

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 905**

51 Int. Cl.:

A61K 39/012 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2008 PCT/US2008/082254**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2009 WO09059298**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2008 E 08843740 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2214701**

54 Título: **Composiciones y métodos para aumentar las respuestas inmunitarias a Eimeria**

30 Prioridad:

01.11.2007 US 984612 P

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

06.02.2017

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS (33.3%)
2404 North University Avenue
Little Rock, AR 72207, US;
THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM (33.3%) y
UNIVERSITY OF GUELPH (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BOTTJE, WALTER;
HARGIS, BILLY;
BERGHMAN, LUC;
KWON, YOUNG MIN;
COLE, KIMBERLY;
COX, MANDY;
LAYTON, SHERRYLL;
EL-ASHRAM, SAEED;
BARTA, JOHN y
TELLEZ, GUILLERMO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 599 905 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para aumentar las respuestas inmunitarias a *Eimeria*

5 Introducción

La coccidiosis, una enfermedad infecciosa de aves de granja, porcinos y ganado bovino producida por el parásito protozoo apicomplejo *Eimeria*, presenta problemas en todo el mundo. La coccidiosis está entre las diez enfermedades más importantes de las aves de granja en términos de su impacto económico en la industria avícola. Otros miembros del filo Apicomplexa que también producen enfermedades, incluyen *Eimeria maxima*, *Cryptosporidium* y *Toxoplasma* que son los agentes causales de la malaria, criptosporidiosis y toxoplasmosis respectivamente. Las vacunas disponibles actualmente contra *Eimeria* se basan en dosificaciones bajas controladas de parásitos de *Eimeria* esencialmente con total virulencia pero sensibles a los fármacos. La vacunación con las vacunas actuales basadas en *Eimeria* produce una morbilidad sustancial por reacción vacunal y pérdidas económicas en las poblaciones vacunadas. Por lo tanto se necesita una vacuna de baja virulencia eficaz contra *Eimeria*. Una vacuna eficaz contra *Eimeria* puede ser útil como una vacuna contra otros parásitos apicomplejos.

Sumario

Las vacunas de acuerdo con la invención, y los usos de las mismas de acuerdo con la invención, se definen en las reivindicaciones. Se desvela una vacuna que comprende una primera secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido TRAP o un fragmento inmunogénico del mismo. El polipéptido TRAP puede comprender o comprende las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, o un fragmento inmunogénico de las mismas. Las vacunas incluyen además opcionalmente una segunda secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40. Los polipéptidos CD154 incluyen menos de 50 aminoácidos y comprenden los aminoácidos 140-149, o un homólogo de los mismos.

Las vacunas de acuerdo con la presente invención pueden estar comprendidas en un vector, tal como un virus, una bacteria o un liposoma. En un aspecto, se proporciona una vacuna que comprende una *Salmonella enteritidis* que comprende una primera secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido TRAP.

En otro aspecto más, la invención incluye el uso de vacunas de acuerdo con la invención en métodos para aumentar la respuesta inmunitaria de acuerdo con la reivindicación 14.

También se desvelan en el presente documento métodos para reducir la morbilidad asociada con la infección por un parásito apicomplejo en un sujeto administrando una vacuna de acuerdo con la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa el esquema para producir mutaciones dirigidas al sitio en *Salmonella enteritidis*. La Figura 2 representa el dibujo esquemático del método PCR de extensión solapada que se utiliza para generar las inserciones TRAP y TRAP-CD154 en el bucle 9 del polinucleótido *lamB*. La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de mortalidad a los cinco días post-infección con *Eimeria maxima* tras la inoculación con un vector de *Salmonella* que expresa la secuencia TRAP de *Eimeria* que se indica.

Descripción detallada

Las tecnologías de ADN recombinante hacen posible la modificación relativamente fácil de muchas especies bacterianas y víricas. Algunas bacterias y virus son moderadamente patógenos o no patógenos, pero son capaces de generar una respuesta inmunitaria robusta. Estas bacterias y virus producen vacunas atractivas para desencadenar una respuesta inmunitaria contra los antígenos. Las vacunas bacterianas o víricas pueden imitar una infección natural y producen una inmunidad mucosa robusta y de larga duración. Las vacunas son a menudo relativamente baratas de producir y administrar. Además, dichos vectores a menudo pueden albergar más de un antígeno y pueden proporcionar protección contra múltiples agentes patógenos.

En un aspecto, se proporciona una vacuna que comprende una primera secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido TRAP o un fragmento inmunogénico del mismo. El polipéptido TRAP puede comprender la SEQ ID NO: 11 o un fragmento inmunogénico de la SEQ ID NO: 11. Una vacuna incluye cualquier composición que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido antigénico que es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria contra el polipéptido. En otro aspecto, se desvela el uso de vectores, tal como vectores bacterianos, para la vacunación y generación de respuestas inmunitarias contra *Eimeria* u otros parásitos apicomplejos tales como *Eimeria maxima* (el agente causal de la malaria), *Toxoplasma* y *Cryptosporidium*. Las cepas de *Salmonella* producen vectores adecuados debido a que los genes bacterianos se pueden mutar o atenuar para crear bacterias con una patogénesis baja o nula en el sujeto infectado o inmunizado, mientras que siguen manteniendo su inmunogenicidad.

