9 5'	5'TTCATCGGTACCCCATTCATCACAGTTACCTTCAACGGTGA TGCTAACACCGGAGGAGGAGTTATCGCCGTCTTTGATATAGCC 3' (SEQ ID N°: 39)
Cj0113r	Inserto con el bucle 9 3'	5'ATGAATGGGGTACCGATGAATATAACCAGGCGTCCTCCTCC TGGATGACCACCTCCTATGCGCCGACCTCCTCCTCCTCCATTT CCCGTTATGCCGCAGC3' (SEQ ID N°: 40)
Cj0420f	Inserto con el bucle 9 5'	5'ATCTTTACCTTTTCGCAACACCACCGATTTCCGCATCCAGAA CGATATCTTTGGAGGAGGAGTTATCGCCGTCTTTGATATAGCC 3' (SEQ ID N°: 41)
Cj0420r	Inserto con el bucle 9 3'	5'GTGTTGCGAAAGGTAAAGATGGTAAAGAAAAATCCTCCTCC TGGATGACCACCTCCTATGCGCCGACCTCCTCCTCCTCCATTT CCCGTTATGCCGCAGC3' (SEQ ID N°: 42)
Cj0982c-f	Inserto con el bucle 9 5'	5'GGTTTTATCTTTTCAGATCTTCAACGCTGGTGATGTTGCTAT CTTTTCGGAACCGCAACACCCAGCGCAACTTTGGAGGAGGAGTT ATCGCCGTCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID N°: 43)
Cj0982c-r	Inserto con el bucle 9 3'	5'AAGATCTGAAAGATAAAACCCTGCTGCTGAACAAAGGTACC ACCGCGGATGCGTCCTCCTCCTGGATGACCACCTCCTATGCGC CGACCTCCTCCTCCTCCATTTCCCGTTATGCCGCAGC3' (SEQ ID N°: 44)

Una vez sospechadas las mutaciones/insertos positivos, se condujeron PCR y secuenciación de ADN para confirmar que las secuencias de inserción están presentes y son correctas.

Prueba con Campylobacter jejuni

Se cultivaron individualmente tres formas aisladas de tipo salvaje de *C. jejuni* de pollos parrilleros hasta la fase de crecimiento logarítmica, se combinaron, se diluyeron en serie y se plaquearon homogéneamente para luego realizar una enumeración de cultivo convencional según se describió previamente (Cole et al., *Effect of aeration and storage temperature on Campylobacter concentrations in poultry semen, Poult Sci* 2004; 83: 1734-8.)). Se diluyeron hasta aproximadamente 10⁷ a 10⁸ cfu/ml para la prueba por gavaje oral usando densidad espectrofotométrica y comparación con una curva estándar generada previamente. Se informan las cfu determinadas empíricamente administradas para cada una de las pruebas del experimento (véase más adelante).

Estudio de vacunación 1

En el primer estudio de inmunización, se obtuvieron 210 polluelos parrilleros recién eclosionados de un criadero comercial local y fueron asignados aleatoriamente a uno de cuatro grupos que comprenden tratamiento con salina solamente (control negativo) o uno de tres grupos de candidatos de vacuna cj0113, cj0420 o cj0982; n = 50/corral. Cada grupo de tratamiento fue alojado en un piso de corral individual sobre lecho de pino fresco y se le proporcionó agua y alimento *ad libitum*. El día de la eclosión, todos los polluelos de cada grupo de tratamiento fueron inoculados, por gavaje oral, con 0,25 ml de una solución que contiene aproximadamente 10^8 cfu/ml del tratamiento apropiado. El día 21 de post-eclosión, todas las aves de cada grupo de tratamiento fueron sometidas a pruebas con *C. jejuni*, por gavaje oral, con 0,25 ml de una solución que contiene 1×10^7 cfu/ml. Los días 3, 11, 21 (antes de la inoculación de refuerzo) y 32 de post-eclosión, se sacrificaron 10-15 aves de cada grupo de tratamiento y se les retiraron el hígado, bazo y amígdalas cecales de manera aséptica para la determinación de la invasión, colonización y depuración en los órganos de las cepas de vectores de vacuna de *Salmonella*. Además, los días 21 y 32 de post-eclosión, se retiraron secciones de íleo y se procesaron para su uso en una qRT-PCR y el día 32 se retiró una muestra separada de íleo y se diluyó 1:5 en salina y se usó para evaluar la inmunoglobulina A secretora (sIgA). Además, se recolectaron muestras de sangre de 10 aves por grupo de tratamiento y el suero se usó para determinar la respuesta de anticuerpos los días 21 y 32 de post-vacunación.

Estudio de vacunación 2

En el experimento 2, se obtuvieron 110 polluelos parrilleros recién eclosionados de un criadero comercial local y fueron asignados aleatoriamente a uno de dos grupos de tratamiento: salina solamente (control de vehículo) o un candidato de vacuna de *Salmonella*, cj0113, (n = 55/corral). Cada grupo de tratamiento fue alojado en un piso de corral individual sobre lecho de pino fresco y se le proporcionó agua y alimento *ad libitum*. El día de la eclosión, todos los polluelos de cada grupo de tratamiento fueron inoculados, por gavaje oral, con 0,25 ml de una solución que contiene aproximadamente 10^8 cfu/ml del tratamiento apropiado. El día 21 de post-eclosión, todas las aves de cada grupo de tratamiento fueron sometidas a pruebas con *C. jejuni*, por gavaje oral, con 0,25 ml de una solución que contiene 1×10^7 cfu/ml. Los días 3, 11, 21 (antes de la inoculación de refuerzo) y 32 de post-eclosión, se sacrificaron 10-15 aves de cada grupo de tratamiento y se les retiraron el hígado, bazo y amígdalas cecales de manera aséptica para la determinación de la invasión, colonización y depuración en los órganos de las cepas de vectores de vacuna de *Salmonella*. Además, los días 21 y 32 de post-eclosión se retiraron secciones de íleo y se procesaron para su uso en la qRT-PCR. Además, se recolectaron muestras de sangre de 10 aves por grupo de tratamiento y el suero se usó para determinar la respuesta de anticuerpos los días 21 y 32 de post-eclosión.

Estudio de vacunación 3

El tercer experimento era similar al experimento de vacunación 2 (descrito previamente) excepto por la adición de un tercer grupo de 13A aroA/htrA de *S. enteritidis* sin el epítipo de *Campylobacter* (SE13A) como control para la vacunación oral del

propio vector. Todas las recolecciones eran las mismas que en el estudio de vacunación 2 excepto que el día 32 de post-eclosión se usó una sección de íleo adicional para cosechar la capa mucosa para sIgA como en el experimento 1.

Medición de respuestas de anticuerpo de Campylobacter

Se usó suero recolectado de aves de ambos estudios de inmunización en un ELISA para determinar las respuestas a anticuerpos relativas. Brevemente, se recubrieron cavidades individuales de una placa de 96 cavidades con *C. jejuni*. Se dejó que la adhesión del antígeno continuara durante la noche a 4 °C, luego se lavaron las placas y se bloquearon con Superblock (Pierce) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después las placas se recubrieron durante 2 horas con una dilución 1:50 de los sueros recolectados previamente. Las placas se lavaron nuevamente seguido por incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de pollo marcado con peroxidasa (Jackson Immunolaboratories) durante una hora adicional. Después de un lavado subsiguiente, las placas se revelaron usando un conjunto de elementos con sustrato de peroxidasa (BD OptEIA, Fisher Scientific) y se leyeron las absorbancias con un espectrofotómetro a 450 nm. Cada placa contenía un control positivo y un control negativo donde se reemplazó una muestra agrupada de los sueros de polluelos vacunados y de pollos pre-inmunes, respectivamente, por el suero de los grupos de tratamiento. Se usó la absorbancia que se obtuvo de las muestras de control positivo, de control negativo y experimentales para calcular las relaciones de muestra a control positivo (relaciones S/P) usando el siguiente cálculo: $(\text{media de la muestra} - \text{media del control negativo}) / (\text{media del control positivo} - \text{media del control negativo})$ (Brown et al.,

Detection of antibodies to Mycoplasma gallisepticum in egg yolk versus serum samples, J Clin Microbiol, 1991; 29(12): 2901-3 y Davies et al., *Evaluation of the use of pooled serum, pooled muscle tissue fluid (meat juice) and pooled faeces for monitoring pig herds for Salmonella, J Appl Microbiol* 2003; 95(5): 1016-25.). El método de ELISA usado para la detección de sIgA era similar al del ensayo descrito precedentemente para inmunoglobulinas séricas excepto que los autores usaron anti-IgA de pollo de cabra conjugado con peroxidada de rábano picante (GenTex) en lugar del conjugado de anticuerpo anti-IgG de pollo.

