República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015023024-5 B1

(22) Data do Depósito: 14/03/2014

(45) Data de Concessão: 19/04/2022

(54) Título: VETOR DE VACINA E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO O MESMO

(51) Int.Cl.: A61K 35/74.

(30) Prioridade Unionista: 15/03/2013 US 61/790,301.

(73) Titular(es): THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS; THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM.

(72) Inventor(es): LUC BERGHMAN; LISA BIELKE; OLIVIA B. FAULKNER; BILLY HARGIS; NEIL R. PUMFORD; DAAD ABI-GHANEM; SHARRYLL LAYTON.

(86) Pedido PCT: PCT US2014027416 de 14/03/2014

(87) Publicação PCT: WO 2014/152508 de 25/09/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 14/09/2015

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE APRIMORAMENTO DE RESPOSTAS IMUNES A PATÓGENOS ENTÉRICOS. São fornecidos vetores da vacina capazes de gerar uma resposta imune às bactérias entéricas e métodos de uso dos mesmos. Os vetores da vacina incluem polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo PAL. O polipeptídeo PAL pode ser expressado na superfície do vetor da vacina. O vetor da vacina também pode incluir um segundo polipeptídeo que codifica um polipeptídeo imunoestimulante como um polipeptídeo CD154 ou um polipeptídeo HMGB1.

VETOR DE VACINA E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO O MESMO

REFERÊNCIA CRUZADA A REQUERIMENTOS RELACIONADOS

[001] Este requerimento de patente reivindica o benefício de prioridade do Requerimento de Patente Provisório dos Estados Unidos N° 61/790.301, preenchido em sexta-feira, 15 de março de 2013, que está incorporado aqui para referência integralmente.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[002] Este requerimento está sendo registrado eletronicamente e inclui uma Listagem de sequência enviada eletronicamente no formato .txt. O arquivo .txt contém uma listagem de sequência intitulada "2014-03-14_5658-00203_ST25.txt" criada em 14 de março de 2014 e seu tamanho é de 31.093 bytes. A Listagem de Sequência contida neste arquivo .txt é parte da especificação e está incluída neste documento para referência integralmente.

INTRODUÇÃO

[003] As infecções bacterianas ainda representam um perigo à saúde de humanos, animais de corte e domésticos. O aumento na resistência a antibióticos tem ampliado a necessidade de se afastar do uso de antibióticos na agricultura e a necessidade de se desenvolver métodos alternativos de controle de infecções e contaminação bacterianas do suprimento de alimentos humano. ***Salmonella*** e ***E. coli*** são comumente relatados como causas bacterianas de infecções de alimento humano em todo o mundo, e a evidência epidemiológica indica que os produtos de carne, inclusive aves domésticas e produtos provenientes delas, são uma fonte significativa de infecção humana. Nos Estados Unidos estima-se que 1,4 milhão de casos de ***Salmonellosis*** humana sejam comunicados anualmente. Desses casos, ***S. enterica serovars Enteritidis*** (SE) e Typhimurium (ST) são as mais comumente isoladas, embora várias outras serovars também tenham sido identificadas como causa de enterite em humanos. Outras bactérias gram negativas responsáveis por taxas de infecção significativas incluem espécies ***Shigella*** spp, ***Vibrio*** spp, ***Erwinia*** spp, ***Kebsiella*** spp, ***Citrobacter*** spp, ***Yersinia*** spp,

Providencia spp e bactérias similares. Novos meios de controlar essas infecções bacterianas são necessários.

RESUMO

[004] É divulgado um vetor de vacina que consiste em uma primeira sequência de polinucleotídeos que codifica um polipeptídeo PAL. O polipeptídeo PAL é um polipeptídeo recombinante heterólogo não nativamente expresso no vetor da vacina. O polipeptídeo PAL é selecionado no N° ID SEQ.: 1, uma sequência com identidadei de 90% ao N° ID SEQ.: 1, como o N° ID SEQ.: 6, ou seu fragmento imunogênico de pelo menos seis aminoácidos de comprimento. O polipeptídeo pode ser expresso na superfície do vetor da vacina. O fragmento imunogênico do N° ID SEQ.: 1, pode consistir no N° ID SEQ.: 2, N° ID SEQ.: 3, N° ID SEQ.: 4, N° ID SEQ.: 5, N° ID SEQ.: 36 ou N° ID SEQ.: 37. O vetor da vacina também pode consistir em uma segunda sequência de polipeptídeo que codifica um polipeptídeo imunoestimulante. O polipeptídeo imunoestimulante também pode ser expresso na superfície do vetor da vacina. O polipeptídeo imunoestimulante pode ser um polipeptídeo CD154 capaz de ligar o polipeptídeo CD40 ou HMGB1. Os polipeptídeos CD154 incluem menos de 50 aminoácidos e consistem em aminoácidos 140-149 ou seu homólogo.

[005] De acordo com a presente invenção, as vacinas podem consistir em um vetor, como um vírus, levedura, bactérias ou lipossomos. Em um aspecto, as vacinas incluem polinucleotídeos que codificam polipeptídeos de N° ID SEQ.: 42, 44 ou 46 ou uma sequência com 90% de identidadei a uma dessas sequências. As composições farmacêuticas podem consistir nos vetores de vacina descritos aqui e em um carregador farmaceuticamente aceitável.

[006] Ainda sob outro aspecto, são fornecidos os métodos de aprimoramento de resposta imune contra uma bactéria gram-negativa em uma cobaia administrando-se à cobaia um vetor de vacina descrito aqui. A resposta imune aprimorada pode ser uma resposta aprimorada do anticorpo, uma resposta aprimorada da célula T ou uma combinação de ambas.

[007] Ainda sob outro aspecto, são fornecidos os métodos de redução de morbidez ou mortalidade associadas à infecção com uma

bactéria gram-negativa em uma cobaia administrando-se à cobaia um vetor de vacina descrito aqui. O vetor da vacina é capaz de reduzir a morbidez e a mortalidade associadas à infecção subsequente com uma bactéria gram-negativa em cobaias que receberam o vetor da vacina quando comparado aos controles.

DESCRIÇÃO BREVE DOS DESENHOS

[008] A figura 1 é um gráfico que mostra os níveis de anticorpos IgG de soro específicos da sequência PAL conforme determinado por ELISA com PAL-BSA sintético como antígeno de revestimento no dia 17 após a vacinação por gavagem oral com salina ou espinha dorsal do Bacillus (BS BB) ou candidatos à vacina BS vetorada de PAL (BS PAL) em 10^8 cfu/frango. Os resultados são apresentados como taxas médias de S/P ± SEM (n=10). Os grupos com diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes com o uso de um ANOVA (P <0,05).

[009] A figura 2 é um gráfico que mostra os níveis de anticorpos sIgA de íleo específicos da sequência PAL conforme determinado por ELISA com PAL-BSA sintético como antígeno de revestimento no dia 17 após a vacinação por gavagem oral com salina ou espinha dorsal do Bacillus (BS BB) ou candidatos à vacina BS vetorada de PAL (BSNNP) em 10^8 cfu/frango. Os resultados são apresentados como taxas médias de S/P ± SEM (n=10). Os grupos com diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes com o uso de um ANOVA (P <0,05).

[010] A figura 3 é um gráfico no qual a *Salmonella typhimurium* foi enumerada em frangos que recebem salina, vacina vetorada de estrutura BSBB ou PAL-BS (BSNNP) a 10^8 cfu/frango usando a lâmina microbiológica contando nos dias 17 e 21 após a eclosão. Todos os grupos receberam a dose de desafio de $1x10^8$ cfu/ml no dia 11 após a eclosão. Os resultados são apresentados como registro$_{10}$ cfu/gram médio do conteúdo cecal + SEM (n=10). Os grupos com diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes pelo ANOVA (P <0,05).

[011] A Figura 4 é um gráfico que mostra a afinidade de dois anticorpos monoclonais (2B5 e 1B2) quando comparado ao controle (PBST) para os hexapeptídeos indicados do PAL.

[012] A Figura 5 é um gráfico que mostra as unidades de formação de colônia (cfu) da colônia de *Salmonella* Heidelberg por grama isoladas do ceco de frangos jovens de 21 dias após a vacinação com a cepa ou controle da vacina indicada. Os grupos com diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes pelo ANOVA (P <0,05).

[013] A Figura 6 é um gráfico que mostra as unidades de formação de colônia (cfu) da colônia de *Salmonella* Heidelberg por grama isoladas do ceco de frangos jovens de 21 dias e de 33 dias após a vacinação com a cepa ou controle da vacina indicada. Os grupos com um asterisco são bem diferentes pelo ANOVA (P <0,05).

[014] A Figura 7 é um gráfico que mostra o percentual de recuperação positivo de *Salmonella* Heidelberg de frangos jovens de 28 dias após a vacinação com a cepa ou controles da vacina indicada. Os grupos com diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes pelo ANOVA (P <0,05).

[015] A Figura 8 é um gráfico que mostra a porcentagem de fagocitose das cepas da vacina indicada por macrófagos de murídeo. Os grupos com diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes pelo ANOVA (P <0,05).

DESCRIÇÃO DETALHADA

[016] As vacinas convencionais contra as bactérias gram-negativas geralmente são baseadas em bactérias vias/atenuadas que são entregues em números controlados com frequência por meio da injeção. As bactérias gram-negativas são bem distintas, e a diversidade antigênica entre espécies diferentes de bactérias e entre cepas diferentes na mesma espécie tornaram mais difícil a vacinação do que contra uma única cepa ou sorotipo. As vacinas recombinantes foram desenvolvidas, mas devido à diversidade antigênica, geralmente são restritas ao aprimoramento de uma resposta imune a uma única espécie ou até mesmo a uma única cepa de bactérias. Uma vacina capaz de proteger contra vários sorotipos e contra mais de uma espécie de bactérias gram-negativas seria ideal. Além disso, uma vacina que poderia ser administrada por via oral tornaria a administração mais barata e a conformidade mais provável. É fornecida uma vacina que

compreende uma região altamente conservada de PAL, uma lipoproteína associada a peptídeoglicano encontrada amplamente em organismos gram-negativos.

[017] As tecnologias recombinantes de DNA permitem a manipulação relativamente fácil de muitas espécies de levedura, bactérias e vírus. Alguns microorganismos são levemente patogênicos ou não patogênicos, mas são capazes de gerar uma resposta imune robusta. Esses microorganismos tornam atraentes os vetores da vacina para obter uma resposta imune aos antígenos de modo recombinante expresso no vetor. As vacinas vetoradas por microorganismos podem imitar uma infecção natural, ajudar a produzir imunidade mucosa robusta e de longa duração e sua produção e administração podem ser relativamente baratas. Muitos desses vetores de vacina podem ser administrados por via oral, o que reduz o custo e a necessidade de profissionais para administração e reduz a resistência à administração. Além disso, esses vetores podem muitas vezes carregar mais de um antígeno e ter capacidade de oferecer proteção contra vários agentes infecciosos.

[018] Uma vacina inclui qualquer composição que consiste em um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo antigênico que é capaz de produzir uma resposta imune ao polipeptídeo. Um vetor de vacina é uma composição que pode ser projetada para carregar antígenos e opcionalmente outros polipeptídeos imunoestimulantes e também pode consistir em um adjuvante ou ser administrado com um adjuvante para aumentar mais a resposta imune ao parasita e fornecer proteção melhor contra morbidez e mortalidade associadas a uma infecção subsequente. É divulgado aqui o uso de vetores, como vetores bacterianos, virais ou de levedura, para vacinação e geração de respostas imunes contra patógenos entéricos. Os patógenos entéricos podem incluir, sem limitação, ***E. coli***, ***Salmonella*** e outros microorganismos entéricos incluídos na Tabela 1, nos Exemplos. As respostas imunes após a administração dos vetores da vacina descrita aqui não precisam ser totalmente protetoras, mas podem diminuir a morbidez ou

mortalidade percentual (ou seja, probabilidade de mortalidade) associada à infecção subsequente com um patógeno entérico.

[019] Sob um aspecto, é fornecido um vetor de vacina que consiste em uma primeira sequência de polinucleotídeo que codifica pelo menos um N° ID SEQ.: 1-6, 32, 36 ou 37 ou um fragmento imunogênico com pelo menos seis aminoácidos de qualquer uma dessas sequências. É fornecido o vetor da vacina que também pode incluir um segundo polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo imunoestimulante. De maneira adequada, o polipeptídeo PAL ou seus fragmentos imunogênicos e o polipeptídeo imunoestimulante são expressos na superfície do vetor da vacina. Os fragmentos imunogênicos do polipeptídeo do N° ID SEQ.: 1 pode consistir em qualquer um ou em uma combinação de N°s ID SEQ.: 2-5 ou 36-40 ou qualquer outro fragmento de pelo menos seis aminoácidos. Por exemplo, o polipeptídeo antigênico pode consistir essencialmente em ou pode consistir no N° ID SEQ.: 1, N° ID SEQ.: 2, N° ID SEQ.: 3, N° ID SEQ.: 4, N° ID SEQ.: 5, N° ID SEQ.: 6, N° ID SEQ.: 32, N° ID SEQ.: 36, N° ID SEQ.: 37 ou um fragmento imunogênico ou combinação de qualquer um dos N°s ID SEQ.