Se demostró que un antígeno de *Eimeria maxima* (EmTFP250) en estadio asexual, de alto peso molecular era una diana para los anticuerpos maternos producidos por gallinas ponedoras infectadas con este parásito protozoario (International journal for Parasitology 34 (2004) 861-872). El análisis de la secuencia de aminoácidos del antígeno reveló un nuevo miembro de la familia TRAP (proteína anónima relacionada con la trombospondina), que contiene 16 repeticiones de trombospondina tipo 1 y 31 dominios de unión al calcio tipo factor de crecimiento epidérmico. El EmTFP250 o TRAP también contiene dos regiones hidrófilas complejas inferiores ricas en restos de ácido glutámico y glicina, y un dominio transmembrana/cola citosólica asociada con la motilidad deslizante del parásito que está altamente conservado en las proteínas del micronema de apicomplejos. Se seleccionaron varios epítomos potenciales y se identificaron en las SEQ ID NO: 1-3 y 11. Debido a la naturaleza conservada de este antígeno, la expresión de estos epítomos por un vector puede inducir una inmunidad protectora contra múltiples parásitos apicomplejos.

La *Salmonella* puede proporcionar un vector útil debido a que puede sobrevivir en el tracto gastrointestinal del huésped y dar lugar a una respuesta inmunitaria mucosa. Las vacunas orales que utilizan un vector de *Salmonella* producen una respuesta inmunitaria mucosa robusta y son relativamente fáciles de administrar tanto a animales como a seres humanos. Sin embargo, muchas de las cepas vacunales de *Salmonella* actuales no son tan eficaces para generar una respuesta inmunitaria protectora fuerte en comparación con sus equivalentes más virulentos. Las cepas virulentas proporcionan una respuesta inmunitaria robusta pero también pueden producir una morbilidad significativa al sujeto vacunado. Una cepa de *Salmonella* que podría utilizarse para una vacunación mucosa eficaz, por ejemplo oral, proporcionaría un vector que podría utilizarse para vacunar fácilmente a un sujeto contra uno o más agentes patógenos, tales como parásitos apicomplejos.

Se describe una cepa de *Salmonella enteritidis* útil como vector, y varios vectores recombinantes producidos utilizando esta cepa. Específicamente, se proporciona una *Salmonella enteritidis* 13A (SE13A) capaz de expresar un polipéptido TRAP exógeno. Además se desvelan, una vacuna y métodos para aumentar una respuesta inmunitaria en un sujeto administrando la vacuna que comprende la secuencia de polinucleótido TRAP que codifica un polipéptido TRAP y una secuencia de polinucleótido CD154 que codifica un polipéptido CD154 o un homólogo del mismo que es capaz de unirse a CD40. Las vacunas pueden utilizarse para aumentar la respuesta inmunitaria contra *Eimeria* u otro parásito apicomplejo, tal como *Eimeria maxima*, *Toxoplasma* o *Cryptosporidium*, o se puede utilizar para reducir la morbilidad asociada con una infección producida por un parásito apicomplejo.

Se seleccionó un aislado de *Salmonella* tipo silvestre, *Salmonella enteritidis* 13A (SE13A) (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) el 13 de septiembre de 2006 con número de depósito PTA-7871) basándose en su rara capacidad para producir colonización mucosa y translocación sub-mucosa en pollos, permitiendo una presentación robusta de los antígenos asociados o epítomos en pollos de producción. De manera importante, este aislado de *Salmonella* de tipo silvestre no produce una enfermedad clínicamente detectable o pérdida de actuación en pollos de producción, indicando el poco potencial causante de enfermedad de la *Salmonella* de tipo silvestre en animales vertebrados.

La SE13A aislada se puede atenuar adicionalmente inactivando al menos un gen necesario para la replicación sostenida de la bacteria fuera del laboratorio o condiciones de fabricación. Las cepas de *Salmonella* atenuadas o variantes que se pueden utilizar como vectores se describen posteriormente. La SE13A se utilizó para generar cepas de *Salmonella* atenuadas para desarrollar vacunas y generar un aumento de las respuestas inmunitarias. La SE13A es invasiva, no patógena para las aves de granja y no produce morbilidad medible. Estas características dan como resultado un aumento de la respuesta inmunitaria en comparación con los vectores bacterianos no invasivos. La atenuación de las cepas por mutaciones en *aroA* o *htrA* mantiene la capacidad para generar una respuesta inmunitaria, pero tienen una replicación limitada en el huésped. Por lo tanto, la atenuación aumenta la seguridad del vector sin comprometer la inmunogenicidad.

Se pueden generar mutaciones en otros diversos genes de *Salmonella* que incluyen, pero no se limitan a, *cya*, *crp*, *asd*, *cdt*, *phoP*, *phoQ*, *ompR*, proteínas de la membrana externa, *dam*, *htrA* u otros genes relacionados con el estrés, *aro*, *pur* y *gua*. Como se muestra en los Ejemplos, se descubrió que las mutaciones en *aroA* y *htrA* atenuaban la SE13A. Los genes *aro* son enzimas envueltas en la ruta de biosíntesis del shikimato o la ruta de la aromataza y los mutantes *aro* son auxotróficos para los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina. El *htrA* es un gen de respuesta al estrés que codifica una proteasa periplásmica que degrada las proteínas aberrantes. Los mutantes en *htrA* también están atenuados y presentan un aumento de la sensibilidad al peróxido de hidrógeno.