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

La extracción de ADN total de muestras de íleo se realizó usando el conjunto de elementos QIAmp DNA Stool Mini (Qiagen). El protocolo del proveedor se modificó ligeramente de la siguiente manera: el contenido del íleo se retiró de manera que incluía la capa mucosa y se diluyó 1:5 (p/v) con PBS helado + Tween 20 0,05%; se agregó un ml de la lechada a 1 ml de la solución amortiguadora ASL incluida en un tubo para microcentrífuga de 2,0 ml, se agitó por vortexeo y se calentó a 70 °C durante 5 minutos. A continuación, se aplicaron las recomendaciones del proveedor hasta el último paso cuando se eluyó ADN en un volumen final de 50 ul.

La determinación cuantitativa de *C. jejuni* se efectuó usando un método publicado previamente con modificaciones menores (Skanseng et al., *Comparison of chicken gut colonisation by the pathogens Campylobacter jejuni and Clostridium perfringens by real-time quantitative PCR, Mol Cell Probes* 2006; 20(5): 269-79. El ensayo se optimizó para su uso con la mezcla maestra MX3005P (Agilent Technology) y Brilliant II QPCR (Agilent Technologies),

siendo todos los demás componentes de la mezcla, cebadores, sonda y condiciones de ciclado como los publicados.

Se preparó una curva estándar (Figura 1) usando un cultivo puro de *C. jejuni* diluido en serie 10 veces y agregado a un antecedente constante de contenido de íleo; el aislamiento del ADN total se efectuó según se describió previamente.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando la prueba t de Student de dos colas suponiendo varianzas desiguales para comparar la diferencia entre los grupos y los controles usando el software estadístico JMPTM. Un valor de $P < 0,05$ era considerado significativo.

Resultados

Se encontró una correlación excelente entre la cuantificación de *C. jejuni* usando técnicas de enumeración microbiológica convencionales versus la qPCR (Fig. 1) con una correlación mayor que un 99% entre los dos métodos. En el experimento 1, los autores observaron niveles de colonización significativos por las tres vacunas con los vectores candidato en las amígdalas cecales al día 3 de post-vacunación; así como una invasión significativa en los órganos internos por el vector que expresa cj0113 en los mismos tiempos (Tabla II). Sin embargo, para el día 11 de post-vacunación, hubo una disminución en la cantidad de colonización por los tres vectores y para el día 21 de post-vacunación, los vectores habían sido completamente depurados de las amígdalas cecales así como de los órganos internos (Tabla II). Los autores observaron la misma tendencia en el estudio de vacunación de seguimiento (experimento 2), usando cj0113 expresado por el vector como el candidato de vacuna, según se puede observar con los datos presentados en la

Tabla II.

Tabla II. Porcentaje de colonización, invasión y depuración de hígado, bazo o amígdalas cecales por *Salmonella* después de la vacunación con uno de los tres candidatos de vacuna en vectores de *Salmonella* o gavaje con salina.

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

En los experimentos 1 y 2 la incidencia del vector de vacuna atenuado recombinante de *Salmonella* está representada como el porcentaje de hígado, bazo o amígdalas cecales positivos en 10 aves. Los polluelos recibieron por gavaje oral aproximadamente 10⁸ cfu del tratamiento apropiado el día de la eclosión y los días 3, 11, 21 y 32 de post-eclosión, se sacrificaron 10 aves de cada grupo de tratamiento, y se recolectaron los hígados, bazos y amígdalas cecales para las determinación (+/-) de los vectores de vacuna atenuados recombinantes de *Salmonella*. Se agrupó el hígado y bazo de cada ave y se evaluaron como una muestra.

Los pollos fueron evaluados con *C. jejuni* el día 21 de post-vacunación. Se obtuvieron muestras de la mucosa de íleo los días 21 y 32 de post-vacunación (días 0 y 11 después de la prueba) y se usaron para preparar muestras de ADN para enumerar *C. jejuni* en el intestino según se describió previamente. La vacunación con los candidatos de vectores cj0420 y cj0982 causó una reducción aproximada de 1 log y 2 log (P <0,05), respectivamente, a nivel

de *C. jejuni* presente en las muestras de íleo. Cuando se usaba el candidato de vacuna cj0113, había una reducción marcada de 4,8 log (P <0,05) de *C. jejuni* en el íleo en comparación con las aves control (Fig. 2).

En el experimento 2, se efectuó una repetición del estudio de inmunización primaria con el candidato de vacuna que expresa cj0113 solamente. En este estudio, los datos de la qPCR revelaron una reducción aproximada de 5 log de *C. jejuni* con la vacuna de vectores SE cj0113 administrada a aves en comparación con las aves que recibieron salina solamente (Tabla III). Además, en el experimento 3, la vacunación con el vector cj0113 causó una reducción aproximada de 4 log, hasta por debajo de los niveles detectables, de *C. jejuni* en comparación con el grupo de salina o la cepa *Salmonella* relacionada que no contenía un inserto de epítotope (Fig. 3).

Tabla III. Enumeración de *Campylobacter jejuni* por PCR cuantitativa en polluelos 11 días después de la prueba con *Campylobacter* en el experimento 2 (n = 10).

	Media del Log10 de cfu/g de íleo de <i>C. jejuni</i>	DE ^a	EE ^b
Solución salina	5,00	0,98	0,44
cj0113	0,00	0,00	0,00

En el experimento 2, se determinó la cuantificación de *Campylobacter jejuni* en polluelos que recibían salina o al candidato de vacuna en el vector de *Salmonella*, cj0113, a razón de 10⁸ cfu/polluelo mediante PCR cuantitativa 11 días después de recibir una dosis de prueba de *C. jejuni* de aproximadamente 10⁷ cfu/ml. La qPCR se condujo con ADN total extraído mediante

métodos convencionales del revestimiento mucoso del íleo. Los resultados se muestran como la media del log10 de cfu/gramo de contenido en íleo con la desviación estándar^a y el error estándar^b (n = 10).

Se usaron muestras de suero recolectadas en cada experimento los Días 21 y 32 de post- vacunación para determinar los anticuerpos de IgG específicos de *C. jejuni*. En el primer experimento, los tres candidatos de vacunas (cj0420, cj0113, cj0982) causaron niveles de anticuerpo significativamente más elevados en ambos tiempos en comparación con el grupo que solamente recibió salina (Fig. 4). Además, en el primer experimento, el grupo vacunado con cj0113 mostró títulos de anticuerpo significativamente mayores en comparación con cj0420 y cj0982 (Fig. 4). También se usó un ELISA para determinar los niveles de anticuerpos sIgA en mucosa específicos de *Campylobacter*. Estos datos indican que el vector de vacuna cj0113 causó un incremento significativo en los niveles de sIgA en comparación con el grupo con salina y los dos grupos que reciben ya sea cj0420 o cj0982 (Fig. 5). Los resultados del segundo y tercer estudio en donde solamente se usó cj0113 como candidato de vacuna mostró resultados similares al experimento 1 donde las aves vacunadas tenían niveles significativamente más elevados de IgG específica del antígeno y anticuerpos sIgA contra *C. jejuni* en comparación con las aves que solamente recibieron salina (los datos del experimento 3 se muestran en la Fig. 6). Además, en el tercer experimento los niveles de anticuerpo para la cepa básica (SE13) eran similares a los controles con salina (Fig. 6).