[020] Um fragmento imunogênico do polipeptídeo antigênico rombóide pode ser uma sequência que tenha pelo menos 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ou 20 aminoácidos de comprimento e tenha pelo menos identidade de pelo menos 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% com os N°s ID SEQ. fornecidos aqui. Uma vacina inclui qualquer composição que consiste em um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo antigênico que é capaz de produzir uma resposta imune ao polipeptídeo em uma cobaia que recebeu a vacina. É divulgado o uso de vetores, como vetores bacterianos para vacinação e geração de respostas imunes contra bactérias entéricas, incluindo sem limitação ***Salmonella*** spp, ***Escherichia*** spp, ***Shigella*** spp, ***Vibrio*** spp, ***Erwinia*** spp, ***Kebsiella*** spp, ***Citrobacter*** spp, ***Yersinia*** spp, ***Providencia*** spp ou bactérias semelhantes como aquelas listadas na Tabela 1.

[021] Os polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos antigênicos fornecidos aqui e outros antígenos provenientes de

qualquer número de organismos patogênicos podem ser inseridos no vetor e expressos no vetor. A expressão desses polinucleotídeos pelo vetor permitirá a geração de uma resposta imune aos polipeptídeos antigênicos após a imunização da cobaia. Os polinucleotídeos podem ser inseridos no cromossomo do vetor ou codificados em plasmídeos ou outro DNA extracromossomo. Os especialistas na arte reconhecerão que existem várias metodologias para obter expressão de polinucleotídeos nos vetores, como *Salmonella* ou *Bacillus*. Os polinucleotídeos podem ser conectados de maneira operável a um promotor (por ex., um promotor constituinte, um promotor que pode ser induzido etc.) pelos métodos conhecidos por especialistas na arte. De maneira adequada, os polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos antigênicos são inseridos em um vetor, por ex., um vetor bacteriano, de modo que o polinucleotídeo seja expresso.

[022] Os polinucleotídeos que codificam o PAL ou outros polipetídeos antigênicos podem ser inseridos na estrutura em um polinucleotídeo que codifica uma proteína transmembranar. O polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo antigênico pode ser inserido na sequência do polinucleotídeo do vetor para permitir a expressão do polipeptídeo antigênico na superfície do vetor. Por exemplo, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo antigênico pode ser inserido na estrutura no polinucleotídeo do vetor em uma região que codifica uma área de ciclo externo de uma proteína transmembranar de modo que a sequência do polinucleotídeo do vetor permaneça na estrutura. Em uma representação, o primeiro polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo antigênico pode ser inserido no ciclo 9 do gene *lamB* de *Salmonella* conforme descrito nos Exemplos. Como alternativa, o polinucleotídeo poderia ser inserido no polinucleotídeo, como o gene *cotB* do *Bacillus*.

[023] Em outra representação, o primeiro polinucleotídeo é inserido em ou aplicado em uma superfície exposta de uma proteína ligada à parede da célula, mas não é uma proteína transmembranar. A proteína pode ser uma proteína secretada ancorada ou fixada à parede da célula por meio de uma âncora de

proteína ou lipídeo. Por exemplo, o polinucleotídeo pode ser inserido na extremidade 3' da proteína de ligação de fibronectina (FbpB) da ***Bacillus subtilis***. Como alternativa, o primeiro polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo antigênico pode ser inserido em um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo secretado.

[024] Os especialistas na arte perceberão que o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo antigênico pode ser inserido em uma ampla variedade de polinucleotídeos vetores para fornecer a expressão e a apresentação do polipeptídeo antigênico às células imunes de uma cobaia tratada com a vacina. O polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo antigênico pode ser incluído em uma única cópia ou mais. Várias cópias podem ser inseridas em um local ou mais além de um local dentro do cromossoma ou fora do cromossomo do vetor da vacina.

[025] De maneira adequada, o primeiro polinucleotídeo codifica o N° ID SEQ.: 1, N° ID SEQ.: 6, ou seu fragmento imunogênico de pelo menos seis ou mais aminoácidos, como N° ID SEQ.: 2-5 ou 36-40. O vetor pode incluir mais de uma cópia do primeiro polinucleotídeo ou pode incluir vários polinucleotídeos antigênicos destinados a patógenos iguais ou diferentes. Nos exemplos, os N°s ID SEQ.: 1-6, 32, 36 e 37 se mostraram imunogênicos. N°s ID SEQ.: 1 (EGHADERGTPEYNISLGER) e 8 (TVEGHADERGTPEYNISLG) estão incorporados em um vetor de ***Bacillus*** ou ***Salmonella*** nos Exemplos. É contemplada especificamente a combinação dos epítopos de mais de um polipeptídeo de um único patógeno ou alvo ou combinação dos epítopos de patógenos ou alvos distintos. Os polinucleotídeos podem ser inseridos no vetor separadamente ou podem ser inseridos como uma proteína de fusão que contém mais de um único epítopo. Nos exemplos, os N°s ID SEQ.: 1 (PAL) e 31 (CJ0113) foram incorporados em um vetor de ***Bacillus*** (consulte o N° ID SEQ.: 42, 44 e 46 e os Exemplos). De maneira adequada, a parte do polipeptídeo antigênico inserida no vetor é imunogênica. Um fragmento imunogênico é um peptídeo ou polipeptídeo capaz de produzir uma resposta imune celular ou humoral ou capaz de reduzir a morbidez ou mortalidade associada

à infecção subsequente com o patógeno alvo ou um patógeno relacionado.

[026] Um polipeptídeo antigênico inclui qualquer polipeptídeo imunogênico. Os polipeptídeos antigênicos incluem, sem limitação, antígenos relacionados a patógenos, alérgenos, tumores ou doenças. Os patógenos incluem patógenos virais, parasíticos, fúngicos e bacterianos, bem como patógenos de proteína, como príons. Os polipeptídeos antigênicos podem ser proteínas de comprimento completo ou suas partes. É bem estabelecido que o reconhecimento de muitas proteínas pelo sistema imune é baseado em um número relativamente pequeno de aminoácidos, às vezes referido como epítopo. Os epítopos podem ter apenas 4-8 aminoácidos. Dessa forma, os polipeptídeos antigênicos descritos aqui podem ser sequências de comprimento completo, epítopos de quatro aminoácidos de comprimento ou qualquer porção entre esses extremos. Na verdade, o polipeptídeo antigênico pode incluir mais de um epítopo de um único patógeno ou proteína. Os polipeptídeos antigênicos podem ter identidade de pelo menos 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% com os N°s ID SEQ. fornecidos aqui. De maneira adequada, um fragmento antigênico de um polipeptídeo pode ser de quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, doze, quinze, dezessete ou mais aminoácidos consecutivos do N° ID SEQ.: 1-6, 32, 36 ou 37.

[027] Várias cópias do mesmo epítopos ou vários epítopos de diferentes proteínas podem ser incluídas no vetor da vacina. Os epítopos no vetor da vacina podem estar relacionados e ser homólogos para permitir o direcionamento de vários patógenos relacionados a um único vetor da vacina. É previsto que vários epítopos ou antígenos de patógenos ou doenças iguais ou diferentes possam ser administrados em conjunto com um único vetor da vacina para gerar uma resposta imune aprimorada contra vários antígenos. Os vetores da vacina recombinante podem codificar antígenos de vários microorganismos, vírus ou tumores patogênicos associados aos antígenos. A administração dos vetores de vacina capazes de expressar vários antígenos tem a vantagem de induzir imunidade contra duas ou mais doenças ao

mesmo tempo, fornecendo proteção mais ampla contra várias cepas de um único patógeno ou uma resposta imune mais robusta contra um único patógeno. Nos Exemplos, os vetores da vacina incluem o polipeptídeo antigênico PAL do N° ID SEQ.: 1 e um polipeptídeo antigênico ***Campylobacter*** de N° ID SEQ.: 31 já demonstrado eficaz na melhora da resposta imune à ***Campylobacter*** no Requerimento de Patente Internacional N° WO2011/156619.

[028] Os especialistas na arte notarão que os polipeptídeos antigênicos de outros patógenos podem ser usados nos vetores da vacina para melhorar a resposta imune contra mais de um patógeno em uma única vacina. Seria vantajoso administrar uma única vacina direcionada contra vários patógenos. É prevista uma vacina capaz de produzir resposta imune a um patógeno entérico, como ***E. coli***, juntamente com Influenza, Salmonela, Campylobacter ou outros patógenos. Por exemplo, o segundo polipeptídeo antigênico pode ser um polipeptídeo de Influenza, de maneira adequada, é um polipeptídeo de Influenza H5N1 ou um polipeptídeo associado a várias cepas do vírus da Influenza, como um polipeptídeo da proteína M2 da Influenza. O ectodomínio da proteína M2 do vírus da Influenza A, conhecida como M2e, se projeta na superfície do vírus. A parte M2e da proteína M2 contém aproximadamente 24 aminoácidos. O polipeptídeo M2e varia um pouco de um isolado para o próximo na Influenza. Na verdade, apenas algumas mutações que ocorrem naturalmente no M2e foram isoladas em humanos infectados desde a epidemia da gripe de 1918. Além disso, os vírus de influenza isolados de hospedeiros aviários e suínos têm sequências de M2e diferentes, embora ainda conservadas. Para revisões de sequências de polipeptídeos M2e isolados em hospedeiros humanos, aviários e suínos, consulte Liu et al., Microbes and Infection 7:171-177 (2005) e Reid et al., J. Virol. 76:10717-10723 (2002), sendo cada um deles incorporados aqui para referência integralmente. De maneira apropriada, todo o polipeptídeo M2e pode ser inserido no vetor da vacina ou pode ser usada apenas uma parte. Um polipeptídeo de oito aminoácidos (LM2 com sequência de aminoácidos: EVETPIRN, N° ID SEQ.: 9 ou seu M2eA variante com uma sequência de aminoácidos

EVETPTRN, N° ID SEQ.: 10) foi incorporado no vetor da vacina e se demonstrou a geração de uma resposta do anticorpo após a administração em frangos. Consulte a Publicação norte-americana n° 2011/0027309, que está incorporada aqui para referência integralmente.

[029] Outros epítopos adequados para inclusão em um vetor de vacina para aprimorar uma resposta imune a Influenza A incluem, sem limitação, polipeptídeos da hemaglutinina (HA) ou a proteína nuclear (NP) da Influenza A. Por exemplo, os peptídeos de N° ID SEQ.: 11, N° ID SEQ.: 12, N° ID SEQ.: 13 ou N° ID SEQ.: 14 pode ser incluído em um vetor da vacina. Um especialista na arte perceberá que qualquer uma dessas sequências pode ser usada em conjunto com qualquer outro epítopo, inclusive epítopos derivados de outros patógenos ou antígenos.

[030] Por exemplo, o polipeptídeo antigênico PAL fornecido aqui pode ser combinado com outros polipeptídeos antigênicos de bactérias gram-negativas, como aquelas incluídas no Requerimento de Patente Norte-americano N° US2011/0159026 ou Publicação Internacional N° WO 2011/156619, ambos incluídos neste documento para referência integralmente. A combinação de vários polipeptídeos antigênicos, um dos quais fornece ampla imunidade a várias bactérias gram-negativas e outras que são mais específicas para bactérias gram-negativas podem oferecer proteção superior contra infecção subsequente.

[031] As moléculas imunoestimulantes incluídas como parte do vetor da vacina poderiam ativar potencialmente as partes do sistema imune essenciais para proteção de longa duração. Os polipeptídeos imunoestimulantes podem ser polipeptídeos capazes de estimular uma resposta imune simples ou adaptável. Os polipeptídeos imunoestimulantes não são associados de forma nativa ao vetor da vacina e são polipeptídeos associados de forma nativa a um sistema imune vertebrado, como o do paciente no qual a vacina será administrada. Dois polipeptídeos imunoestimulantes são descritos aqui, ou seja, os polipeptídeos CD154 e High Mobility Group Box 1 (HMGB1), mas um especialista na arte notará que outros polipeptídeos imunoestimulantes

poderiam ser usados de maneira isolada ou em conjunto com aqueles descritos aqui.

[032] Os polinucleotídeos adicionais que codificam os polipeptídeos envolvidos no acionamento do sistema imune também podem ser incluídos em um vetor da vacina. Os polinucleotídeos podem codificar as moléculas do sistema imune conhecidas por seus efeitos estimulantes, como uma interleucina, fator de necrose tumoral, interferon ou outro polinucleotídeo envolvido na regulação imune. A vacina também pode incluir polinucleotídeos que codificam os peptídeos conhecidos por estimular uma resposta imune, como os polipeptídeo CD154 ou HMGB1 descritos aqui.

[033] O HMGB1 é secretado pelas células macrófagas danificadas e ativadas e atua como um mediador de citocina de inflamação, afetando a resposta imune inata. Partes da sequência de HMGB1 foram incluídas nos vetores da vacina descritos nos exemplos. A proteína HMGB1 (High Mobility Group Box-1) foi identificada primeiro como uma proteína de ligação de DNA essencial para a estrutura e a estabilidade do DNA. É uma proteína nuclear expressada de maneira simultânea que liga o DNA sem especificidade de sequência. A proteína é altamente conservada e encontrada desde plantas a mamíferos. As sequências de aminoácidos HMGB1 de bandeira-paulista, frangos e seres humanos são fornecidas no N° ID SEQ.: 23, N° ID SEQ.: 15 e N° ID SEQ.: 22, respectivamente. A sequência em todos os mamíferos é altamente conservada com aminoácido de identidade de 98%, e as mudanças do aminoácido são conservadoras. Dessa forma, uma proteína HMGB1 de uma espécie provavelmente pode ser substituída pela funcionalidade de outras espécies. A proteína HMGB1 de comprimento completo ou parte dela pode ser usada como polipeptídeo HMGB1 nos vetores da vacina descritos aqui. A HMGB1 tem duas regiões de ligação de DNA denominadas caixa A conforme mostrado no N° ID SEQ.: 16 e 17 e caixa B conforme mostrado no N° ID SEQ.: 18 e 19. Consulte Andersson e Tracey, Annu. Rev. Immunol. 2011, 29:139-162, que está incorporada aqui para referência integralmente.