Las mutaciones en *aroA* y *htrA* que se describen en los Ejemplos son mutaciones de eliminación, pero las mutaciones se pueden producir en varias maneras. Adecuadamente, las mutaciones son mutaciones irreversibles que no se pueden reparar en una única etapa. Las mutaciones adecuadas incluyen las eliminaciones, inversiones, inserciones y sustituciones. Un vector puede incluir más de una mutación, por ejemplo, un vector puede contener mutaciones tanto en *aroA* como en *htrA*. Los métodos para producir dichas mutaciones se conocen bien en la técnica.

Los polinucleótidos que codifican los antígenos de polipéptido TRAP y otros antígenos de cualquier cantidad de organismos patógenos se pueden insertar en el vector (por ejemplo, SE13A) y expresarse por las bacterias. La

expresión de estos polinucleótidos por el vector permitirá la generación de polipéptidos antigénicos después de la inmunización del sujeto. Los polinucleótidos se pueden insertar en el cromosoma de la bacteria o se pueden codificar en plásmidos u otro tipo de ADN extracromosómico. Los expertos en la técnica apreciarán que existen numerosas metodologías para obtener la expresión de polinucleótidos en vectores tales como *Salmonella*. Los polinucleótidos pueden estar conectados operativamente a un promotor (por ejemplo, un promotor constitutivo, un promotor inducible, etc.) por métodos conocidos para los expertos en la técnica. Los polinucleótidos adecuados que codifican antígenos TRAP se insertan en un polinucleótido bacteriano que se expresa. Adecuadamente, el polinucleótido bacteriano codifica una proteína transmembrana, y el polinucleótido que codifica el antígeno TRAP se inserta en la secuencia de polinucleótido bacteriano para permitir la expresión del antígeno TRAP en la superficie de la bacteria. Por ejemplo, el polinucleótido que codifica el TRAP se puede insertar en fase con el polinucleótido bacteriano en una región que codifica una región de bucle externo de una proteína transmembrana de manera que el la secuencia de polinucleótido bacteriano se mantiene en fase. Véase el Ejemplo 1.

De manera alternativa, el primer polinucleótido que codifica el antígeno TRAP se puede insertar en un polinucleótido que codifica un polipéptido secretado. Los expertos en la técnica apreciarán que el polinucleótido que codifica el antígeno TRAP podría insertarse en una amplia variedad de polinucleótidos para proporcionar la expresión y presentación del antígeno TRAP a las células inmunitarias de un sujeto tratado con la vacuna. En los Ejemplos, se insertó un primer polinucleótido que codifica el polipéptido TRAP en el bucle 9 del gen *lamB* de SE13A. El polinucleótido que codifica el antígeno TRAP se puede incluir en una única copia o en más de una copia. También se puede generar un vector bacteriano que contiene múltiples copias del antígeno TRAP que se inserta en el bucle 9 de *lamB*. De manera alternativa, se pueden insertar múltiples copias de un epítipo en el vector bacteriano en más de una localización.

Adecuadamente, el primer polinucleótido codifica una parte del polipéptido TRAP o el polipéptido TRAP completo. El polinucleótido se puede insertar en el vector. En los Ejemplos, se incorporaron tres polipéptidos (SEQ ID NO: 1-3) en SE13A. Adecuadamente, la parte de polipéptido TRAP insertado en el vector es un fragmento inmunogénico. Un fragmento inmunogénico es un péptido o polipéptido capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria celular o humoral. Adecuadamente, un fragmento inmunogénico de TRAP puede ser de 6 aminoácidos consecutivos o más, 10 aminoácidos o más, 15 aminoácidos o más o 20 aminoácidos o más de la secuencia proteica de longitud completa.

Otros epítopos adecuados para su inclusión en una vacuna que tiene el TRAP comprendido en un vector incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos que codifican otros polipéptidos relacionados con *Eimeria*. Un experto en la técnica apreciará que se puede utilizar varias secuencias en combinación con cualquier otro antígeno y se puede utilizar en conjunción con polipéptidos que codifican péptidos inmunoestimulantes tales como un polipéptido de CD154.