Estudio de vacunación con vectores de *Bacillus*

Producción de proteínas heterólogas para una expresión en células vegetativas

Se transformó el plásmido pHT10 obtenido de MoBioTec/Boca Scientific, Boca Raton, FL (Nguyen et al., 2007) en el sitio de clonación múltiple por adición de una secuencia de inserción de codones optimizados para *Bacillus subtilis* para cj0113 y HMGB1 (SEQ ID N°: 4 y 20, respectivamente). Se efectuó una secuenciación de ADN para confirmar la inserción correcta de la secuencia. El plásmido recién modificado se transformó entonces en *Bacillus*. Brevemente, se desarrollaron cultivos de *Bacillus* durante la noche a 37°C en medio HS (medio de 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 inoculan 20 ml de medio LS (medio de Spizizen suplementado con glucosa 0,5%, DL-triptofano 5 µg/ml, uracilo 5 µg/ml, caseína hidrolizada 0,01%, extracto de levadura 0,1%, MgSO₄ 1 mM, MgCl₂ 2,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM) con 1 ml de cultivo de la noche y se incuban con agitación durante 3-4 horas a 30°C. Se retira 1 ml de cultivo LS y se agregan 10 µl de EGTA 0,1 M y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregan 1-2 µg de ADN plasmídico, se agita por 2 horas a 37°C y se plaquea sobre placas LB con antibióticos selectivos. Esta *Bacillus* spp. transformada produce ahora secuencias de epítopo heterólogas de *Campylobacter* (cj0113) y HMGB1 cuando se induce con IPTG 1 mM.

Estudio de vacunación

En la prueba de vacunación, se obtuvieron 100 polluelos parrilleros recién eclosionados de un criadero

comercial local y fueron asignados aleatoriamente a uno de

dos grupos de tratamiento: salina solamente, vector de *Bacillus* solamente (BSBB) o 10^6 o 10^8 candidato de vacuna en *Bacillus*, cj0113, (n = 25/corral). Cada grupo de tratamiento fue alojado en un piso de corral individual sobre lecho de pino fresco y se le proporcionó agua y alimento *ad libitum*. El día de la eclosión, todos los polluelos de cada grupo de tratamiento fueron inoculados, por gavaje oral, con 0,25 ml de una solución que contiene aproximadamente 10^8 cfu/ml del vector de la cepa básica o del vector Cj0113 de *Bacillus*. El día 10, las aves recibieron una vacunación de refuerzo del mismo tratamiento que recibieron el día de la eclosión. El día 21 de post-eclosión, todas las aves de cada grupo de tratamiento fueron sometidas a pruebas con *C. jejuni*, por gavaje oral, con 0,25 ml de una solución que contiene 1×10^7 cfu/ml según se describió previamente. Los días 3, 11, 21 (antes de la inoculación de refuerzo) y 32 de post-eclosión, se sacrificaron 10-15 aves de cada grupo de tratamiento y se les retiraron el hígado, bazo y amígdalas cecales de manera aséptica para la determinación de la invasión, colonización y depuración en los órganos de las cepas de vectores de vacuna. Además, los días 21 y 36 de post-eclosión se retiraron secciones de íleo y se procesaron para su uso en la qRT-PCR. Además, se recolectaron muestras de sangre de 15 aves por grupo de tratamiento y el suero se usó para determinar la respuesta de anticuerpos los días 21 y 36 de post-eclosión.

Resultados

Se usaron muestras de suero recolectadas el Día 36 de post-vacunación para determinar anticuerpos de IgG específicos de *C. jejuni*. La vacunación con el vector de *Bacillus* que expresa al polipéptido cj0113 causó niveles de anticuerpo significativamente

mayores en comparación con el grupo que solamente recibió salina o un vector vacío (Fig. 7). También se usó un ELISA para determinar los niveles de anticuerpos sIgA en mucosa específicos de *Campylobacter* el día 36 de post-vacunación. Estos datos indican que el vector de vacuna que expresa cj0113 causó un incremento significativo en los niveles de sIgA en comparación con el vector vacío (Fig. 8).

Los pollos fueron evaluados con *C. jejuni* el día 24 de post-vacunación. Se obtuvieron muestras de la mucosa de íleo los días 24 y 36 de post-vacunación (días 0 y 11 después de la prueba) y se usaron para preparar muestras de ADN para enumerar *C. jejuni* en el intestino según se describió previamente. La vacunación con el vector cj0113 de *Bacillus* causó una reducción aproximada de 3 log ($P < 0,05$) en el nivel de *C. jejuni* presente en las muestras de íleo (Fig. 9).

Estudio de vacunación en pavos

Dado que la vacuna Cj0113 en el vector de *Salmonella* fue eficaz para reducir la recuperación de *Campylobacter* después de la prueba en pollos, los autores consideraron que la vacuna también podría funcionar en pavitos. Por ello, para evaluar además el uso de este sistema de administración de epitopes, se diseñó un experimento para evaluar la eficacia de la vacuna contra *C. coli* en pavitos.

La vacuna Δ SE-cj0113 se construyó según se describió previamente. Se usó el tipo de fago 13A de *Salmonella enteritidis* (SE13A) como cepa básica para este candidato de vacuna. Esta forma aislada se atenuó doblemente por supresiones de genes irreversibles en los genes *aroA* y *htrA* según se describió previamente. Las cepas recombinantes que contienen estas supresiones se modificaron

luego para incorporar el inserto cj0113 y una molécula inmunoestimulante, CD-154 (Δ SE-cj0113). Estas secuencias se integraron según se describió previamente.

En este experimento, se obtuvieron 70 pavitos de un criadero local. Fueron asignados aleatoriamente a uno de dos grupos de tratamiento y se marcaron. A treinta pavitos se les administraron 10^8 cfu/pavo de Δ SE-cj0113 mediante gavaje oral y los pavitos remanentes recibieron un tratamiento falso con salina. El día 21, los pavitos fueron sometidos a pruebas con $1,5 \times 10^8$ cfu/pavito de *C. coli* mediante gavaje oral. Se retiraron asépticamente el hígado, bazo y amígdalas el día 3 (N = 10), el día 21 (N = 10) y el día 35 (N = 10) para la detección de la recuperación del vector por enriquecimiento en caldo de tetrationato y plaqueo sobre agar Brilliant Green. Los días 21 y 35, se recolectaron muestras de alimento ingerido (N = 10) y de tejido (N = 5) para su posterior análisis. - El alimento ingerido del íleo de pavitos se analizó usando qPCR para la enumeración de *C. coli*. Se recolectaron muestras de tejido de la misma región y se extrajo el ARN total. - Se evaluaron las respuestas de vacunas tipo gamma-interferón y TNF-alfa.

Resultados

Según se demostró previamente en pollos, los pavitos desarrollaron una respuesta inmune significativa después de la vacunación con la vacuna Cj0113 en un vector de *Salmonella*. Después de la prueba, había una reducción de aproximadamente cinco-log en *Campylobacter coli* en el íleo en comparación con los controles de vector solamente (Fig. 10). La vacunación con la vacuna Cj0113 en vector de *Salmonella* no parece funcionar en pavos de manera similar a como funciona en pollos.

REIVINDICACIONES:

1.Un vector que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido antigénico de la SEQ ID N°: 7 (cjaD; cj0113), la SEQ ID N°: 8 (cjaA; cj0982) o la SEQ ID N°: 9 (ACE 393; cj0420) o un fragmento del mismo, donde la primera secuencia de polinucleótidos no está asociado en estado nativo con el vector.