[034] A HMGB1 é um mediador de inflamação e atua como um sinal de dano nuclear, como a partir das células necróticas. A HMGB1 pode ser ativamente secretada pelas células da linhagem monócita/macrófaga em um processo que requer acetilação da proteína, transferência entre o núcleo e a secreção. A HMGB1 extracelular atua como uma potente mediadora de inflamação sinalizando via receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada (RAGE, Receptor for Advanced Glycated End), em particular TLR4. A atividade de ligação RAGE foi identificada e requer o polipeptídeo do N° ID SEQ.: 20. A ligação TLR4 requer a cisteína na posição 106 do N° ID SEQ.: 15, que está localizado na região da caixa B da HMGB1.

[035] As atividades inflamatórias de HMGB1 não exigem a proteína de comprimento completo, e os fragmentos funcionais foram identificados. A caixa B se mostrou ser suficiente para mediar os efeitos pró-inflamatórios de HMGB1 e, dessa forma, o N° ID SEQ.: 18 e 19 são polipeptídeos HMGB1 ou seus fragmentos funcionais no contexto da presente invenção. Além disso, o local da ligação RAGE e a atividade da citocina pró-inflamatória foram mapeados para o N° ID SEQ.: 20 e N° ID SEQ.: 21, respectivamente. Dessa forma, esses polipeptídeos são fragmentos funcionais dos polipeptídeos HMGB1 no contexto da presente invenção.

[036] Os especialistas na arte são capazes de identificar os polipeptídeos HMGB1 e seus fragmento capazes de estimular a atividade de citocina pró-inflamatória usando métodos como aqueles na Publicação Internacional N° WO02 092004, que está incorporada aqui para referência integralmente. De maneira adequada, o polipeptídeo HMGB1 inclui o domínio de ligação RAGE nos aminoácidos 150-183 do N° ID SEQ.: 15 (N° ID SEQ.: 20 ou seu homólogo), e o domínio da atividade de citocina pró-inflamatória entre os aminoácidos 89-109 do N° ID SEQ.: 15, (N° ID SEQ.: 21 ou seu homólogo). Em particular, os polipeptídeos HMGB1 e seus fragmentos funcionais ou homólogos incluem polipeptídeos idênticos a ou pelo menos 99% idêntico, pelo menos 98% idêntico, pelo menos 95% idêntico, pelo menos 90% idêntico, pelo menos 85%

idêntico ou pelo menos 80% idêntico aos polipeptídeos HMGB1 dos N°s ID SEQ.: 15 ou 16-23.

[037] Conforme descrito em mais detalhes abaixo, um vetor de vacina pode incluir um polipeptídeo CD154 que é capaz de fazer a ligação de CD40 na cobaia e estimular a cobaia a responder ao vetor e seu antígeno associado. O envolvimento das células dendríticas (DCs) é essencial para o início de uma resposta imune poderosa, pois elas possuem uma capacidade única de ativar a expansão e a diferenciação das células T simples em células efetoras. A função da DC, que é uma célula de apresentação de antígeno (APC) encontrada em praticamente todos os tecidos do corpo, é capturar antígenos, transportá-los ao tecido linfoide associado e depois apresentá-los às células T simples. Após a ativação pelas DCs, as células T expandem, são diferenciadas em células efetoras, deixam os órgãos imunes secundários e entram nos tecidos periféricos. As células T citotóxicas (CTLs) ativadas são capazes de destruir as células infectadas por vírus, células tumorais ou até mesmo APCs infectadas com parasitas intracelulares (por ex., ***Salmonella***) e se mostraram essenciais na proteção contra infecção viral. A CD40 é um membro da família receptora de TNF de moléculas e é expressada em vários tipos de células, incluindo células de apresentação de antígeno (APCs) profissionais, como células DCs e B. A interação de CD40 com seu ligante CD154 é extremamente importante e estimulante para as imunidades humoral e celular. O estímulo de DCs via CD40, expresso na superfície de DCs, pode ser estimulado por quaisquer anticorpos anti-CD40. Entretanto, no corpo isso ocorre pela interação com o ligante natural para CD40 (ou seja, CD154) expresso na superfície das células T ativadas. Curiosamente, as regiões de ligação de CD40 de CD154 foram identificadas. A região de ligação de CD40 de CD154 pode ser expressada na superfície de um vetor, como um vetor de ***Salmonella*** ou ***Bacillus*** e resulta em uma resposta imune aprimorada contra uma sequência de peptídeos coapresentada, conforme mostrado nos exemplos fornecidos aqui e na Publicação da patente norte-americana N° 2011/0027309, que está incorporada

aqui para referência integralmente. Um polipeptídeo CD154 pode ser uma parte da proteína de comprimento completo CD154 ou a proteína CD154 inteira. De maneira adequada, o polipeptídeo CD154 é capaz de fazer a ligação de CD40.

[038] Conforme discutido acima, um polipeptídeo CD154 que codifica um polipeptídeo CD154 que é capaz de aprimorar a resposta imune ao antígeno pode ser incluído na vacina. De maneira adequada, o polipeptídeo CD154 é mais curto do que 50 aminoácidos de comprimento, mais adequadamente menor que 40, menor que 30 ou menor que 20 aminoácidos de comprimento. O polipeptídeo pode ter entre 10 e 15 aminoácidos, entre 10 e 20 aminoácidos ou entre 10 e 25 aminoácidos de comprimento. A sequência CD154 e a região de ligação CD40 não são altamente conservadas entre as várias espécies. As sequências de CD154 de frangos e seres humanos são fornecidas no N° ID SEQ.: 24 e N° ID SEQ.: 25, respectivamente.

[039] As regiões de ligação CD40 de CD154 foram determinadas por várias espécies, inclusive seres humanos, frangos, patos, ratos e gado e são mostradas no N° ID SEQ.: 26, N° ID SEQ.: 27, N° ID SEQ.: 28, N° ID SEQ.: 29 e N° ID SEQ.: 30, respectivamente. Embora haja variabilidade nas sequências na região de ligação CD40 entre as espécies, o polipeptídeo CD154 humano foi capaz de melhorar a resposta imune em frangos. Portanto, é possível executar a invenção usando polipeptídeos CD154 específicos da espécie ou polipeptídeo CD154 heterólogo. Dessa forma, os polipeptídeos CD154 do N° ID SEQ.: 24-30 pode ser incluído em um vetor de vacina ou um polipeptídeo em pelo menos 99, 98, 97, 96, 95, 93, 90 ou 85% idênticos nas sequências de N° ID SEQ.: 24-30 pode ser incluído em um vetor da vacina.

[040] O polipeptídeo de CD154 estimula uma resposta imune pelo menos em parte ligando-se a seu receptor, CD40. Um polipeptídeo homólogo ao polipeptídeo CD154 que é expresso em células imunes da cobaia e que é capaz de se ligar ao receptor CD40 em macrófagos e outras células de apresentação de antígeno. A ligação deste complexo ligante-receptor estimula o macrófago (e células de linhagem dos macrófagos, como células dendríticas)

para melhorar a fagocitose e a apresentação de antígeno enquanto aumenta as secreções de citocina conhecidas por ativar outras células imunes locais (como linfócitos B). Desse modo, as moléculas associadas ao peptídeo CD154 são preferencialmente direcionadas para a geração de resposta imune e produção expandida de anticorpo.

[041] Os polipeptídeos antigênicos e os polipeptídeos imunoestimulantes são distribuídos por meio de um vetor de vacina. Os vetores de vacina podem ser baseados em bactérias, levedura, vírus ou lipossomos. Vetores de vacina em potencial incluem, sem limitação, ***Bacillus*** (***Bacillus subtilis***), ***Salmonella*** (***Salmonella enteritidis***), ***Shigella***, ***Escherichia*** (***E. coli***), ***Yersinia***, ***Bordetella***, ***Lactococcus***, ***Lactobacillus***, ***Streptococcus***, ***Vibrio*** (***Vibrio cholerae***), ***Listeria***, levedura como ***Saccharomyces*** ou ***Pichia***, adenovírus, vírus da varíola, herpes-vírus, alfavírus e vírus adenoassociados. Os vetores de vacina de bactéria viva, levedura ou vírus ainda podem representar riscos aos indivíduos imunocomprometidos e requerem uma análise reguladora adicional detalhada. Dessa forma, é desejado o uso de vetores que são eliminados ou inativos ou qualificados como organismos geralmente reconhecidos como seguros (Generally Recognized As Safe, GRAS) pelo Food and Drug Administration (FDA). O problema é a geração de uma resposta imune robusta com o uso de tais vetores. Métodos de inativação ou eliminação de vetores de vacina bacterianos, de levedura ou virais são conhecidos pelos especialistas na arte e incluem, sem limitação, os métodos como inativação de formalina, inativação baseada em antibiótico, tratamento térmico e tratamento com etanol. Ao incluir um polipeptídeo imunoestimulante, como o polipeptídeo HMGB1 (caixa 1 do grupo de alta mobilidade), na superfície do vetor da vacina, podemos gerar uma resposta imune robusta contra um polipeptídeo antigênico com o uso de um vetor de ***Bacillus*** ou outro vetor GRAS. Na verdade, esses vetores podem ser inativados de modo que não possa reproduzir e ainda gerar uma resposta imune robusta após a administração. Os vetores da vacina podem ser bactéria do tipo selvagem, leveduras ou vírus que não são

patogênicos. Como alternativa, os vetores podem ser atenuados de modo que o vetor tenha capacidade limitada de se reproduzir no hospedeiro ou não seja capaz de crescer sem um meio complementar mais do que algumas gerações. Os especialistas na arte perceberão que há várias maneiras de atenuar os vetores e meios de fazê-lo.

[042] Pelo menos uma parte do polipeptídeo antigênico e pelo menos uma parte do polipeptídeo imunoestimulante estão presentes ou são expressos na superfície do vetor da vacina. Presente na superfície do vetor da vacina, inclui polipeptídeos incluídos em um ciclo externo de uma proteína transmembranar que interage com, por exemplo, de maneira covalente ou química com ligação cruzada a, uma proteína transmembranar, um lipídeo de membrana, ou carboidrato ou polipeptídeo ancorado na membrana. Um polipeptídeo pode ser incluído em uma proteína transmembranar com os aminoácidos consistindo no polipeptídeo ligado por meio de uma ligação de peptídeo ao terminal N, terminal C ou qualquer local dentro da proteína transmembranar (isto é, inserida entre dois aminoácidos da proteína transmembranar ou no lugar de um ou mais aminoácidos da proteína transmembranar (isto é, exclusão-inserção)). De modo adequado, os polipeptídeos podem ser inseridos em um ciclo externo de uma proteína transmembranar. As proteínas transmembranares são *srtA*, *cotB* e *lamB*, mas os especialistas na arte perceberão que muitas proteínas transmembranares estão disponíveis. Os polipeptídeos podem ser ligados a uma proteína ancorada à parede da célula ou membrana ou lipídeo de modo que o polipeptídeo antigênico e o polipeptídeo imunoestimulante sejam expressos na superfície do vetor da vacina.

[043] Conforme descrito anteriormente, os polipeptídeos que codificam os polipeptídeos antigênico ou imunoestimulantes podem ser inseridos no cromossomo do vetor ou mantidos fora do cromossomo (por ex., em um plasmídeo, BAC ou YAC). O especialista na arte notará que esses polinucleotídeos podem ser inseridos na estrutura em vários polinucleotídeos e expressos em diferentes partes do vetor ou poderão ser secretados. O

polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo imunoestimulante capaz de melhorar a resposta imune ao polipeptídeo antigênico também pode codificar o polipeptídeo antigênico. O polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo antigênico pode ser ligado ao polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo imunoestimulante, de modo que no vetor, os dois polipeptídeos sejam partes do mesmo polipeptídeo. Nos exemplos, um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo antigênico também codifica o polipeptídeo imunoestimulante. Em uma representação, os dois polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos são inseridos na estrutura no ciclo 9 do gene *lamB* da *Salmonella enteritidis* ou outro vetor da vacina. Os especialistas na arte notarão que os polinucleotídeos bacterianos que codificam outras proteínas transmembranares e outros ciclos do gene*lamB* também podem ser usados.

[044] Como alternativa, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo antigênico e/ou o polipeptídeo imunoestimulante pode ser inserido em um polipeptídeo secretado que seja exibido ou apresentado na superfície do vetor da vacina por meio de associação a uma proteína, lipídeo ou carboidrato na superfície do vetor da vacina. Os especialistas na arte notarão que o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo antigênico e/ou o polipeptídeo imunoestimulante pode ser inserido em uma ampla variedade de polinucleotídeos de vetor da vacina para fornecer a expressão e a apresentação do polipeptídeo antigênico e/ou o polipeptídeo imunoestimulante às células imunes de uma cobaia tratada com o vetor da vacina. A região de codificação do polipeptídeo antigênico e do polipeptídeo imunoestimulante pode ser fundida ao terminal C da proteína de ligação de fibronectina do *Staphylococcus aureus* que contém um tema de classificação para sortase a partir de *Listeria*. Isso permite que as proteínas secretadas sejam ancoradas na parede celular de bactéria gram-positivas, como *Bacillus*. Consulte Nguyen e Schumann, J Biotechnol (2006) 122: 473-482, que está incorporada aqui para referência integralmente. Outros métodos semelhantes também podem ser usados.