Como se describe posteriormente con más detalle, una vacuna que incluye un vector puede incluir un polipéptido CD154 que es capaz de unirse con CD40 en el sujeto y estimular al sujeto para que responda al vector y su antígeno asociado. La implicación de células dendríticas (CD) es esencial para el inicio de una respuesta inmunitaria fuerte ya que poseen la capacidad única para activar las linfocitos T intactas, produciendo la expansión de linfocitos T y la diferenciación en células efectoras. El papel de la CD, que es una célula presentadora de antígenos (CPA) que se encuentra en prácticamente todos los tejidos del cuerpo, es capturar antígenos, transportarlos al tejido linfoide asociado, y luego presentarlos a las linfocitos T intactas. Con la activación por las CD, las linfocitos T se expanden, se diferencian en células efectoras, abandonan los órganos inmunitarios secundarios, y entran en los tejidos periféricos. Las linfocitos T citotóxicas activadas (CTL) son capaces de destruir las células infectadas con virus, las linfocitos Tumorales o incluso las CPA infectadas con parásitos intracelulares (por ejemplo, *Salmonella*) y se ha demostrado que son críticas en la protección contra la infección vírica. El CD40 es un miembro de la familia de moléculas del receptor TNF y se expresa en varios tipos celulares, que incluyen las células presentadoras de antígenos profesionales (CPA), tales como las CD y las células B. La interacción del CD40 con su ligando el CD154 es extremadamente importante y estimulante de la inmunidad tanto celular como humoral. La estimulación de CD mediante el CD40, que se expresa en la superficie de las CD, se puede estimular por los anticuerpos anti-CD40. En el cuerpo, sin embargo, esto ocurre por interacción con el ligando natural de CD40 (es decir, el CD154) que se expresa en la superficie de linfocitos T activadas. De manera interesante, se han identificado las regiones de unión de CD154. La región de unión a CD40 del CD154 se puede expresar en la superficie de un vector, tal como un vector de *Salmonella*, y da como resultado un aumento de la respuesta inmunitaria contra una secuencia peptídica co-presentada.

Como se ha descrito anteriormente los polipéptidos CD154 se pueden insertar en el cromosoma del vector o mantenerse extracromosómicamente. Un polipéptido CD154 puede ser una parte de la proteína CD154 de longitud completa o la proteína CD154 completa. Adecuadamente, el polipéptido CD154 es capaz de unirse a CD40. Un experto en la técnica apreciará que estos polinucleótidos se pueden insertar en fase en varios polinucleótidos y expresarse en diferentes partes de vector o se pueden secretar. El polinucleótido que codifica un polipéptido CD154 capaz de aumentar la respuesta inmunitaria a TRAP puede codificar también el antígeno TRAP. El polinucleótido que codifica el polipéptido CD154 puede unirse al polinucleótido que codifica el antígeno TRAP, de manera que en el vector, el polipéptido 154 y el antígeno TRAP están presentes en el mismo polipéptido. En los Ejemplos, un

polinucleótido que codifica un polipéptido de CD154 que es capaz de unirse a CD40 también codifica el antígeno TRAP. Véase, las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 11 en el listado de secuencias adjunto. En los Ejemplos, los polinucleótidos (SEQ ID NO: 13-15) que codifican el antígeno TRAP y el polinucleótido que codifica el polipéptido CD154 se insertan ambos en un bucle 9 del gen *lamB*. Los expertos en la técnica apreciarán que también se pueden utilizar los

5 polinucleótidos bacterianos que codifican otras proteínas transmembrana y otros bucles del gen *lamB*.

Como se ha tratado anteriormente, un polinucleótido CD154 que codifica un polipéptido CD154 que es capaz de aumentar la respuesta inmunitaria contra el antígeno se puede incluir en la vacuna. Adecuadamente, el polipéptido CD154 tiene menos de 50 aminoácidos de longitud, más adecuadamente menos de 40, menos de 30 o menos de 20

10 aminoácidos de longitud. El polipéptido puede tener entre 10 y 15 aminoácidos, entre 10 y 20 aminoácidos o entre 10 y 25 aminoácidos de longitud. La secuencia de CD154 y la región de unión a CD40 no están altamente conservadas entre distintas especies. Las secuencias de CD154 del pollo y el ser humano se proporcionan en SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 4, respectivamente.

15 Las regiones de unión a CD40 de CD154 se ha determinado en varias especies, incluyendo el ser humano, pollo, pato, ratón y ganado bovino y se muestran en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, y SEQ ID NO: 9, respectivamente. Aunque hay una variabilidad en las secuencias en cuanto a la región de unión a CD40, el polipéptido CD154 humano era capaz de aumentar la respuesta inmunitaria en pollos. Por lo tanto, se puede practicar la invención utilizando polipéptidos CD154 específicas de cada especie o un polipéptido CD154 heterólogo

20 como se define en las reivindicaciones.

En los Ejemplos, se generaron varias bacterias SE13A recombinantes. En cada una de las cepas de SE13A que contenía los polinucleótidos TRAP y CD154, el polipéptido TRAP y el polipéptido CD154 se codificaban en el mismo polinucleótido y estaban en fase entre ellos y con el polinucleótido *lamB* de *Salmonella* en el que estaban insertados.

25 En realizaciones alternativas, el polipéptido CD154 y el polipéptido TRAP se pueden codificar por distintos polinucleótidos. La SE13A *aroA htrA* TRAP contiene una eliminación en *aroA* y *htrA* y codifica tanto el epitopo TRAP (SEQ ID NO: 1-3) como opcionalmente el polipéptido CD154 (SEQ ID NO: 4) insertados en el bucle 9 de *lamB*.

También se proporcionan composiciones que comprenden una cepa de *Salmonella* atenuada y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es cualquier vehículo adecuado para la administración *in vivo*. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en la composición incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones tampón, soluciones de glucosa o fluidos de cultivo bacteriano. Los componentes adicionales de las composiciones pueden incluir adecuadamente, por ejemplo, excipientes tales como estabilizadores, conservantes, diluyentes, emulsionantes y lubricantes. Ejemplos de

30 vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen estabilizantes tales como carbohidratos (por ejemplo, sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas tales como albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas tales como suero bovino o leche desnatada y tampones (por ejemplo, tampón fosfato). Especialmente cuando dichos estabilizantes se añaden a las composiciones, la composición es adecuada para secado por congelación o secado por pulverización.