2.El vector de la reivindicación 1, que además comprende una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido inmunoestimulante que no está asociado en estado nativo con el vector.

3.Un vector que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido antigénico no asociado en el estado nativo con el vector y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido inmunoestimulante, en donde el polipéptido antigénico es un fragmento de la SEQ ID N°: 1(cjaD; cj0113), la SEQ ID N°: 2 (cjaAcj0982) o la SEQ ID N°: 3 (ACE393; cj0420).

4.El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el vector es una bacteria.

5.El vector de la reivindicación 4, donde la bacteria es de un género seleccionado entre *Salmonella*, *Escherichia*, *Bacillus* o *Lactobacillus*.

6.El vector de la reivindicación 4, donde la primera secuencia de polinucleótidos y la segunda secuencia de polinucleótidos están integrados en el genoma de la bacteria.

7.El vector de cualquiera de las reivindicaciones 2-6, donde el vector comprende más de una copia de la primera secuencia de polinucleótidos, más de una copia de la segunda

secuencia de polinucleótidos o más de una copia de la primera y la segunda secuencia de polinucleótidos.

8.El vector de cualquiera de las reivindicaciones 2-7, donde la primera secuencia de polinucleótidos está ligada en marco a la segunda secuencia de polinucleótidos.

9.El vector de cualquiera de las reivindicaciones 2-8, donde el polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulante se expresan sobre la superficie del vector.

10.El vector de la reivindicación 9, donde la primera secuencia de polinucleótidos y la segunda secuencia de polinucleótidos se insertan en una tercera secuencia de polinucleótidos que codifica una porción externa de una proteína transmembrana.

11.El vector de cualquiera de las reivindicaciones 2-10, donde el polipéptido inmunoestimulante es un polipéptido CD154 o un polipéptido HMGB1.

12.El vector de la reivindicación 11, donde el polipéptido CD154 tiene la capacidad de unirse a CD40, donde el polipéptido CD154 es de menos que 50 aminoácidos y comprende los aminoácidos 140-149 de la SEQ ID N°: 13 o un homólogo del mismo.

13.El vector de la reivindicación 12, donde el polipéptido CD154 comprende un polipéptido seleccionado de las SEQ ID N°: 15-19.

14.El vector de la reivindicación 11, donde el polipéptido HMGB1 comprende un polipéptido seleccionado entre al menos una de las SEQ ID N°: 20-28 o un fragmento de al menos una de las SEQ ID N°: 20-28.

15.El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde la primera secuencia de polinucleótidos es la SEQ ID N°: 7

o un fragmento de la misma.

16.El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde la primera secuencia de polinucleótidos es la SEQ ID N°: 8, la SEQ ID N°: 9, un fragmento de la SEQ ID N°: 8, un fragmento de la SEQ ID N°: 9 o una combinación de los mismos.

17.El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde la administración del vector a un sujeto tiene la capacidad de generar una respuesta de anticuerpos.

18.El vector de la reivindicación 17, donde la respuesta del anticuerpo es una respuesta de IgA.

19.El vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde el vector tiene la capacidad de proteger a un sujeto vacunado contra una subsiguiente infección con *Campylobacter* spp..

20.Una composición farmacéutica que comprende el vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

21.Un método para mejorar una respuesta inmune en un sujeto que comprende administrar el vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-19 al sujeto en una cantidad eficaz para mejorar la respuesta inmune del sujeto.

22.El método de la reivindicación 21, donde la respuesta inmune incluye una respuesta de anticuerpos mejorada.

23.El método de la reivindicación 22, donde mejora la respuesta de anticuerpo IgA soluble.

24.El método de la reivindicación 23, donde la respuesta de IgA después de la administración del vector aumentó al menos tres veces con relación a la respuesta de IgA de un sujeto a quien se le administró un vector control.

25.El método de cualquiera de las reivindicaciones 21-23, que además comprende efectuar pruebas en un sujeto con *Campylobacter* spp., en donde se reduce el crecimiento de *Campylobacter* en el sujeto después de la prueba en 2 logs en los sujetos a quienes se les administró el vector en comparación con sujetos que solamente recibieron un vector control.

26.Un método para mejorar la resistencia a una infección por *Campylobacter* en un sujeto, que comprende administrar el vector de cualquiera de las reivindicaciones 1-19 al sujeto en una cantidad eficaz para mejorar la resistencia a una infección por *Campylobacter* después de una subsiguiente exposición a *Campylobacter* spp..

27.El método de cualquiera de las reivindicaciones 21-26, donde el vector está atenuado.

28.El método de la reivindicación 27, donde se mata al vector antes de la administración.

29.El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-28, donde la resistencia mejora con una mayor producción de anticuerpos.

30.El método de la reivindicación 29, donde la mayor respuesta de anticuerpos comprende una mayor respuesta de IgA.

31.El método de cualquiera de las reivindicaciones 26-30, donde la mayor resistencia se caracteriza en que una subsiguiente infección con *Campylobacter* spp. da como resultado un menor crecimiento de *Campylobacter* en comparación con un control.

32.El método de la reivindicación 31, donde se reduce el crecimiento de *Campylobacter* en al menos 2 logs en comparación con el crecimiento de *Campylobacter* después de la administración de un vector control.

VACUNA Y MÉTODOS PARA REDUCIR UNA INFECCIÓN POR *CAMPYLOBACTER***RESUMEN**

Vectores de vacuna y métodos para mejorar la resistencia a una infección por *Campylobacter* o para mejorar la respuesta inmune a *Campylobacter*. Los vectores de vacuna incluyen un primer polinucleótido que codifica un polipéptido antigénico seleccionado de las SEQ ID N°: 7-9 o un fragmento del mismo. El vector también puede incluir un polipéptido inmunoestimulante. Los métodos incluyen la administración de los vectores de vacuna a un sujeto.