Como alternativa, os polipeptídeos podem ser ligados de maneira covalente ou química a proteínas, lipídeos ou carboidratos na membrana, parede celular ou capsídeo se um vetor viral estiver sendo usado por meio de métodos disponíveis para especialistas na arte. Por exemplo, ligações de bissulfeto ou ligação cruzada de biotina-avidina poderiam ser usadas para apresentar os polipeptídeos antigênicos e imunoestimulantes da superfície do vetor da vacina. De maneira adequada, o polipeptídeo antigênico e o polipeptídeo imunoestimulante são parte de uma proteína de fusão. Os dois polipeptídeos pode ser diretamente ligados por uma ligação de peptídeo ou podem ser separados por um ligador, espaçador ou uma seção de uma terceira proteína na qual estão inseridos. Nos exemplos, um espaçador de aminoácido foi usado entre os polipeptídeos. Um espaçador pode ter entre 2 e 20 aminoácidos, de maneira adequada, entre 3 e 10 aminoácidos ou entre 6 e 8 aminoácidos. De maneira adequada, os aminoácidos no espaçador têm uma pequena cadeia lateral e não são alterados, como glicina, alanina ou serina. Os espaçadores podem ter combinações de resíduos de aminoácidos.

[045] Nos Exemplos, os vetores da vacina incluem o polipeptídeos antigênicos PAL (N° ID SEQ.: 1 e N° ID SEQ.: 31 (Campy Cj0113)) e o polipeptídeo imunoestimulante (HMGB1) codificado no mesmo polinucleotídeo e na estrutura entre si. Consulte o N° ID SEQ.: 42, 44 e 46. De maneira notável, nos Exemplos que usam um espaçador de três aminoácidos entre cada um dos fragmentos de polipeptídeos, o vetor da vacina no qual o polipeptídeo HMGB1 foi posicionado no terminal N ou C do inserto do vetor da vacina resultou na melhor proteção contra a infecção subsequente. O vetor da vacina com melhor desempenho foi o CJ0113 seguido pelo PAL seguido por HMGB1 (do terminal N ao C ou N° ID SEQ.: 42). Dessa forma, a ordem ou a exibição dos antígenos e polipeptídeos imunoestimulantes na superfície do vetor da vacina pode afetar a resposta imune. Nas representações alternativas, o polipeptídeo imunoestimulante e o polipeptídeo antigênico podem ser codificados por polinucleotídeos distintos. Os especialistas na arte notarão que vários métodos podem ser usados para obter

expressão do polipeptídeo antigênico e do polipeptídeo HMGB1 na superfície do vetor da vacina. Esses métodos são conhecidos por especialistas na arte.

[046] Também são fornecidas as composições que consistem no vetor da vacina e em um carregador farmaceuticamente aceitável. Um carregador farmaceuticamente aceitável é qualquer carregador adequado para administração *in vivo*. De maneira adequada, o carregador farmaceuticamente aceitável pode ser aceito para aplicação oral, nasal ou mucosal. O carregador farmaceuticamente aceitável pode incluir água, soluções tamponadas, soluções de glucose ou fluidos de cultura bacteriana. Componentes adicionais das composições podem incluir, de forma adequada, excipientes, como estabilizantes, conservantes, diluentes, emulsificantes e lubrificantes. Exemplos de carregadores ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis incluem estabilizantes, como carboidratos (por ex., sorbitol, manitol, amido, sucrose, glucose, dextrano), proteínas, como albumina ou caseína, agentes que contêm proteína, como soro bovino ou leite desnatado e tampões (por ex., tampão fosfato). Especialmente quando estes estabilizantes são adicionados às composições, a composição é adequada para secagem por liofilização ou secagem por pulverização. O vetor da vacina nas composições podem não ser capazes de realizar a replicação; de maneira adequada, o vetor da vacina é inativado ou eliminado antes da adição à composição.

[047] Também são fornecidos métodos de aprimoramento de respostas imunes em uma cobaia administrando-se um vetor da vacina. O vetor da vacina pode conter um primeiro polionucleotídeo que codifica um polipeptídeo PAL antigênico no Nº ID SEQ.: 1-6, 32, 36, 37 ou seu fragmento imunogênico. O vetor da vacina também pode incluir um segundo polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo imunoestimulante. O polipeptídeo imunoestimulante é um polipeptídeo nativamente associado a um sistema imune vertebrado e envolvido no estímulo de uma resposta imune. O polipeptídeo imunoestimulante pode estimular a resposta imune nativa ou adaptável da cobaia. De maneira adequada, pode ser usado como polipeptídeo imunoestimulante um polipeptídeo

HMGB1 ou um polipeptídeo CD154, conforme descrito de maneira mais completa acima. Nos métodos fornecidos neste documento, o vetor da vacina que consiste em um polipeptídeo PAL antigênico e, opcionalmente, em um polipeptídeo imunoestimulante é administrado a uma cobaia em uma quantidade eficaz para melhorar/efetuar uma resposta imune da cobaia ao vetor da vacina e, em particular, ao polipeptídeo antigênico e, de maneira adequada, às bactérias gram-negativas, como ***Salmonella*** e ***E. coli***.

[048] A resposta imune aprimorada pode incluir uma resposta do anticorpo ou da célula T. De maneira adequada, a resposta imune é uma resposta protetora, mas a resposta imune pode não ser totalmente protetora, mas capaz de reduzir a morbidez ou mortalidade associada à infecção. Os polipeptídeos imunoestimulantes podem ser usados para melhorar a resposta imune na cobaia a qualquer antígeno estranho ou polipeptídeo antigênico presente no vetor da vacina, além do polipeptídeo PAL antigênico. Um especialista na arte notará que o polipeptídeo imunoestimulante pode ser usado para melhorar a resposta imune a mais de um polipeptídeo antigênico presente em um vetor da vacina. O aprimoramento de uma resposta imune inclui, sem limitação, a indução a um efeito terapêutico ou profilático que é mediado pelo sistema imune da cobaia. Especificamente, o aprimoramento de uma resposta imune pode incluir, sem limitação, a produção melhorada de anticorpos, a alternância de classe melhorada de cadeias pesadas de anticorpos, a maturação das células que apresentam antígenos, o estímulo das células T auxiliares, o estímulo das células T citolíticas ou a indução da memória da célula T e B.

[049] De maneira adequada, o vetor da vacina contém um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que inclui os aminoácidos 150-183 e 89-109 do polipeptídeo HMGB1 humano (N° ID SEQ.: 15) ou seu homólogo. Nos exemplos, foi usado um polipeptídeo com 190 aminoácidos de HMGB1. De maneira adequada, o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo HMGB1 a partir da mesma espécie da cobaia. As combinações heterólogas dos

polipeptídeos HMGB1 e as cobaias (por ex., um polipeptídeo HMGB1 humano para uso em uma vacina aviária) podem ser úteis nos métodos da invenção porque o HMGB1 é altamente conservado por meio de um número amplo de espécies. O polipeptídeo HMGB1 pode ser usado para melhorar a resposta imune na cobaia a qualquer antígeno estranho ou polipeptídeo antigênico ou mais de um polipeptídeo presente dentro ou sobre o vetor da vacina. Um especialista na arte notará que o polipeptídeo HMGB1 pode ser usado para melhorar a resposta imune a mais de um polipeptídeo antigênico presente em um vetor da vacina. O polipeptídeo HMGB1 estimula uma resposta imune ao menos em parte ativando as células dendríticas e macrófagas e, dessa forma, estimulando a produção de citocinas como IL-1, IL-6, IFN-γ e TNF-α. Nos Exemplos, o polipeptídeo de HMGB1 foi expresso na superfície do vetor da vacina.

[050] O vetor da vacina pode conter adequadamente um polipeptídeo CD154 capaz de se ligar e ativar o CD40. A vacina que consiste no polinucleotídeo codificando um polipeptídeo CD154 capaz de se ligar ao CD40 é administrada a uma cobaia em uma quantidade eficaz para melhorar ou efetuar a resposta imune da cobaia à vacina. De maneira adequada, a vacina contém um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que inclui os aminoácidos 140-149 do polipeptídeo CD154 humano (N° ID SEQ.: 25) ou seu homólogo. Conforme observado acima, um homólogo do aminoácido 140-149 derivado de uma espécie pode ser usado para estimular uma resposta imune em uma espécie distinta. De maneira adequada, o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo CD154 a partir da mesma espécie da cobaia. Preferencialmente, um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de N° ID SEQ.: 26 é usado em pacientes humanos, um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo do N° ID SEQ.: 27 é usado em frangos, um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo do N° ID SEQ.: 28 é usado em patos, um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo do N° ID SEQ.: 29 é usado em ratos e um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo do N° ID SEQ.: 30 é usado em vacas. O polipeptídeo CD154 humano (N° ID SEQ.: 26) tem sido usado em uma

vacina aviária e melhorou a resposta imune a um antígeno externo. Dessa forma, outras combinações heterólogas dos polipeptídeos CD154 e cobaias podem ser úteis nos métodos da invenção.

[051] Além disso, são divulgados os métodos de aprimoramento de uma resposta imune contra uma bactéria gram-negativa selecionada entre m ***Salmonella*** spp, ***Escherichia*** spp, ***Shigella*** spp, ***Vibrio*** spp, ***Erwinia*** spp, ***Kebsiella*** spp, ***Citrobacter*** spp, ***Yersinia*** spp, ***Providencia*** spp e bactérias e métodos similares de redução de morbidez associada a uma infecção com uma bactéria gram-negativa. Resumidamente, os métodos consistem na administração de um vetor de vacina a uma cobaia compreendendo uma primeira sequência de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo PAL antigênico e, como opção, um segundo polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo imunoestimulante em uma quantidade eficaz. O polipeptídeo PAL antigênico pode incluir o N° ID SEQ.: 1-6. A inserção dos polipeptídeos PAL antigênicos no vetor pode ser realizada de várias maneiras conhecidas pelos especialistas na arte, incluindo, sem limitação, o sistema de mutação sítio dirigida sem cicatrizes descrito em BMC Biotechnol. 2007 set, 17: 7(1): 59, Scarless and Site-directed Mutagenesis in ***Salmonella*** Enteritidis chromosome, que está incorporado neste documento como referência integralmente e o método usado aqui conforme descrito em Nguyen e Schumann J Biotechnol 2006 122: 473-482, que está incorporada aqui para referência integralmente. O vetor também pode ser desenvolvido para expressar os polipeptídeos PAL antigênicos juntamente com outros polipeptídeos antigênicos de outros patógenos, incluindo vírus, como Influenza M2e ou bactérias, como ***Salmonella***, ***Campylobacter*** ou ***E. coli***. Em particular, um polipeptídeo de CD154 capaz de ligar CD40 ou HMGB1 pode ser expresso pelo vetor para melhorar a resposta imune da cobaia ao polipeptídeo PAL antigênico.

[052] As composições que contêm polipeptídeos antigênicos também podem ser usadas para diminuir a morbidez associada à infecção subsequente causada por uma bactéria gram-negativa. As composições podem impedir que as bactérias causem doenças ou

possam limitar ou reduzir qualquer morbidez associada em uma cobaia na qual as composições ou vetores de vacina descritos aqui foram administrados. As composições e os vetores da vacina descritos aqui podem reduzir a gravidade da doença subsequente diminuindo seu tempo de duração, perda de peso, gravidade dos sintomas da doença, diminuindo a morbidez ou mortalidade associada à doença ou reduzindo a probabilidade de contraí-la. As composições também podem reduzir a disseminação do patógeno inibindo a transmissão. A morbidez ou a mortalidade associada à doença após a administração dos vetores da vacina descrita aqui pode ser reduzida em 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou até 100% quando comparado com cobaias similares sem o vetor da vacina.

[053] Para administração em animais ou humanos, as composições podem ser administradas de vários meios incluindo, sem limitação, aplicação intranasal, mucosal, pulverização, intradérmica, parenteral, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa, intracraniana, oral, por aerossol ou intramuscular. A administração em gotas no olho, gavagem oral ou adição à água potável ou ao alimento também é adequada. Para aves domésticas, as composições podem ser administradas *in ovo*.

[054] Algumas representações da invenção oferecem métodos de aprimoramento de respostas imunes em uma cobaia. As cobaias adequadas podem incluir, sem limitação, vertebrados, preferencialmente mamíferos, preferencialmente uma pessoa e aves, preferencialmente aves domésticas, como frangos ou perus. Outros animais como vacas, gatos, cães ou porcos também podem ser usados. De maneira adequada, a cobaia não é humana e pode ser um animal de corte.

[055] A dosagem útil da vacina a ser administrada irá variar dependendo da idade, peso e espécie da cobaia, modo e via de administração, além do tipo de patógeno contra o qual uma resposta imune é observada. A composição pode ser administrada em qualquer dose suficiente para evocar uma resposta imune. É previsto que sejam adequadas as doses de 10^3 a 10^{10} cópias de vetor (ou seja, unidades de formação de colônia ou unidades de

formação de placa), de 10^4 a 10^9 cópias de vetor ou de 10^5 a 10^7 cópias de vetor.

[056] A composição pode ser administrada apenas uma vez ou administrada duas ou mais vezes para aumentar a resposta imune. Por exemplo, a composição pode ser administrada duas ou mais vezes separada por uma semana, duas semanas, três semanas, 1 mês, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 ano ou mais. O vetor da vacina pode consistir em microorganismos viáveis antes da administração, mas em algumas representações, o vetor pode ser eliminado antes da administração. Em algumas representações, o vetor também pode ser capaz de se reproduzir na cobaia, enquanto em outras representações o vetor pode não ser capaz de se reproduzir na cobaia, por ex., um vetor de vacina morto ou um lipossomo. Métodos de inativação de microorganismos usados como vetores são conhecidos pelos especialistas na arte. Por exemplo, um vetor da vacina bacteriana pode ser inativado com o uso de formalina, etanol, exposição ao calor ou antibióticos. Os especialistas na arte também podem usar outros métodos.