40 También se proporcionan métodos para aumentar las respuestas inmunitarias en un sujeto por la administración de una vacuna que contiene un polipéptido TRAP y un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40 y activar el CD40. La vacuna que comprende el polinucleótido que codifica un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40 se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para aumentar la respuesta inmunitaria del sujeto a la vacuna. Adecuadamente, la

45 vacuna contiene un polinucleótido que codifica un polipéptido que incluye los aminoácidos 140-149 del polipéptido CD154 humano (SEQ ID NO: 4) o un homólogo del mismo. Por lo tanto, se puede utilizar un homólogo con los aminoácidos 140-149 derivado de una especie para estimular una respuesta inmunitaria en una especie distinta.

Se han identificado en el presente documento varios polipéptidos adecuados. Adecuadamente, el polinucleótido codifica un polipéptido CD154 de la misma especie que la del sujeto. Adecuadamente, un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 5 se utiliza en sujetos humanos, un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 6 se utiliza en pollos, un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 7 se utiliza en patos, un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 8 se utiliza en ratones, y un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 9 se utiliza en vacas. En los Ejemplos, el polipéptido CD154 humano (SEQ ID NO: 5) se utilizó en una vacuna para pollos y se demostró que aumentaba la respuesta inmunitaria contra un antígeno ajeno. Por lo tanto, pueden ser útiles otras combinaciones heterólogas de polipéptidos CD154 y sujetos en los métodos descritos en el presente documento. El polipéptido CD154 se puede utilizar para aumentar la respuesta inmunitaria en el sujeto a cualquier antígeno ajeno o polipéptido antigénico presente en la vacuna además del polipéptido TRAP. Un experto en la técnica apreciará que el polipéptido CD154 se podría utilizar para aumentar la respuesta

60 inmunitaria contra más de un polipéptido antigénico presente en una vacuna.

El polipéptido de CD154 estimula una respuesta inmunitaria al menos en parte uniéndose a su receptor CD40. Los Ejemplos utilizaban un polipéptido homólogo al polipéptido CD154 que se expresa en células inmunitarias del sujeto y que es capaz de unirse al receptor CD40 sobre los macrófagos y otras células presentadoras de antígenos. La unión de este complejo ligando-receptor estimula los macrófagos (y células del linaje de los macrófagos tales como las células dendríticas) para aumentar la fagocitosis y la presentación de antígenos mientras que se aumentan las

secreciones de citocinas que se sabe que activan otras células inmunitarias locales (tales como los linfocitos B). Como tal, las moléculas asociadas con el péptido CD154 son dirigidas preferentemente para la respuesta inmunitaria y la producción expandida de anticuerpos.

- 5 Vectores potenciales para su uso en los métodos incluyen, pero no se limitan a, *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*), *Shigella*, *Escherichia* (*E. coli*), *Yersinia*, *Bordetella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Vibrio* (*Vibrio cholerae*), *Listeria*, adenovirus, poxvirus, herpesvirus, alfavirus y virus adeno-asociados.

Además, se desvelan métodos para aumentar una respuesta inmunitaria contra un parásito apicomplejo y los métodos para reducir la morbilidad asociada con la infección posterior con un parásito apicomplejo. En resumen, los métodos comprenden la administración a un sujeto de una vacuna que comprende una primera secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido TRAP en una cantidad eficaz. Los polipéptidos TRAP pueden incluir las SEQ ID NO: 1-3 y 11. La inserción de los polipéptidos TRAP en el vector se puede conseguir de varias maneras conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse al sistema de mutación dirigida al sitio sin cicatriz descrita en BMC Biotechnol. 2007 Sept, 17: 7(1): 59, Scarless and Site-directed Mutagenesis in *Salmonella enteritidis* chromosome. El vector se puede modificar también para que exprese los polipéptidos TRAP en conjunción con otros polipéptidos capaces de aumentar la respuesta inmunitaria como se ha tratado anteriormente, tales como los de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 10. En particular, se puede expresar un polipéptido de CD154 que sea capaz de unirse a CD40 por el vector para aumentar la respuesta inmunitaria del sujeto contra el polipéptido TRAP. Opcionalmente, el vector es una bacteria, tal como *Salmonella enteritidis*.

La dosificación útil de la vacuna que se va a administrar variará dependiendo de la edad, peso y especie del sujeto, el modo y vía de administración y el tipo de agente patógeno contra el que se desee la respuesta inmunitaria. La composición se puede administrar a cualquier dosis suficiente para provocar una respuesta inmunitaria. Para las vacunas bacterianas, se concibe que son adecuadas las dosis varíen de 10^3 a 10^{10} bacterias, de 10^4 a 10^9 bacterias, o de 10^5 a 10^7 bacterias. La composición se puede administrar solo una vez o se puede administrar dos o más veces para aumentar la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la composición se puede administrar dos o más veces separadas una semana, dos semanas o por tres o más semanas. Las bacterias son viables adecuadamente antes de la administración, pero en algunas realizaciones, las bacterias pueden destruirse antes de la administración. En algunas realizaciones, las bacterias son capaces de replicarse en el sujeto, mientras que en otras realizaciones las bacterias no son capaces de replicarse en el sujeto.