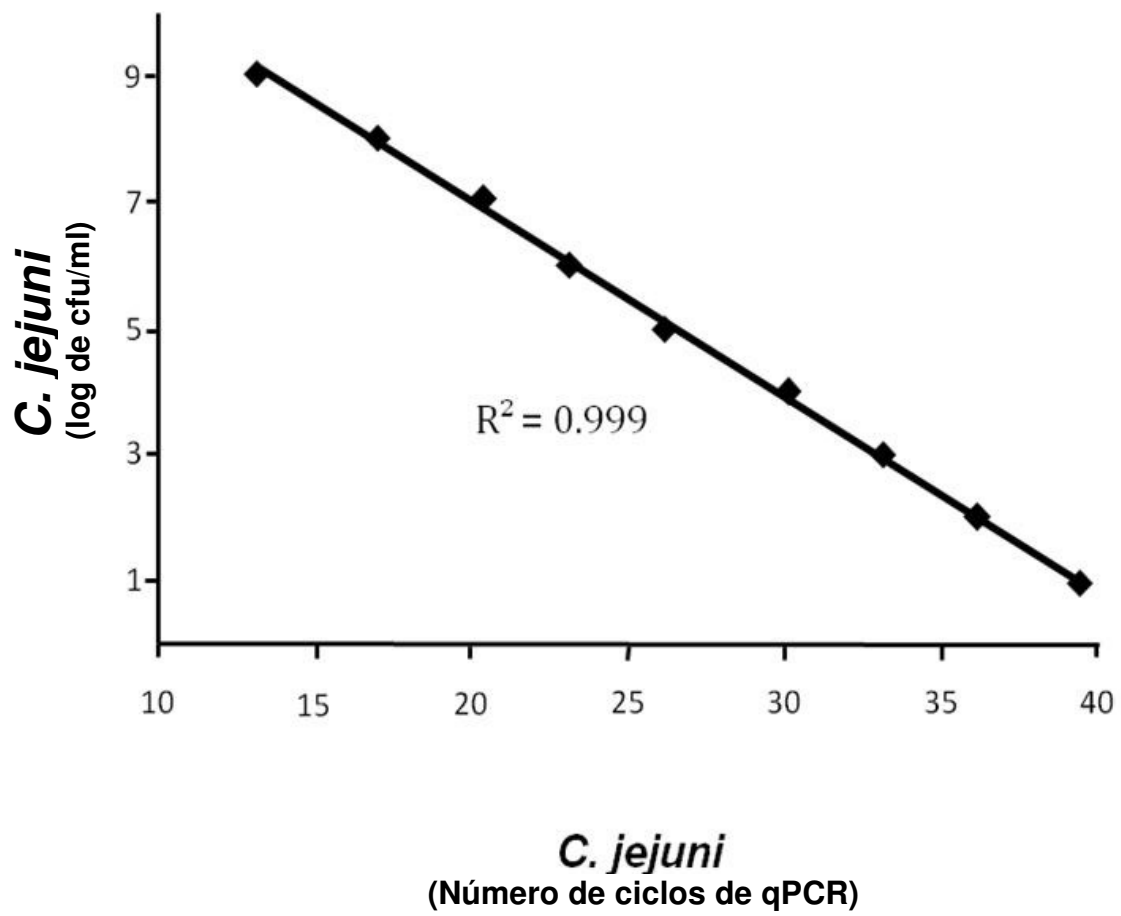


Figura 1.

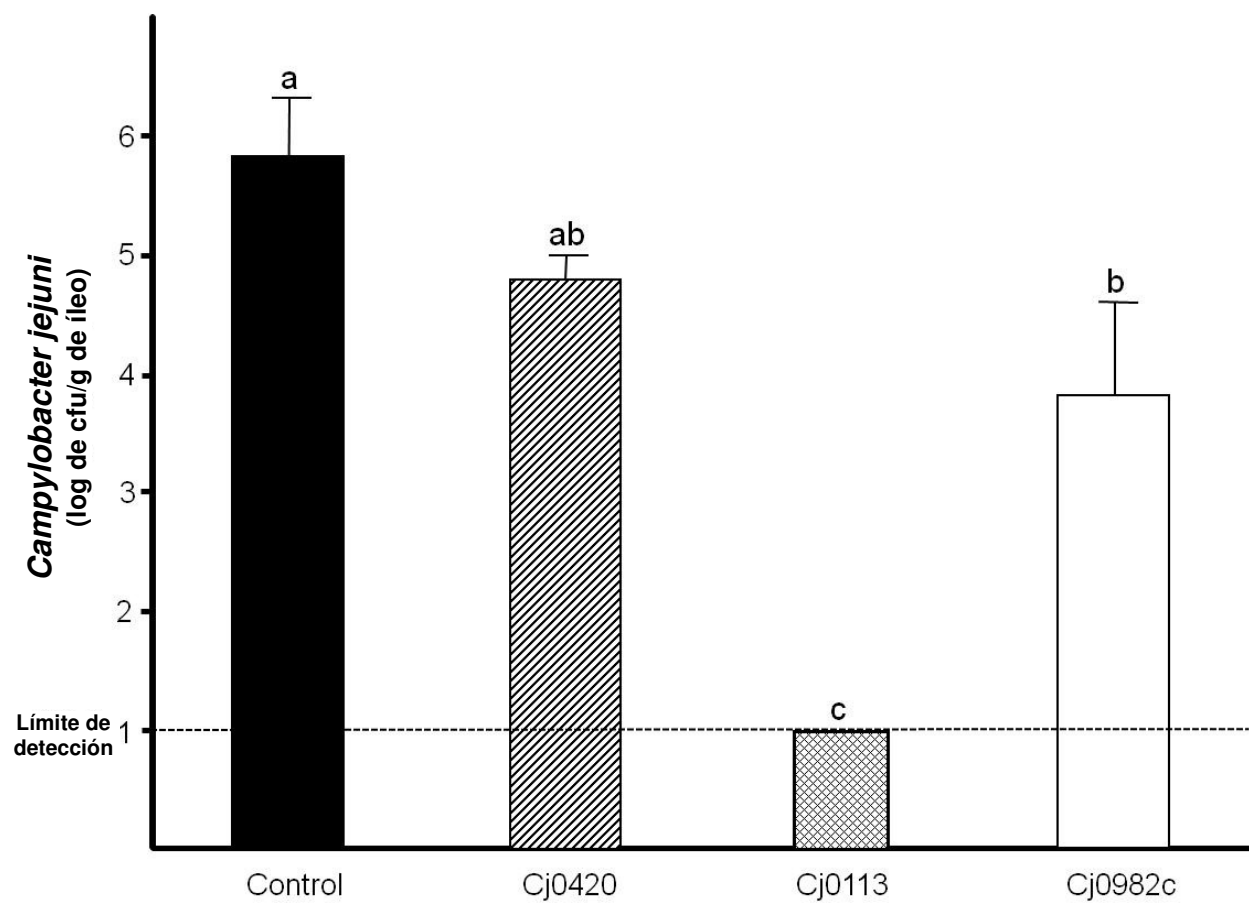


Figura 2.

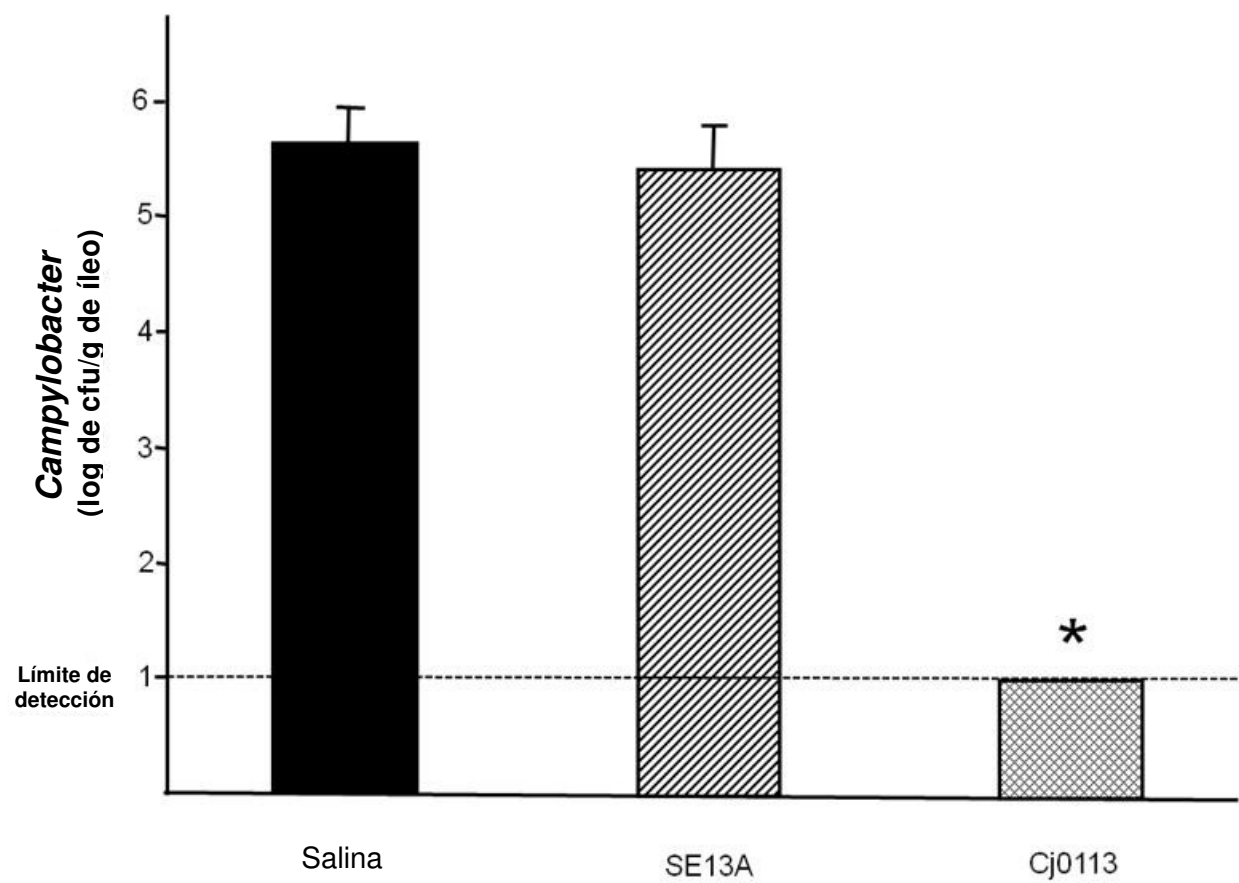


Figura 3.