[057] É previsto que vários epítopos ou antígenos de patógenos iguais ou diferentes possam ser administrados em conjunto com uma única vacina para gerar uma resposta imune aprimorada contra vários antígenos. As vacinas recombinantes podem codificar antígenos de vários microorganismos, vírus ou tumores patogênicos associados aos antígenos. A administração da vacina capaz de expressar vários antígenos tem a vantagem de induzir a imunidade contra duas ou mais doenças ao mesmo tempo. Por exemplo, as bactérias vivas atenuadas fornecem um vetor adequado para gerar uma resposta imune contra vários antígenos de um único patógeno, por ex., FliC e PAL da *Salmonella* ou contra vários antígenos de diferentes patógenos, por ex., Influenza e *Salmonella*.

[058] Os vetores da vacina podem ser criados com o uso de polinucleotídeos exógenos que codificam antígenos que podem ser inseridos no vetor da vacina em qualquer local não essencial ou podem, como alternativa, serem transportados em um plasmídeo ou outro veículo extracromossômico (por ex., um BAC ou YAC) usando

métodos bem conhecidos na arte. As partes externas das proteínas transmembranares são um local adequado para inserção de polinucleotídeos ou ligadas a sequências que direcionam o polinucleotídeo exógeno para caminhos secretórios e/ou permitem a fixação à parede celular. Um exemplo de uma proteína transmembranar para inserção de polinucleotídeos é o gene *lamB*. Um método adequado de fixação à parede celular é fornecido nos exemplos

[059] Os polinucleotídeos exógenos incluem, sem limitação, os polinucleotídeos que codificam os antígenos selecionados entre microorganismos patogênicos ou vírus e incluem polinucleotídeos que são expressos de maneira que uma resposta imune eficaz seja gerada. Esses polinucleotídeos podem ser derivados de vírus patogênicos, como influenza (por ex., M2e, hemaglutinina ou neuraminidase), herpes-vírus (por ex., os genes que codificam as proteínas estruturais dos herpes-vírus), retrovírus (por ex., a proteína do envelope gp160), adenovírus, paramixovírus, coronavírus e similares. Os polinucleotídeos exógenos também podem ser obtidos de bactéria patogênica, por ex., genes que codificam as proteínas bacterianas, como toxinas, proteínas da membrana externa ou outras proteínas altamente conservadas. Além disso, os polinucleotídeos exógenos dos parasitas, como parasitas Apicomplexos são candidatos atrativos para uso em um vetor da vacina.

[060] A presente divulgação não está limitada a detalhes específicos de construção, organização de componentes ou etapas de método definidas aqui. As composições e os métodos divulgados aqui são podem ser fabricadas, praticadas, usadas, executadas e/ou constituídas de várias maneiras que serão aparentes por um especialista na arte devido à divulgação a seguir. A fraseologia e a terminologia usadas aqui se destinam somente à finalidade de descrição e não devem ser consideradas como limitadoras do escopo das reivindicações. Os indicadores ordinais, como primeiro, segundo e terceiro, quando usados na descrição e nas reivindicações para se referir a várias estruturas ou etapas de método, não se destinam a indicar qualquer estrutura ou etapa

específica ou qualquer ordem ou configuração em particular dessas estruturas ou etapas. Todos os métodos descritos aqui podem ser executados em qualquer ordem adequada, exceto quando indicado o contrário neste documento ou claramente contradito pelo contexto. O uso de qualquer e todos os exemplos ou linguagem de exemplo (por ex., "como tal") fornecidos aqui se destina simplesmente a facilitar a divulgação e não implica qualquer limitação no escopo da divulgação, exceto se reivindicado de maneira contrária. Nenhuma linguagem na especificação e nenhuma estrutura mostrada nos desenhos deve ser desenvolvida de modo a indicar que qualquer elemento não reivindicado é essencial à prática do objeto divulgado. O uso neste documento dos termos "incluindo", "consistindo" ou "tendo" e suas variações indica a inclusão dos elementos listados e seus equivalentes, bem como os elementos adicionais. As representações referidas como "incluindo", "consistindo" ou "tendo" determinados elementos também são contempladas como "consistindo essencialmente em" e "consistindo em" determinados elementos. Os termos "um" e "o" podem indicar mais de um, exceto se especificamente descrito.

[061] A referência aos intervalos de valores neste documento se destinam simplesmente a servir como um método abreviado de se referir individualmente a cada valor separado dentro do intervalo, exceto se indicado neste documento de outra forma, e cada valor separado é incorporado na especificação como se fosse individualmente aqui referido. Por exemplo, se um intervalo de concentração for definido como 1% a 50%, será especificado que os valores como 2% a 40%, 10% a 30% ou 1% a 3% etc., serão expressamente numerados nesta especificação. Esses são apenas exemplos do que é especificamente pretendido, e todas as possíveis combinações dos valores numéricos entre e incluindo o menor e o maior valores enumerados devem ser considerados como expressamente estabelecidos nesta divulgação. O uso da palavra "sobre" para descrever uma quantidade em particular ou variação de quantidades referidas indica que os valores muito próximos à quantidade referida são incluídos nessa quantidade, como valores

que podem ou naturalmente são estimados devido às tolerâncias de fabricação, instrumento e erro humano na criação das medidas e similares. Todas as porcentagens que se referem a quantidades são por peso, exceto se indicado de outra forma.

[062] Os seguintes exemplos são apenas ilustrativos e não indicam limitações no escopo da invenção e nem das reivindicações anexas. Todas as referências, patentes incluídas, publicações de patente e literatura não relacionada às patentes citadas neste documento foram incorporadas como referência integralmente. Qualquer conflito entre os enunciados nas referências e os incluídos aqui devem ser resolvidos em favor dos enunciados contidos neste documento.

EXEMPLOS

[063] Selecionamos o polipeptídeo Pal do ***E. coli*** como um polipeptídeo altamente conservado que pode incluir um polipeptídeo que seria altamente conservado entre imunogênicos e bactérias patogênicas gram-negativas. Começamos selecionando a sequência de ***E. coli*** do aminoácido 106-124 de Pal (P0A912). O potencial antigênico da sequência selecionada foi confirmado com o uso do programa Network Protein Sequence Analysis contra sequências publicadas encontradas nos bancos de dados EMBL e NCBI (Combet, C., C. Blanchet, C. Geourjon e G. Deleage. 2000. NPS@: network protein sequence analysis. Trends Biochem Sci 25:147-50). A sequência foi usada para procurar homologia de sequência com o uso de um mecanismo de pesquisa Blast no servidor EXPASY do Swiss Institute of Bioinformatics. A pesquisa no Blast encontrou várias proteínas Pal com sequências idênticas à nossa sequência Pal selecionada inicialmente (TVEGHADERGTPEYNISLG (N° ID SEQ.: 8)). A lista de proteínas Pal com sequência idêntica inclui ***E. coli*** spp, ***Salmonella typhi*** e ***paratyphi*** spp, ***Shigella*** spp, ***Enterobacter*** spp, ***Citrobacter*** spp, ***Cronobacter*** spp. Além disso, as proteínas Pal com homologia superior a 94% (somente um aminoácido diferente com ou sem substituição similar de um segundo aminoácido) são ***Vibrio*** spp, ***Sodalis*** spp, ***Erwinia*** spp, ***Klebsiella*** spp, ***Dickeya*** spp, ***Serratia***

spp, *Proteus* spp, *Xenorhabdus* spp, *Pectobacterium* spp e *Pantoea* spp com 100% de cobertura.

[064] Para otimizar para outra espécie de patógeno, o 17° aminoácido será alterado de serina para alanina. A nova sequência seria TVEGHADERGTPEYNIALG (N° ID SEQ.: 32). Espera-se que essa sequência forneça estímulo imune ideal para *Vibrio* spp, *Sodalis* spp, *Erwinia* spp, *Klebsiella* spp, *Dickeya* spp, *Serratia* spp, *Proteus* spp, *Xenorhabdus* spp, *Pectobacterium* spp e *Pantoea* spp com 100% de cobertura e sequência de aminoácidos idêntica ou similar. Espera-se que as proteínas dessas espécies sejam o alvo do sistema imune após a vacinação e forneçam proteção contra esses organismos.

[065] O epítopo PAL unogênico (TVEGHADERGTPEYNISLG (N° ID SEQ.: 8)) foi inserido em um vetor *Bacillus subtilis* (BS) e expresso. A estrutura de *Bacillus* Pal foi testada como um vetor de vacina para *Salmonella* pela vacinação de frangos por meio de gavagem oral com 10^8 cfu/frango no dia da eclosão e comparação dos frangos tratados de maneira similar com a espinha dorsal ou salina da *Bacillus* (BS BB). As aves receberam reforço com o mesmo tratamento 11 dias após a eclosão. As amostras foram cultivadas para a resposta imune específica no dia 17. A resposta imune da vacina foi avaliada pele medição de soro IgG (Figura 1) e íleo secretório IgA (Figura 2). Após a vacinação com a sequência selecionada de Pal expressada no *Bacillus*, houve uma resposta imune significativa secretória e do soro especificamente contra a sequência de Pal comparada aos controles (Figuras 1 e 2).

[066] A avaliação de candidatos de vacina vetorada do *Bacillus* contra o desafio da *Salmonella typhimurium* (ST) nos 11 dias pós-vacinação foi tentada pela enumeração de colônias de *Salmonella* no ceco de frangos vacinados no dia 17 e 21 após a eclosão (ou dia 6 e 10 após o desafio). Os níveis de ST no ceco foram medidos com o uso de técnicas microbiológicas convencionais. Os frangos que foram vacinados com a sequência selecionada de Pal expressada no vetor *Bacillus* tiveram níveis diminuídos significativamente de *Salmonella* no ceco. Conforme mostrado na

Figura 3, o nível de *Salmonella* no ceco foi diminuído em 4½ registros em frangos vacinados com BS-PAL (BSNNP) quando comparados aos frangos vacinados com salina ou BS BB. Esta é a primeira vacina eficaz contra *Salmonella* que é vetorada por um organismo geralmente reconhecido como seguro (Generally Recognized As Safe, GRAS) pelo Food and Drug Administration (FDA) como *Bacillus subtilis*.

[067] Em uma investigação voltada para a otimização da sequência de antígeno referido como PAL acima (TVEGHADERGTPEYNISLG (N° ID SEQ.: 8)), um experimento de mapeamento de epítopo foi criado para avaliar a capacidade antigênica de partes desse 19-mer oligopeptídeo PAL. A sequência foi dividida em 7 hexapeptídeos que foram sobrepostos por 3 aminoácidos cada. Por exemplo, TVEGHA (N° ID SEQ.: 39), GHADER (N° ID SEQ.: 2) e DERGTP (N° ID SEQ.: 3) cada compartilham três aminoácidos com a parte da sequência imediatamente à esquerda (na direção do término do amino) e à direita (na direção do término do carbóxi). Para essa finalidade, sete hexapeptídeos que se estendem sobre os resíduos dos aminoácidos 1-3, 4-6, 7-9 *etc.* foram sintetizados e ligados à albumina de soro bovino (BSA). Dois anticorpos monoclonais (mAbs, 2B5 e 1B2 designados) que reagiram fortemente com o peptídeo PAL 19-mer *e* o epítopo nativo conforme exibido na parede celular da *Salmonella* (e espécies relacionadas) foram selecionados, e suas afinidades relativas para cada segmento de PAL foram testadas (Figura 4).

[068] Os resultados indicaram que, exceto os 7 peptídeos testados, PAL1 (3 resíduos pré-PAL, "YKV" e resíduos terminais de PAL amino "TVE"; N° ID SEQ.: 38) era o menos antigênico para os dois mAbs. Isso pode ser explicado pela observação de que a treonina é um aminoácido não carregado e a valina é um resíduo alifático, os quais são relativamente hidrofóbicos e, dessa forma, é menos provável que sejam acessíveis no PAL do antígeno original. É provável que os resíduos menos acessíveis induzam uma resposta imune potente. Além disso, a maioria dos epítopos de anticorpos é hidrófila na natureza. Por outro lado, os dois melhores mAbs reagentes tinham uma afinidade mais elevada para o

PAL6 (N° ID SEQ.: 4) e PAL7 (N° ID SEQ.: 6) (os níveis de absorção no ELISA comparados ao PAL1 foram duas vezes mais elevados para o PAL6 e >50% mais elevado para o PAL7). Esses resultados indicam claramente que é provável que metade do terminal C do PAL foi a parte mais exposta e acessível do antígeno e a parte mais importante do antígeno em relação à geração de uma população de anticorpos que reagiu fortemente de maneira cruzada com a proteína nativa, conforme mostrado pelas espécies de ***Salmonella*** e bacterianas relacionadas. Curiosamente, para gerar o hexapeptídeo PAL7, foram adicionados 2 resíduos que não eram parte do 19-mer PAL original, mas desse PAL de flanco na proteína bacteriana nativa: E (glutamato) e R (arginina). Ambos são resíduos carregados e, consequentemente, têm probabilidade maior de serem expostos em nossas espécies alvo bacterianas.