Para su administración a animales o seres humanos, las composiciones se pueden administrar por varios medios que incluyen, pero no se limitan a la vía intranasal, mucosa, por pulverización, intradérmica, parenteral, subcutánea, oral, por aerosol o intramuscular. Son adecuadas adicionalmente la administración por gotas oftálmicas o la adición al agua de bebida o el alimento. Para los pollos, las composiciones se pueden administran *in ovo*.

Algunas realizaciones de la presente divulgación proporcionan métodos para aumentar las respuestas inmunitarias en un sujeto. Los sujetos adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, vertebrados, adecuadamente mamíferos, adecuadamente un ser humano, y aves, adecuadamente aves de granja tales como los pollos. Se pueden utilizar otros modelos animales de infección. El aumento de la respuesta inmunitaria incluye, pero no se limita a, inducir un efecto terapéutico o profiláctico que está mediado por el sistema inmunitario del sujeto. Específicamente, el aumento de una respuesta inmunitaria puede incluir, pero no se limita a, el aumento de la producción de anticuerpos, el aumento del cambio de clase de las cadenas pesadas de anticuerpos, la maduración de las células presentadoras de antígeno, la estimulación de linfocitos T auxiliares, la estimulación de linfocitos T citolíticas o la inducción de linfocitos T y B de memoria.

Se ha concebido que se puedan administrar varios epítopos o antígenos del mismo o diferentes agentes patógenos en combinación en una única vacuna para generar un aumento de la respuesta inmunitaria contra múltiples antígenos. Las vacunas recombinantes pueden codificar antígenos de múltiples microorganismos patógenos, virus o antígenos asociados a tumores. La administración de la vacuna que es capaz de expresar múltiples antígenos tiene la ventaja de que induce inmunidad contra dos o más enfermedades al mismo tiempo. Por ejemplo, una bacteria viva atenuada, tal como *Salmonella enteritidis* 13A, proporciona un vector adecuado para desencadenar una respuesta inmunitaria contra múltiples antígenos.

Las vacunas bacterianas se pueden construir utilizando polinucleótidos exógenos que codifican antígenos que se pueden insertar en el genoma bacteriano en un sitio no esencial o alternativamente pueden transportarse en un plásmido utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Un sitio adecuado para la inserción de polinucleótidos es en las partes externas de proteínas transmembrana o acoplados a secuencias que dirigen los polinucleótidos exógenos por rutas secretoras. Un ejemplo de una proteína transmembrana adecuada para la inserción de polinucleótidos es el gen *lamB*. En los Ejemplos, los polinucleótidos TRAP y CD154 se insertaron en el bucle 9 de la secuencia *lamB*.

Los polinucleótidos exógenos incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos que codifican antígenos que se seleccionan de entre microorganismos patógenos o virus e incluyen polinucleótidos que se expresan de tal manera que se genera una respuesta inmunitaria eficaz. Dichos polinucleótidos se pueden derivar de virus patógenos tales

5 como gripe (por ejemplo, M2e, hemaglutinina o neuraminidasa), herpesvirus (por ejemplo, los genes que codifican las proteínas estructurales de herpesvirus), retrovirus (por ejemplo, la proteína de la cubierta gp160), adenovirus, paramyxovirus, coronavirus y similares. Los polinucleótidos exógenos se pueden obtener también de bacterias patógenas, por ejemplo, genes que codifican proteínas bacterianas tales como toxinas, y proteínas de la membrana externa. Además, los polinucleótidos exógenos de parásitos, tales como otros parásitos apicomplejos son candidatos atractivos para su uso como una vacuna de vector.

10 Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos implicados en poner en marcha el sistema inmunitario también se pueden incluir en un vector, tal como una vacuna de *Salmonella* viva atenuada. Los polinucleótidos pueden codificar moléculas del sistema inmunitario conocidas por sus efectos estimulantes, tales como interleucina, Factor de Necrosis Tumoral, un interferón, y otros polinucleótidos implicados en la inmunorregulación. La vacuna también puede incluir polinucleótidos que codifican péptidos conocidos por estimular una respuesta inmunitaria, tal como el polipéptido CD154 que se ha descrito en el presente documento.

15 Los siguientes ejemplos tienen la intención solamente de ser ilustrativos y no se consideran como limitaciones del alcance de la invención o de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

20 Ejemplo 1. Construcción de inserciones TRAP y TRAP/CD154

Cepas y condiciones de cultivo

25 Todos los plásmidos se mantuvieron en células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a menos de que se describa otra cosa. Se utilizó *Salmonella enteritidis* 13A para la introducción de mutaciones. La cepa de *Salmonella enteritidis* era un aislado de campo disponible en USDA/APHIS/NVSL y depositado con el número de depósito de la ATCC PTA-7871. Las bacterias que portaban el plásmido pKD46 se cultivaron a 30 °C. Otras bacterias se cultivaban a 37 °C. La extracción del plásmido se llevó a cabo a 37 °C.