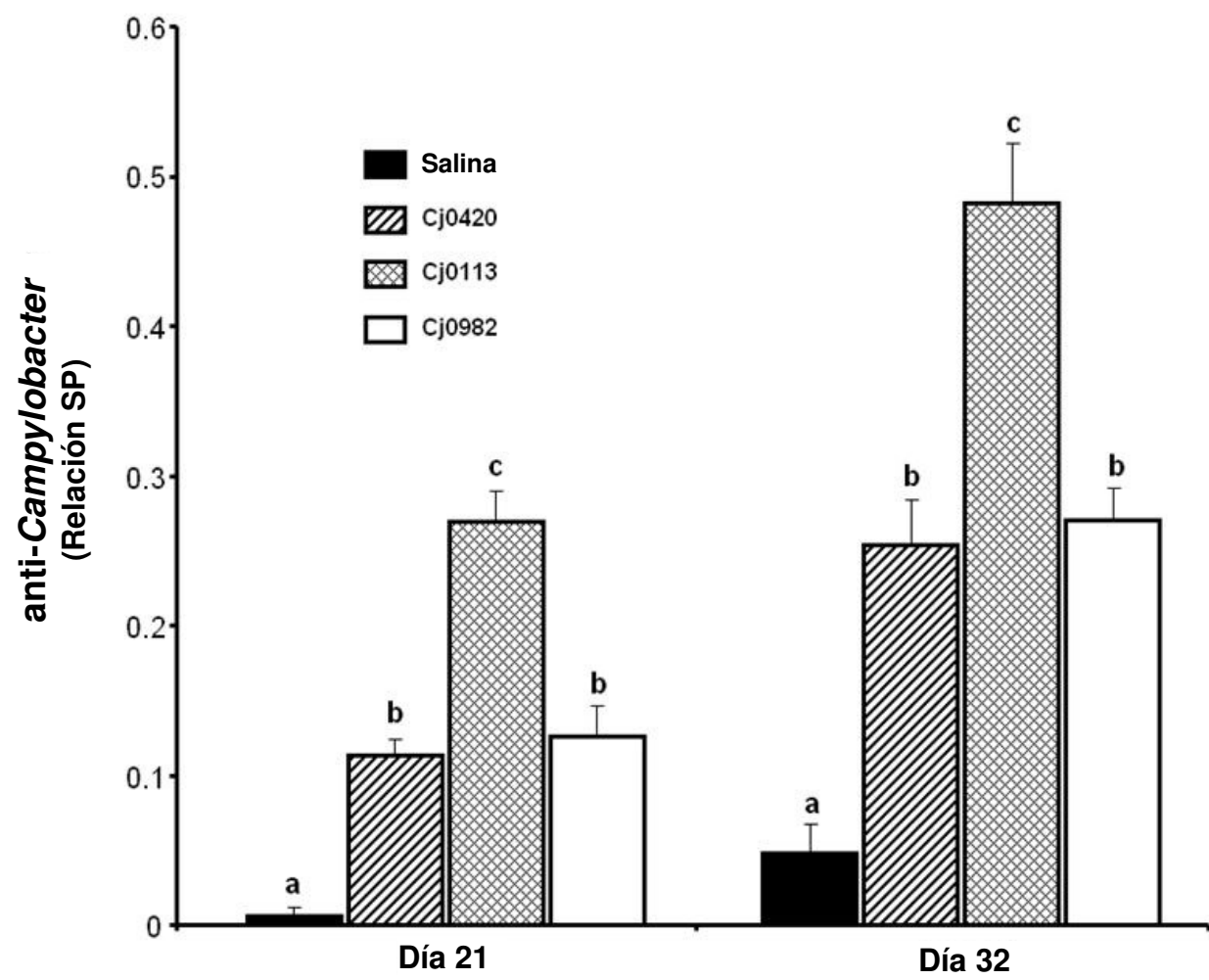


Figura 4.

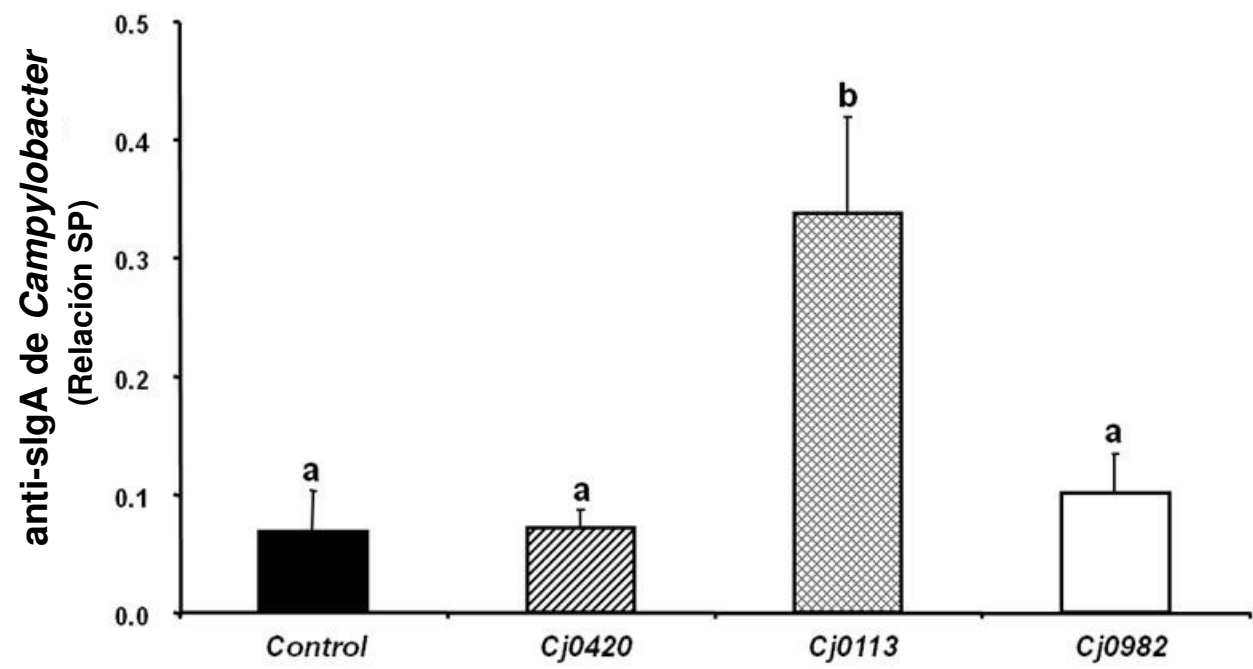


Figura 5.