[069] Com base na lógica acima, um novo 19-mer, PALbis designado (N° ID SEQ.: 1), foi gerado. O PALbis é diferente do PAL 19-mer porque (1) ele não contém mais os dois aminoácidos de terminal N, T (treonina) e V (valina), e (2) foi estendido do terminal C com dois resíduos adicionais, ***isto é,*** E (glutamato) e R (arginina). Dessa forma, a sequência de aminoácidos melhorada, PALbis é EGHADERGTPEYNISLGER (N° ID SEQ.: 1). O PALbis foi comparado com vários gêneros de bactérias para assegurar que a reatividade de espécies cruzadas foi mantida (os resultados do BLAST são mostrados na Tabela 1). A homologia de sequência entre ***E. coli, Salmonella typhi*** e ***paratyphi, Shigella, Enterobacter, Citrobacter*** e ***Cronobacter*** spp. ainda apresentou 100% de homologia. A homologia de sequência entre ***Vibrio, Sodalis, Erwinia, Klebsiella, Dickeya, Serratia, Proteus, Xenorhabdus, Pectobacterium*** e ***Pantoea*** spp. apresentou 95% de homologia com uma única substituição de aminoácido S15A (N° ID SEQ.: 6). A sequência de ***Campylobacter jejuni*** relacionada é mostrada como N° ID SEQ.: 7 e tem 65% de identidade com a sequência de N° ID SEQ.: 1. Dessa forma, optamos pelos vetores da vacina que expressam o N° ID SEQ.: 1 para obter respostas imunes à cepa cruzada com um único vetor de vacina.

Tabela 1: Comparação de sequência de PALbis (N° ID SEQ.: 1) entre as bactérias

Sequência de PALbis:

EGHADERGTPEYNI**S**LGER *E. coli* (N° ID SEQ.: 1)

EGHADERGTPEYNI**A**LGER *Vibrio* (N° ID SEQ.: 6)

EG**NC**DE**W**GT**D**EYN**QA**LG__ *Campylobacter* (N° ID SEQ.: 7)

Bactéria	**Homologia (%)**
Escherichia coli	100
Salmonella enteriditis	100
Salmonella typhimurium	100
Salmonella choleraesuis	100
Salmonella enterica subespécie Montevideo	100
Salmonella enterica subespécie Kentucky	100
Shigella flexneri	100
Shigella dysenteriae	100
Enterobacter radicincitans	100
Enterobacter hormaechei	100
Enterobacter asburiae	100
Enterobacter cancerogenus	100
Enterobacter cloacae	100
Enterobacter aerogenes	95
Citrobacter koseri	100
Citrobacter freundii	100
Citrobacter rodentium	100
Citrobacter youngae	100
Vibrio cholera	95
Vibrio scophthalmi	95
Vibrio rotiferianus	95
Vibrio ichthyoenteri	95
Vibrio harceyi	95
Vibrio mimicus	95
Vibrio alginolyticus	95

Vibrio shilonii	95
Vibrio parahaemolyticus	95
Vibrio tubiashii	95
Vibrio sinaloensis	95
Vibrio brasiliesis	95
Vibrio caribbenthicus	95

Bactéria	**Homologia (%)**
Vibrio orientalis	95
Vibrio ordalii	95
Vibrio nigripulchritudo	95
Vibrio anguillarum	95
Vibrio furnissii	95
Vibrio metschnikovii	95
Vibrio coralliilyticus	95
Vibrio splendidus	95
Vibrio vulnificus	95
Cronobacter sakazakii	100
Sodalis glossinidius	95
Erwinia billingiae	95
Klebsiella oxytoca	95
Klebsiella pneumonia	95
Dickeya dadantii	95
Dickeya zeae	95
Serratia symbiotica	95
Serratia plymuthica	95
Serratia proteamaculans	95
Serratia odorifera	95
Proteus mirabilis	95
Proteus penneri	95
Xenorhabdus bovienii	95
Xenorhabdus nematophila	95
Pectobacterium wasabiae	95
Pectobacterium carotovorum	95
Pectobacerium atrosepticum	95

Pantoea stewartii	95
Pantoea ananatis	95
Campylobacter jejuni	65

[070] Para testar a capacidade do PALbis (N° ID SEQ.: 1) para trabalhar em um experimento de desafio de cepa cruzada, foram gerados vários candidatos de vacina. Os vetores da vacina usados aqui foram gerados consideravelmente conforme descrito na Publicação Internacional N° WO2008/036675 e na Publicação Internacional N° WO2011/091255. Três estruturas separadas foram geradas e incorporadas em dois vetores de vacina separados *Salmonella* Enteriditis ou *Salmonella* Typhimurium. Os insertos usados incluíam um polinucleotídeo que codificada o epítopo CJ0113 descrito como N° ID SEQ.: 31 aqui e originalmente descrito na Publicação Internacional N° WO2011/156619, um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo HMGB1 do N° ID SEQ.: 24 originalmente descrito na Publicação Internacional N° WO2011/091255 e a sequência de PALbis do N° ID SEQ.: 1 identificado e descrito aqui. Os três polinucleotídeos foram separados pelos espaçadores de serina (três resíduos de serina inseridos para evitar problemas de impedimento estérico) e inseridos em várias ordens na estrutura em ciclo externo 9 da proteína *lamB* da transmembrana da *Salmonella*. As sequências resultantes de ácido nucleico e aminoácidos dos insertos são mostradas no N° ID SEQ.: 41-46. N° ID SEQ.: 41 e 42 são sequências de ácido nucleico e aminoácidos do inserto CJ0113-PAL-HMGB1, respectivamente. N° ID SEQ.: 43 e 44 são sequências de ácido nucleico e aminoácidos do inserto CJ0113-HMGB1-PAL, respectivamente. N° ID SEQ.: 45 e 46 são sequências de ácido nucleico e aminoácidos do inserto HMGB1-CJ0113-PAL, respectivamente. A finalidade da geração de três vetores de vacina com os mesmos insertos em várias ordens foi controlar qualquer posição ou efeitos de impedimento estérico dos peptídeos que interagem com partes de superfície não mapeadas nos agentes do vetor que poderiam tornar o domínio da ligação de HMGB1 inacessíveis aos receptores nas células hospedeiras ou que

poderiam tornar os antígenos apresentados na superfície inacessíveis às células hospedeiras imunes.

[071] As vacinas vetoradas de *Salmonella* Enteriditis reduziram a recuperação de *Salmonella* Heidelberg após o desafio. Os frangos foram vacinados com vacina vetorada de *Salmonella* Enteriditis que pertence a um antissoro heterólogo de *Salmonella* quando comparado à cepa de desafio da *Salmonella* Heidelberg para determinar se o antígeno PAL geraria uma resposta imune ao antissoro de *Salmonella* cruzada. *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1 viva, *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-HMGB1-PAL viva (que foi posteriormente determinada para conter duas mutações de ponto no HMGB1 e uma mutação de deslocamento de estrutura no PAL resultante no epítopo de PAL de SEQ ID NO: 35) e as vacinas de *Salmonella* Enteriditis-HMGB1-CJ0113-PAL viva (com uma mutação de ponto determinado em HMGB1) foram aplicadas por gavagem oral em frangos de 1 dia de vida a $4x10^8$ cfu/frango. Os frangos foram desafiados no dia 7 com uma *Salmonella* Heidelberg a $7x10^6$ cfu/frango por gavagem oral. Foram determinadas unidades de formação de colônia (cfu) de *Salmonella* Heidelberg por grama isoladas do ceco de frango jovem de 21 dias de vida. A *Salmonella* Heidelberg cfu/g que foi recuperada do ceco 14 dias após o desafio de frangos vacinados com *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1 viva foi significativamente menor que da *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-HMGB1-PAL viva com mutações de dois em HMGB1 e uma mutação de deslocamento de estrutura nos frangos vacinados contra PAL, *Salmonella* Enteriditis-HMGB1-CJ0113-PAL viva com uma mutação de ponto nos frangos vacinados com HMGB1 e frangos de controle não vacinados (Figura 5; P=0,003).

[072] Os frangos também foram vacinados com vacinas vetoradas de *Salmonella* Enteriditis inativa de glutaraldeído pertencente a um antissoro heterólogo de *Salmonella* quando comparado ao desafio da *Salmonella* Heidelberg para determinar se o antígeno PAL geraria uma resposta imune ao antissoro de *Salmonella* cruzada. As vacinas de *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1 inativa, a *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-mHMGB1-mPAL (com mutações de ponto em HMGB1 e uma mutação de deslocamento de estrutura em PAL),

S*almonella* Enteriditis-mHMGB1-CJ0113-PAL (com uma mutação de ponto no HMGB1) foram auxiliadas por quitosana manosilada (conforme descrito no Requerimento Internacional N° PCT/US13/67212). As vacinas preparadas foram usadas na gavagem oral de frangos de 1 dia a $1x10^9$ cfu/frango. Os frangos foram desafiados no dia 17 com uma ***Salmonella*** Heidelberg a $8.5x10^6$ cfu/frango por gavagem oral. A vacinação de ***Salmonella*** Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1 inativa de glutaraldeído e ***Salmonella*** Enteriditis-mHMGB1-CJ0113-PAL em frangos jovens reduziu significativamente a recuperação da ***Salmonella*** Heidelberg a partir do ceco cinco dias após o desafio (Figura 6; ***P***<0,05) e a recuperação da ***Salmonella*** Heidelberg permaneceu baixa nos frangos vacinados com ***Salmonella*** Enteriditis-mHMGB1-CJ0113-PAL e ***Salmonella*** Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1 dezessete dias após o desafio (***P***=0,033). Esses dados indicam que o epítopo PAL nestas vacinas ofereceram proteção contra um desafio de ***Salmonella*** de antissoro cruzado considerando a espinha dorsal da vacina originada da cepa de antissoro D da ***Salmonella*** e protegeu contra o desafio do antissoro B da ***Salmonella***.

[073] Notavelmente, esses experimentos não foram úteis para determinar se houve algum efeito da orientação relativa ou da posição dos três polipeptídeos no vetor da vacina porque não houve mutações divulgadas nos insertos. As mutações foram informativas em relação à parte protetora ou imunogênica do polipeptídeo PAL. A exclusão de um único nucleotídeo foi observada no polinucleotídeo PAL da vacina da ***Salmonella*** Enteriditis-CJ0113-mHMGB1-mPAL. A sequência de nucleotídeo do PAL do tipo selvagem é 5'-GAAGGTCACGCGGACGAACGTGGTACCCCGGAATAC-AACATCTCTCTGGGTGAACGT-3' (N° ID SEQ.: 33; a guanina excluída na sequência mutante é sublinhada) e a sequência de PSL mutante observada na ***Salmonella*** Enteriditis-CJ0113-mHMGB1-mPAL é 5'-GAAGGTCACGCGGACGAACGTGGTACCCCGAATACAACATCTCTCTGGGTGAACGT-3' (N° ID SEQ.: 34). Os pares de base 31 de exclusão da guanina (sublinhada na sequência de tipo selvagem) na sequência de nucleotídeo de PAL provocaram uma mutação de deslocamento de estrutura que mudou os oito últimos aminoácidos da sequência de

peptídeo de PAL. O PAL de tipo selvagem de N° ID SEQ.: 1 se torna N° ID SEQ.: 35 (EGHADERGTPNTTSLWVN; os últimos oito aminoácidos são sublinhados e são diferentes daqueles encontrados no N° ID SEQ.: 1). A falta de desenvolvimento de uma resposta imune eficaz por esse PAL mutante é provável devido à perda dos nove últimos aminoácidos de PAL que se mostraram importantes para o desenvolvimento de uma resposta de anticorpo na Figura 4 acima. Dessa forma, um epítopo de PAL mínimo pode ser o N° ID SEQ.: 36 (EYNISLGER) ou sua contraparte *Vibrio* de N° ID SEQ.: 37 (EYNIALGER).

[074] As vacinas foram refeitas para corrigir as mutações observadas acima. Assim que as mutações foram corrigidas, a vacinação de *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1 viva, *Salmonella* Enteriditis-HMGB1-CJ0113-PAL viva e *Salmonella* Typhimurium-HMGB1-CJ0113-PAL viva em frangos jovens reduziu a recuperação da *Salmonella* Heidelberg após o enriquecimento com tetrationato durante 24 horas a partir do ceco de frangos jovens coletado 10 dias após o desafio (Figura 7; $P<0,05$). Os pintos do dia da eclosão foram vacinados com 10^7 cfu de *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1 viva, *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-HMGB1-PAL, *Salmonella* Enteriditis-HMGB1-CJ0113-PAL, *Salmonella* Typhimurium-CJ0113-PAL-HMGB1, *Salmonella* Typhimurium-CJ0113-HMGB1-PAL ou *Salmonella* Typhimurium-HMGB1-CJ0113-PAL por gavagem oral. Um grupo adicional de pintos do dia da eclosão foi vacinado com 10^6 cfu DE *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1 por gavagem oral. Os frangos vacinados com *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1, *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-HMGB1-PAL, *Salmonella* Enteriditis-HMGB1-CJ0113-PAL, *Salmonella* Typhimurium-CJ0113-PAL-HMGB1, *Salmonella* Typhimurium-CJ0113-HMGB1-PAL ou *Salmonella* Typhimurium-HMGB1-CJ0113-PAL receberam reforço com 14 dias de idade com 10^7 cfu da respectiva vacina. Os pintos vacinados com *Salmonella* Eeriditis-CJ0113-PAL-HMGB1 que receberam 10^6 cfu no dia da eclosão receberam reforço com 10^8 cfu de *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1. Os frangos foram desafiados no dia 17 $6x10^6$ cfu/frango por gavagem oral, e os resultados são mostrados na Figura 7 como percentual de desafio

de recuperação de bactérias. Os resultados sugerem que a posição de cada inserto no vetor da vacina pode afetar o nível de proteção oferecido pela vacina.