30 Se utilizó medio Luria-Bertani (LB) para el crecimiento celular de rutina, y medio SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para la expresión fenotípica tras la electroporación. Si era apropiado, se añadían al medio los siguientes antibióticos: ampicilina (Amp) a 100 µg/ml, kanamicina (Km) a 50 µg/ml, y cloranfenicol (Cm) a 25 µg/ml.

Plásmidos

35 Se habían descrito anteriormente los plásmidos pKD46, pKD13, y pBC-I-SceI (Datsenko y Wanner, PNAS 2000, 97:6640-6645 y Kang et al., J Bacteriol 2004, 186:4921-4930). El plásmido pKD46 codifica la enzima Recombinasa Red que media en la recombinación homóloga de entrada del ADN lineal en el ADN cromosómico. Este plásmido también contiene el gen de resistencia a Ampicilina y es sensible a la temperatura de manera que necesita 30 °C para su mantenimiento en la célula. El plásmido pKD13 funciona como matriz para la amplificación del gen de resistencia a Km (Km^r) utilizando en la PCR de solapamiento. El plásmido pBC-I-SceI, que se mantiene en la célula a 37 °C, produce la enzima I-SceI que escinde la siguiente secuencia de reconocimiento rara, de 18 pares de bases 5'-TAGGGATAACAGGGTAAT-3' (SEQ ID NO: 16). El plásmido pBC-I-SceI también contiene el gen de resistencia al cloranfenicol (Cm^r).

45 PCR

50 Todos los cebadores que se utilizaron para la PCR se enumeran en la Tabla 1. Normalmente, se llevó a cabo la PCR utilizando aproximadamente 0,1 µg de ADN genómico, de plásmido o generado por PCR (Qiagen, Valencia, CA, USA), 1x de tampón de polimerasa *Pfu* clonada, 5 U de polimerasa *Pfu* (Stratagene La Jolla, CA, USA), 1 mM de dNTPs (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ), y 1,2 µM de cada cebador con un volumen total de 50 µl. Se utilizó el motor termociclador de ADN (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) con las siguientes condiciones de amplificación: 94 °C durante 3 minutos; 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 58 °C durante 60 s, 72 °C durante 90 s para 1 kb; y 72 °C durante 10 minutos para la extensión final. Cada producto de la PCR se purificó en gel (Qiagen, Valencia, CA, USA) y se eluyó en 25 µl de tampón EB para la preparación de matrices que se utilizan en la PCR con extensión solapada o en 50 µl de tampón EB, se precipitó con etanol y se suspendió en 5 µl de ddH₂O para la electroporación en *S. enteritidis*.

Tabla 1. Secuencias de cebador

Cebador	Región amplificada	Secuencia de cebador
lam-up-f lam-up-r	arriba del bucle 9	5'TGTACAAGTGGACGCCAATC 3' (SEQ ID NO: 17) 5'GTTATCGCCGTCTTTGATATAGCC 3' (SEQ ID NO: 18)

Construcción arriba del bucle 9 - I-SceI/Km^r - abajo del bucle 9

Se hizo la introducción del sitio de reconocimiento de la enzima I-SceI junto con el gen Km^r en el bucle 9 del gen *lamB* combinando el sistema de Recombinasa Red (Datsenko y Wanner, PNAS 2000, 97:6640-6645) y la PCR de solapamiento (Horton et al., BioTechniques 1990, 8:528-535). El sitio de inserción se corresponde con el nucleótido 1257 del gen *lamB* utilizando *Salmonella typhimurium* LT2 (*S. typhimurium*) como un genoma de referencia anotado. Primero, las regiones corriente arriba y corriente abajo que flanqueaban inmediatamente el sitio de inserción del bucle 9 (arriba de bucle 9 y abajo de bucle 9, respectivamente) se amplificaron por separado. Los cebadores que se utilizaron eran lam-up-f y lam-up-r para arriba de bucle 9 y lam-dn-f y lam-dn-r para abajo de bucle 9. Luego el gen Km^r del plásmido pKD13 se amplificó utilizando los cebadores Km-f y Km-r. Aquí, se añadía sintéticamente el sitio de la enzima I-SceI en el extremo 5' del cebador Km-f precedida entonces por una región complementaria al cebador loop-up-r. Al igual, se añadió una región complementaria del cebador loop-dn-f en el extremo 5' del cebador Km-r. Las regiones complementarias permiten a los 3 productos de PCR hibridarse cuando se utilizan como matrices en una reacción PCR. La Figura 2A representa este diseño esquemático. Los fragmentos de PCR que consisten en la secuencia arriba del bucle 9 – I-SceI/Km^r – abajo del bucle 9 (PCR-A) se electroporaron en células de *S. enteritidis*, que albergaban el pKD46 y se indujeron con arabinosa, y luego se colocaron en placas con LB con Km. Para verificar la orientación de secuencia correcta de la mutación, los inventores llevaron a cabo una PCR de colonia con los pares de cebadores Kan4F/lam3f y Kan4R/lam3r, donde Kan4F y Kan4R son cebadores específicos del gen Km^r e lam3f y lam3r son cebadores localizados exteriormente a la región del bucle 9 de *lamB*. Estos fragmentos de la PCR se purificaron en gel (Qiagen, Valencia, CA, USA) y se utilizaron para la secuenciación de ADN.