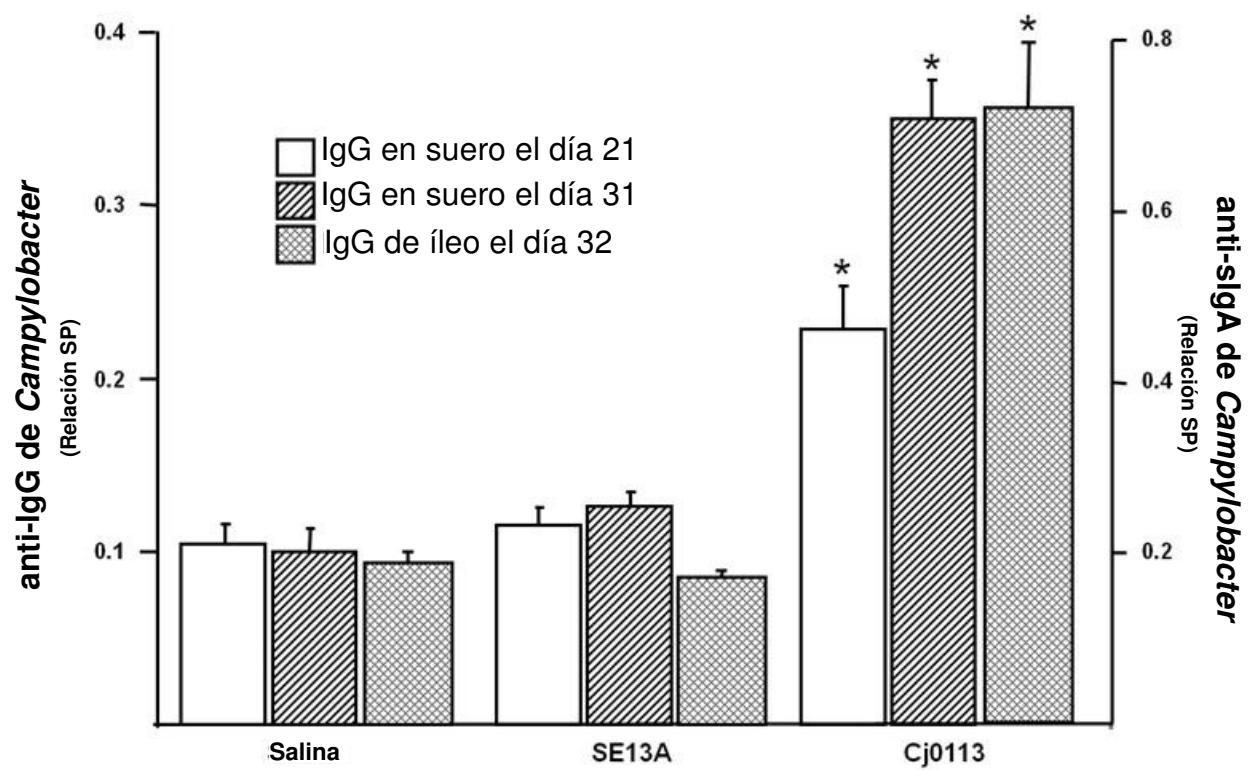


Figura 6.

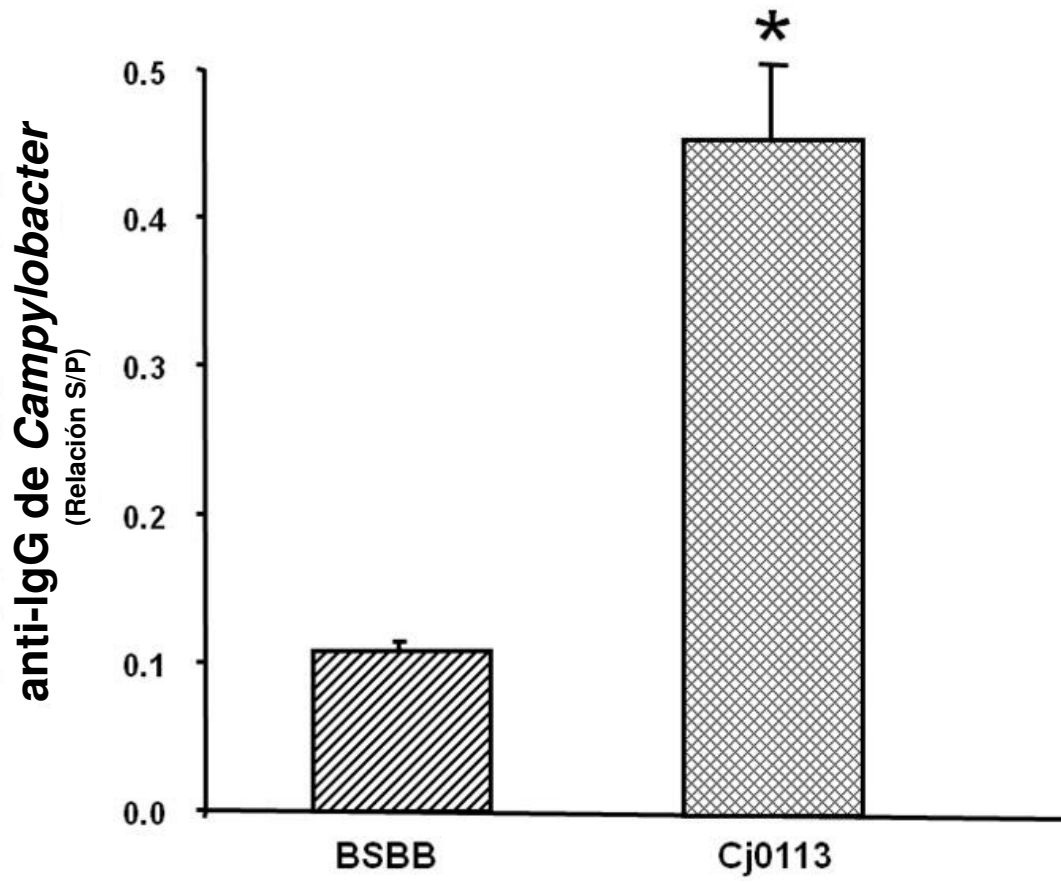


Figura 7.

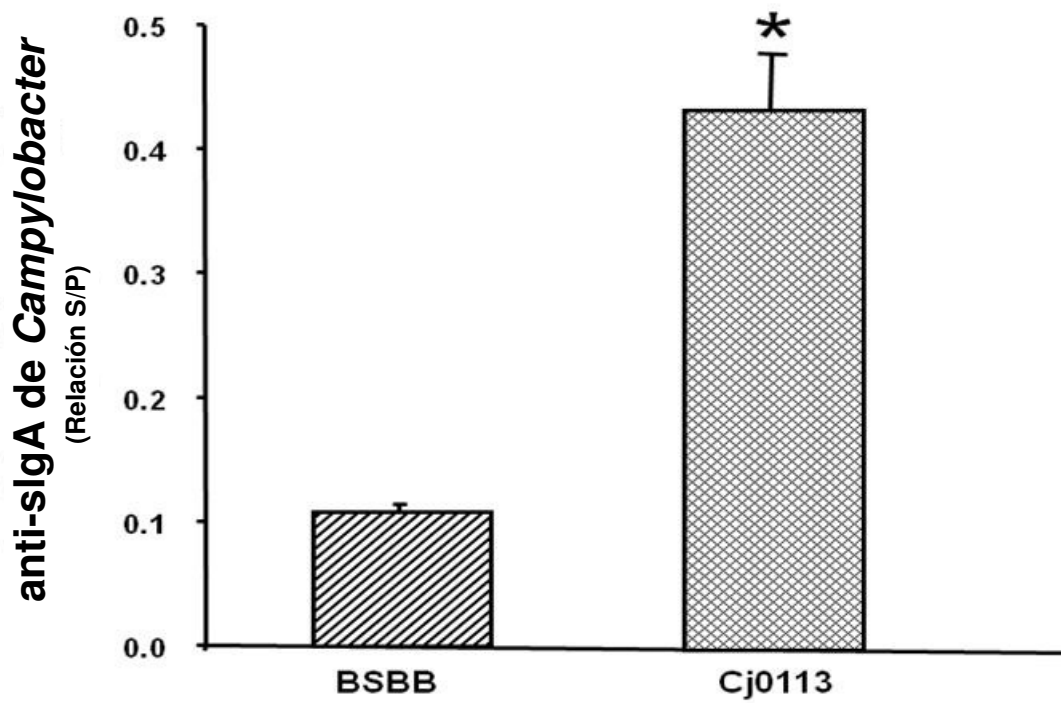


Figura 8.