[075] A expressão de PAL na superfície da célula bacteriana da *Salmonella* Enteriditis irá interagir diretamente com os linfócitos B para estimular a produção do anticorpo. A expressão de HMGB1 na superfície da célula da *Salmonella* Enteriditis afeta a porcentagem de absorção fagocítica nos macrófagos de murídeo (Figura 8). Os macrófagos de murídeo da linhagem de célula bruta 264 foram cocultivados com o vetor da vacina de *Salmonella* Enteriditis, *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1, *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-HMGB1-PAL ou *Salmonella* Enteriditis-HMGB1-CJ0113-PAL durante uma hora. As biopartículas vermelhas de pHrodo de *Escherichia coli* foram adicionadas a cada cultura e incubadas durante duas horas. Após as biopartículas e a bactéria serem engolfadas pelo macrófago, um fagossomo é criado. O fagossomo é fundido com um lisossomo acidificando dentro do fagolisossomo. A intensidade da fluorescência das biopartículas aumenta à medida que o pH se torna mais acídido; portanto, as biopartículas em um fagolisossomo terá intensidade de fluorescência mais elevada. A porcentagem de absorção fagocítica da *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1 foi mais elevada do que a da *Salmonella* Enteriditis-HMGB1-CJ0113-PAL que foi mais elevada do que a de *Salmonella* Enteriditis-CJ0113-HMGB1-PAL, o que sugere que o HMGB1 no final do inserto interage favoravelmente com a superfície da célula e melhora a absorção fagocítica.

[076] Com base nesses dados, a apresentação linear do DNA quimérico altera o dobramento de proteínas que depende da posição de aminoácidos carregados. Diferentes combinações lineares de antígenos e moléculas imunoestimulantes afetaram a organização espacial de cada antígeno e imunoestimulação na superfície da célula bacteriana. A expressão da proteína dessas combinações lineares pode divergir para cada espécie de bactéria devido às proteínas do canal na superfície da célula da bactéria que criam o impedimento estérico com as proteínas de canal ao

redor. A eficácia reduzida da vacina poderia ser o resultado da expressão da proteína de PAL ou HMGB1 desfavorável devido ao impedimento estérico.

REIVINDICAÇÕES

1. UMA VACINA **caracterizada** por compreender um polipeptídeo PAL heterólogo que consiste em SEQ ID NO: 1,em que o polipeptídeo PAL é expresso na superfície da vacina.

2. VACINA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** por compreender ainda um polipeptídeo imunoestimulante, em que o polipeptídeo imunoestimulante é expresso na superfície da vacina.

3. VACINA, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo polipeptídeo imunoestimulante compreender um polipeptídeo HMGB1 ou um polipeptídeo CD154 capaz de se ligar ao CD40.

4. VACINA, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo polipeptídeo HMGB1 compreender um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste de pelo menos uma das SEQ ID NOs.: 15-23 e um fragmento de pelo menos uma das SEQ ID NOs.: 15-23.

5. VACINA, de acordo coma reivindicação 3, **caracterizada** pelo polipeptídeo CD154 ter menos de 50 aminoácidos e compreender os aminoácidos 140-149 de um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO.: 24, SEQ ID NO.: 25 ou um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO.: 26, SEQ ID NO.: 27, SEQ ID NO.: 28, SEQ ID NO.: 29 e SEQ ID NO.: 30.

6. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 5, **caracterizada** pela vacina compreender mais de uma cópia do polipeptídeo PAL ou mais de uma cópia do polipeptídeo imunoestimulante.

7. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 6, **caracterizada** pelo polipeptídeo PAL estar ligado na mesma estrutura de leitura do polipeptídeo imunoestimulante.

8. VACINA, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizada** pelo polipeptídeo PAL e o polipeptídeo imunoestimulante estarem ligados por meio de um espaçador.

9. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, **caracterizada** pela vacina ser selecionada do grupo que consiste em um vírus, uma bactéria, uma levedura e um lipossomo.

10. VACINA, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada** pela vacina ser selecionada do grupo que consiste em *Bacillus* spp., *Salmonella* spp., *Lactobacillus* spp., e *Escherichia* spp.

11. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, **caracterizada** por compreender ainda um segundo polipeptídeo antigênico.

12. VACINA, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo segundo polipeptídeo antigênico ser um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO.: 7 e SEQ ID NO.: 31.

13. VACINA **caracterizada** por compreender um polipeptídeo selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NO.: 42, SEQ ID NO.: 44 e SEQ ID NO.: 46.

14. UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA **caracterizada** por compreender a vacina de qualquer uma das reivindicações de 1 a 13 e um carregador farmaceuticamente aceitável.

15. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, ou composição farmacêutica da reivindicação 14 **caracterizada** por ser formulada para administração por uma via selecionada do grupo que consiste em oral, mucosal, parenteral, subcutânea, intramuscular, intraocular e *in ovo*.

16. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, ou composição farmacêutica da reivindicação 14, **caracterizada** por ser formulada para a administração de cerca de 10^4 a 10^9 cópias do vetor da vacina.

17. VACINA, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, ou composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada** pela vacina ser morta ou não ser capaz de se replicar.

Figura 1

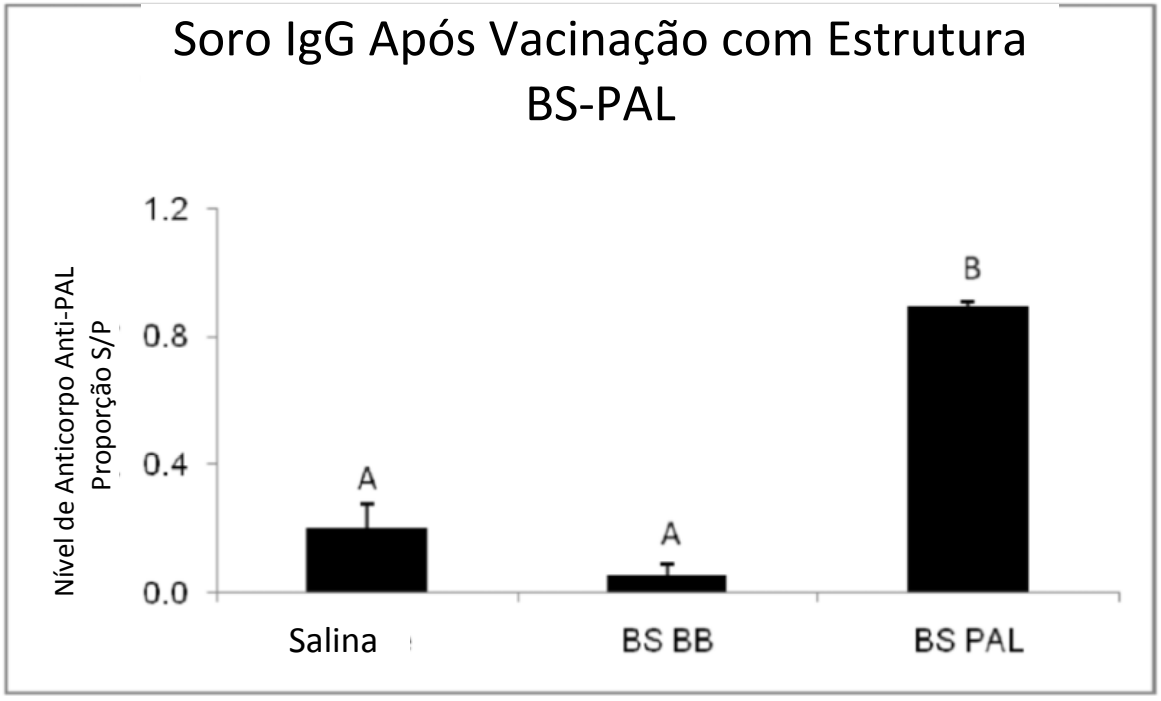


Figura 2

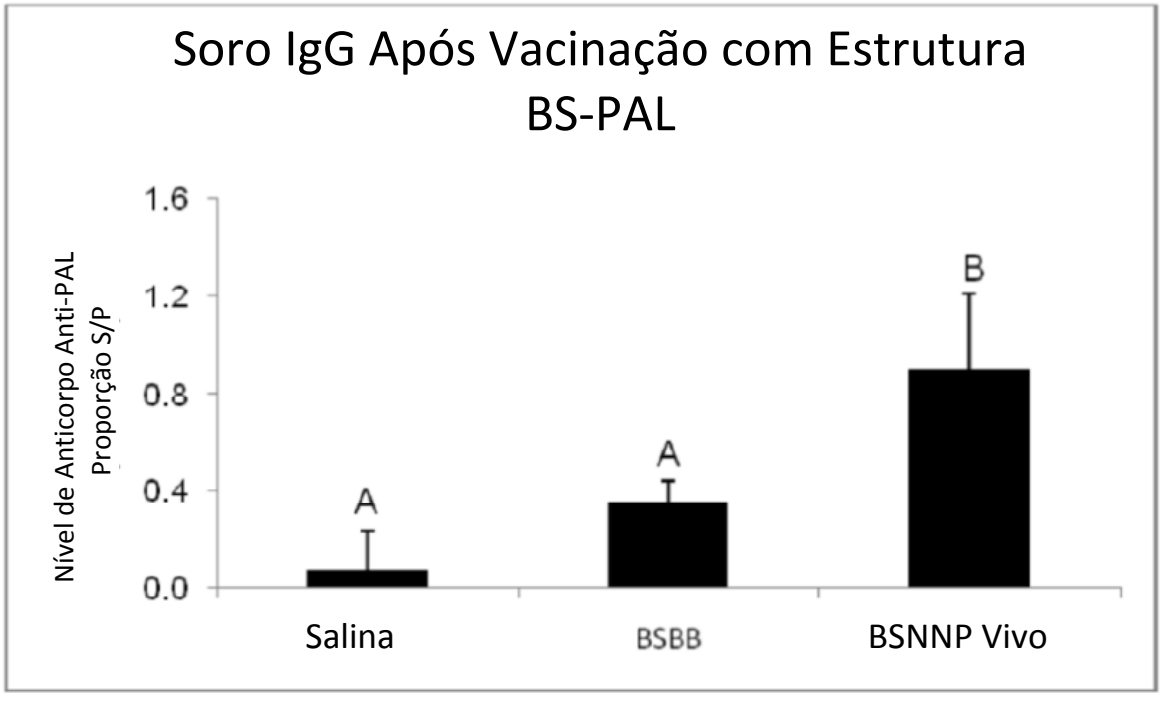


Figura 3

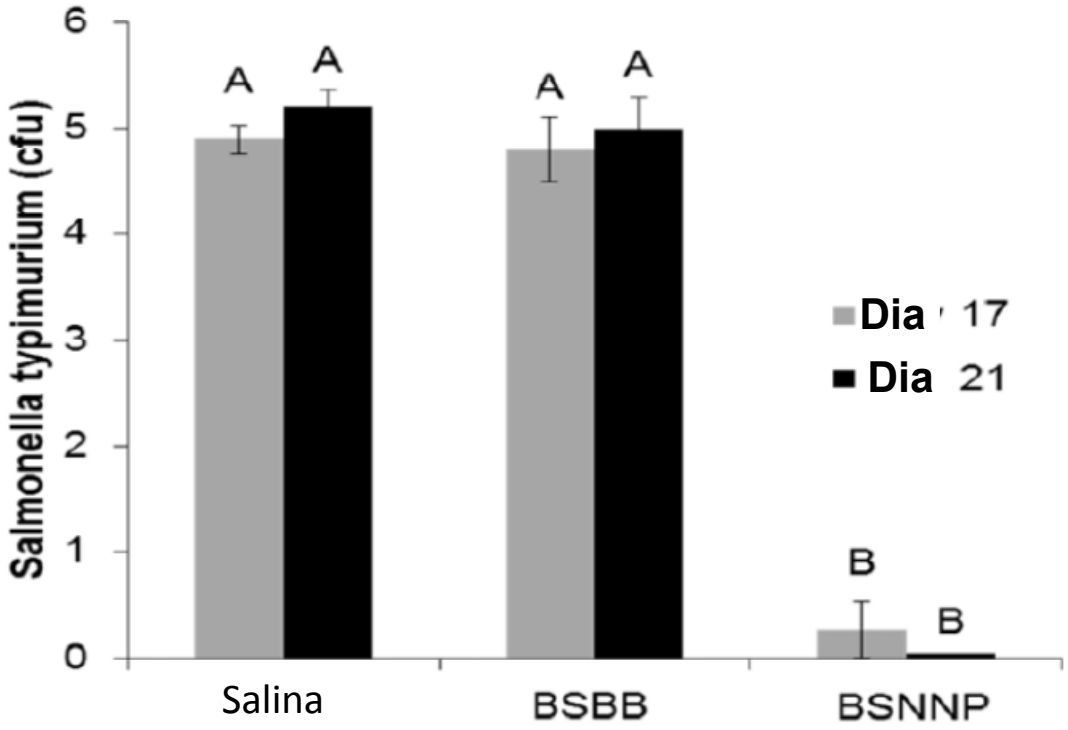

Salmonella typimurium (cfu)
6
5
4
3
2
1
0
A
A
A
A
B
B
Dia 17
Dia 21
Salina
BSBB
BSNNP