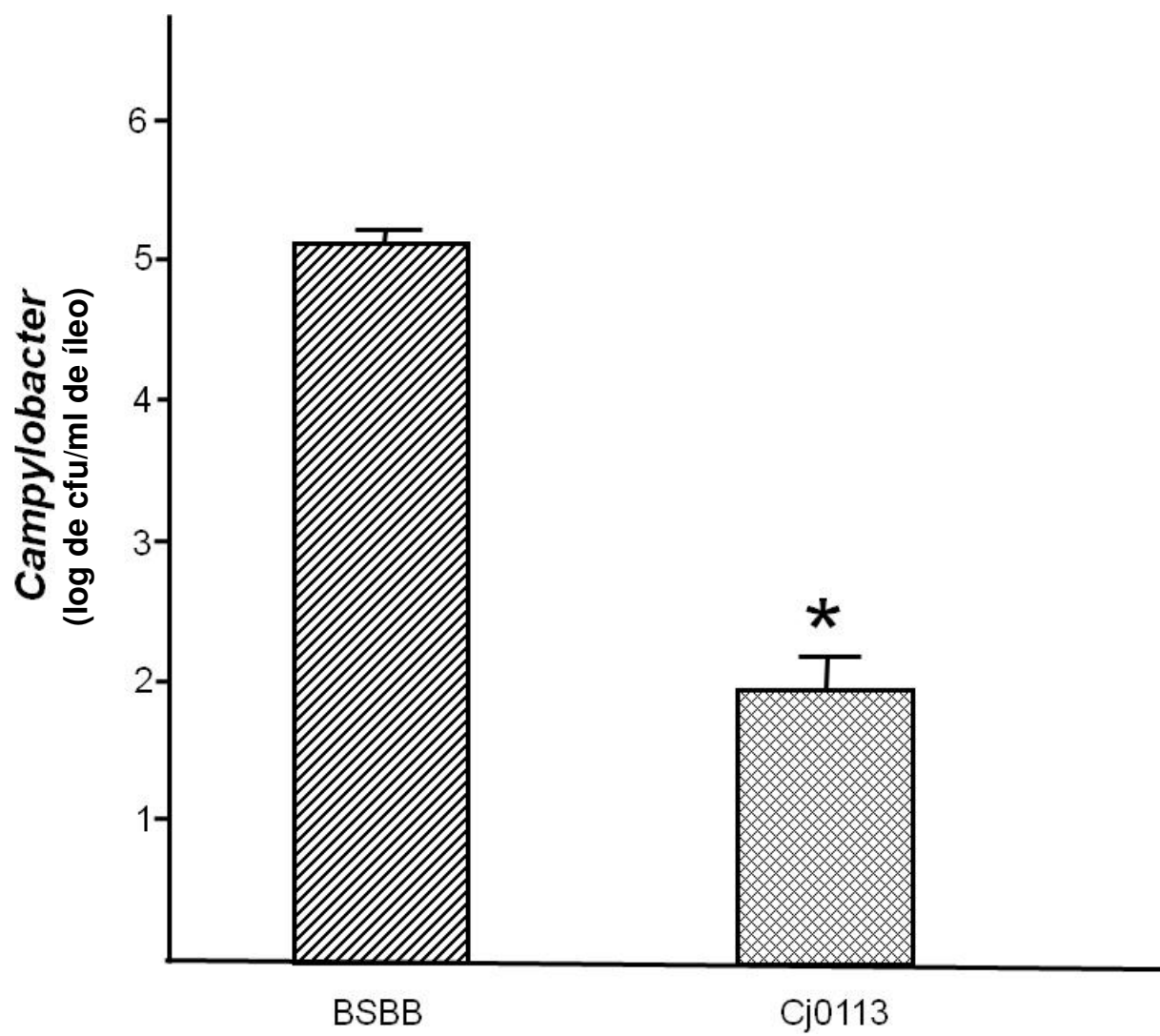


Figura 9.

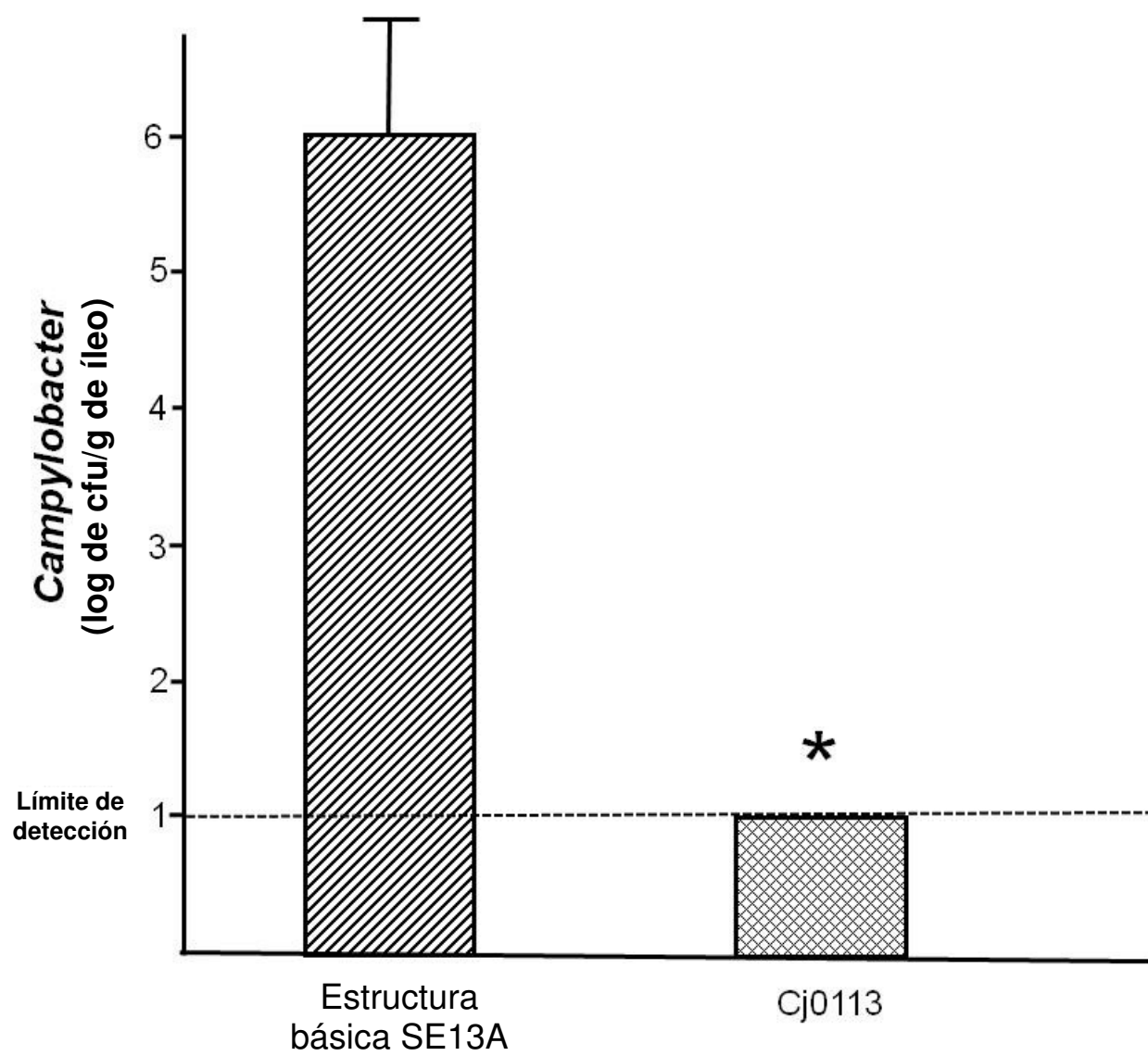


Figura 10.