Figura 4

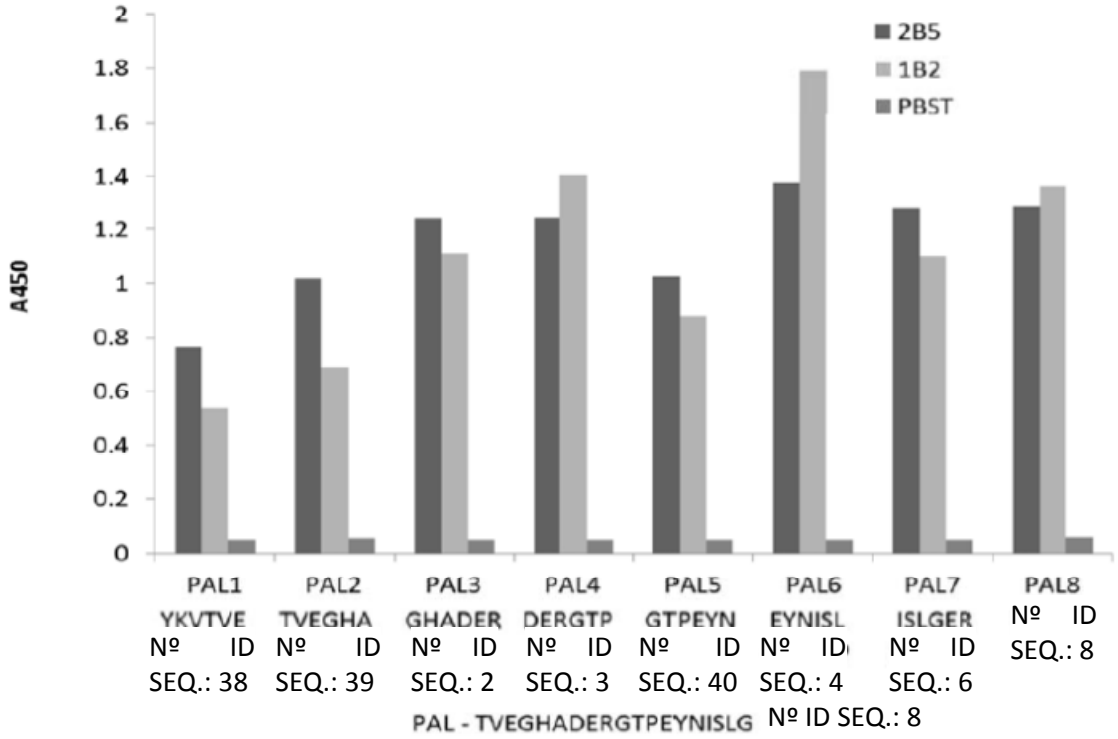

2B5
1B2
PBST
A450
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
PAL1
YKVTVE
Nº ID SEQ.: 38
PAL2
TVEGHA
Nº ID SEQ.: 39
PAL3
GHADER
Nº ID SEQ.: 2
PAL4
DERGTP
Nº ID SEQ.: 3
PAL5
GTPEYN
Nº ID SEQ.: 40
PAL6
EYNISL
Nº ID SEQ.: 4
PAL7
ISLGER
Nº ID SEQ.: 6
PAL8
Nº ID SEQ.: 8
PAL - TVEGHADERGTPEYNISLG Nº ID SEQ.: 8

Figura 5

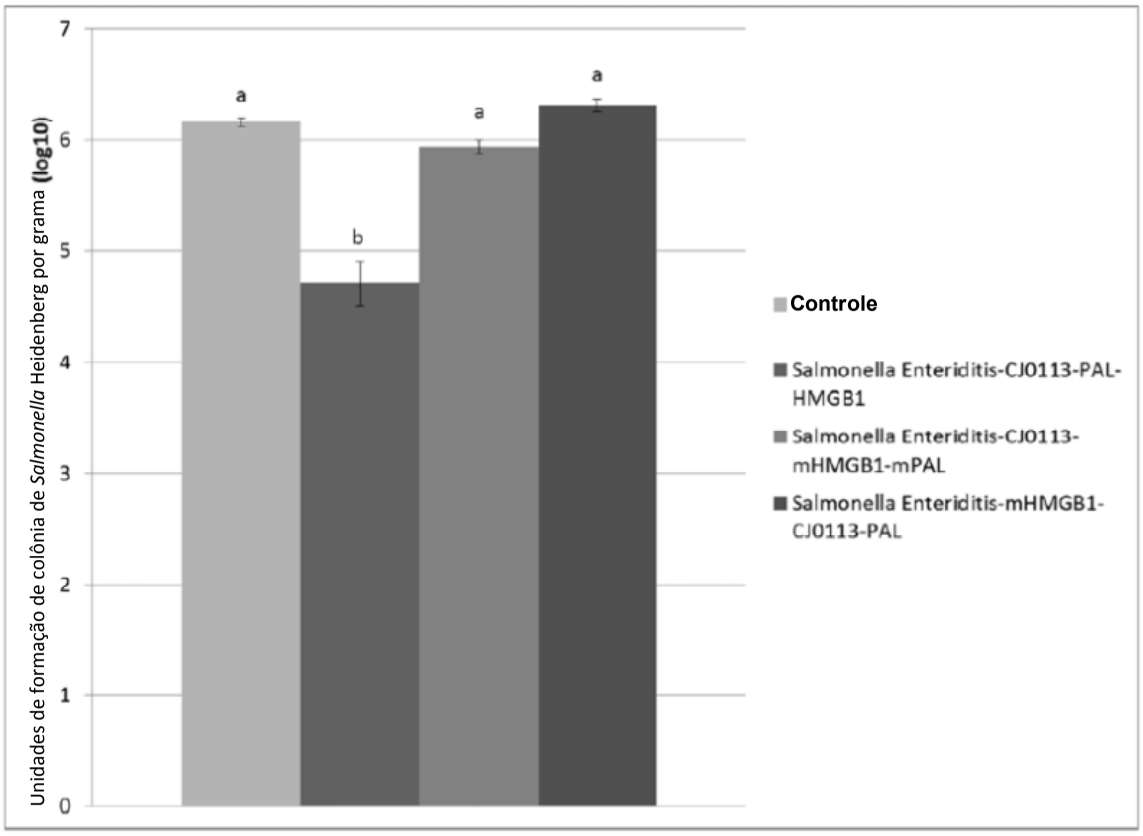

Unidades de formação de colônia de *Salmonella* Heidenberg por grama (log10)
7
6
5
4
3
2
1
0
a
b
a
a
Controle
Salmonella Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1
Salmonella Enteriditis-CJ0113-mHMGB1-mPAL
Salmonella Enteriditis-mHMGB1-CJ0113-PAL

Figura 6

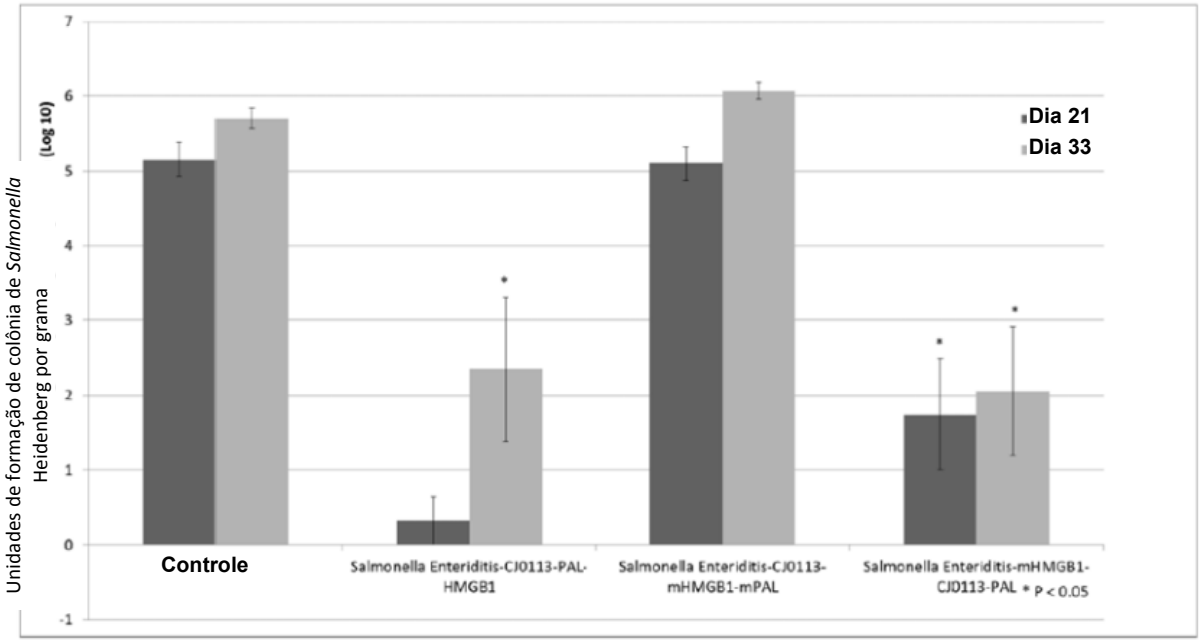


Figura 7

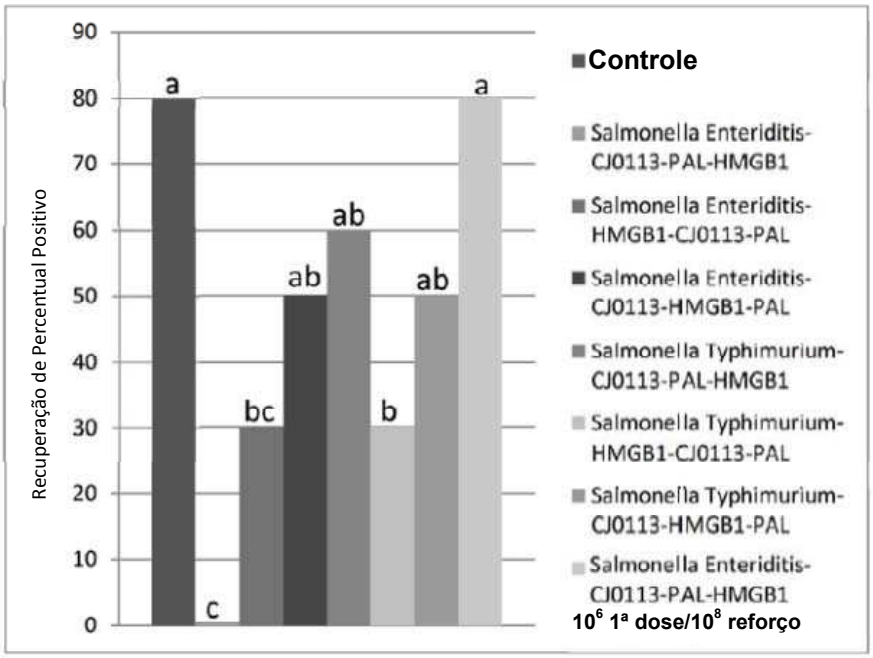
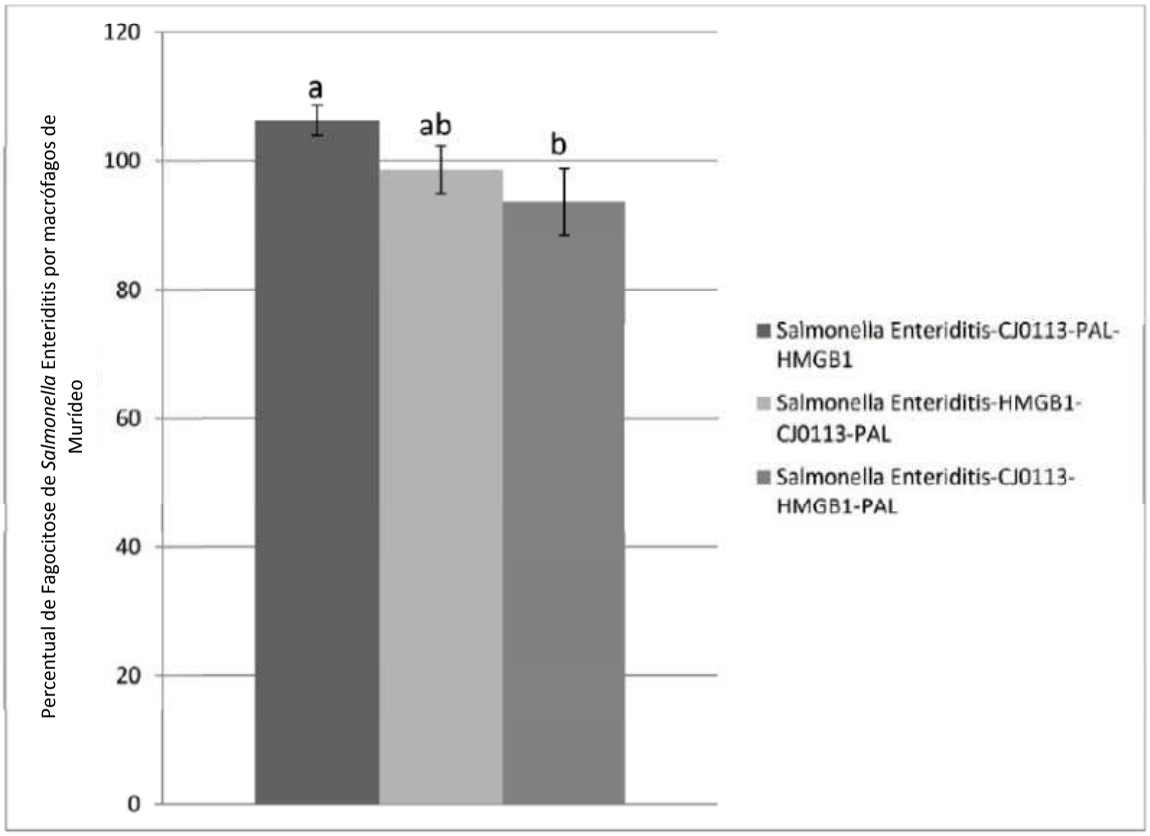


Figura 8


Percentual de Fagocitose de *Salmonella* Enteriditis por macrófagos de Murídeo
120
100
80
60
40
20
0
a
ab
b
Salmonella Enteriditis-CJ0113-PAL-HMGB1
Salmonella Enteriditis-HMGB1-CJ0113-PAL
Salmonella Enteriditis-CJ0113-HMGB1-PAL