Construcción arriba del Bucle 9 – TRAP-CD154 – abajo del bucle 9

El fragmento final de PCR de solapamiento, PCR-B, contenía el antígeno TRAP añadido en combinación con secuencias CD154 flanqueados por las regiones arriba y abajo del bucle 9 (Figura 2B). Las secuencias de combinación consistían en el polinucleótido TRAP que codifica la SEQ ID NO: 1-3 y CD154 junto con espaciadores tales como los restos de Serina (Ser).

Para acortar la cantidad de etapas para la construcción del próximo fragmento, la secuencia TRAP-CD154 se añadió sintéticamente al extremo 5' del cebador lam-dn-f y precedido por la región complementaria del cebador loop-up-r. El producto de PCR que se utilizó anteriormente para arriba del bucle 9 se podía utilizar junto con el producto de la PCR recién construido en el que se incorporaban TRAP-CD154 en el extremo 5' abajo del bucle 9 para llevar a cabo la reacción PCR final. Sin embargo, para las otras secuencias de la inserción, era necesaria una etapa de PCR extra, debido a las longitudes más largas de las secuencias de la inserción, para amplificar arriba del bucle 9 con nucleótidos añadidos específicos de las secuencias de inserción conectadas al cebador loop-up-r. La secuencia codificante para Gly (GGT) y Serina (TCC) así como todos los otros aminoácidos se escogieron basándose en los datos almacenados de los codones utilizados más frecuentemente en las proteínas de *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. Véase la Tabla 1 para más detalles del diseño de cebadores.

40 Mutación de inserción del sitio I-SceI/Km^r

La primera etapa de la mutación implicaba diseñar un fragmento de PCR, PCR-A, que serviría como portador para el casete del sitio I-SceI/Km^r que se va a insertar en el sitio *lamB*. El PCR-A consistía en el sitio de reconocimiento de la enzima I-SceI adyacente al gen Km^r con aproximadamente 200-300 pb de ADN flanqueando cada extremo homólogo de las regiones corriente arriba y corriente abajo del sitio de inserción del bucle 9 de *lamB* (arriba del bucle 9 y abajo del bucle 9, respectivamente). El fragmento se introdujo en las células de *S. enteritidis* que expresaban enzimas Recombinasa Red y se seleccionaron las colonias Km^r. Tras explorar unas cuantas colonias por PCR de colonia, los clones positivos se secuenciaron en cuanto a la secuencia deseada de la inserción del sitio I-SceI/Km^r y el mutante identificado se seleccionó y se designó como SE164.

50 Sustitución genómica de I-SceI/Km^r con TRAP-CD154

La segunda etapa de la mutación necesitaba la construcción de un fragmento de PCR, al que se hace referencia como PCR-B y se muestra en la Figura 2B, que consistía en la secuencia de inserción final, el TRAP-CD154, flanqueada por fragmentos homólogos a *lamB*. Los amplicones PCR-B no tienen marcador de selección y deben contra-seleccionarse tras la sustitución con la mutación previa del sitio I-SceI/Km^r en SE164. El plásmido pBC-I-SceI codifica el gen Cm^r y la enzima I-SceI, que cortará el genoma en el sitio I-SceI de SE164. Por lo tanto el pBC-I-SceI se electroporó en SE164 junto con el PCR-B. Tras la recombinación del PCR-B para sustituir el PCR-A, los clones positivos se escogieron basándose en la capacidad para crecer en Cm pero no en Km. Tras la secuenciación del ADN de los mutantes para confirmar la recombinación satisfactoria de PCR-B, se diseñaron las cepas Secuencia-1, Secuencia-2 y Secuencia-3. Se utilizaron diez clones aleatorios para cada una de las inserciones TRAP-CD154 para la PCR con lam 3f y lam 3r y entonces se digirieron utilizando sitios de enzimas de restricción únicos para cada secuencia de inserción y el 100 % de los clones ensayados por digestión eran positivos a la secuencia de mutación deseada. Los resultados de la secuenciación demuestran que la inserción de TRAP-CD154 estaba exactamente en la región del bucle 9 sin adición de nucleótidos ajenos en cada caso. Las inserciones de las vacunas TRAP-CD154 son de la siguiente manera: TRAP-CD154 (SEQ ID NO: 33); TRAP-US-CD154 (SEQ ID NO: 34); TRAP-DS-CD154

(SEQ ID NO: 35).

Ejemplo 2. Atenuación de las mutantes/inserciones TRAP-CD154

5 La atenuación de SE13A se consiguió por mutación de eliminación del gen *aroA* y/o el gen *htrA*. La mutación del gen *aroA*, un gen clave en la ruta del ácido corísmico de las bacterias, da como resultado una deficiencia metabólica grave que afecta a siete rutas bioquímicas distintas. La mutación del gen *htrA* reduce la capacidad de las células para soportar la exposición a bajas y altas temperaturas, bajo pH, y agentes perjudiciales para el ADN y oxidativos y reduce la virulencia de bacteria.

10 Para conseguir las mutaciones de eliminación en SE13A, la secuencia génica diana en el genoma bacteriano de *S. enteritidis* se sustituyó con la secuencia del gen de resistencia a Km. Esto se completó utilizando la PCR de extensión solapada y electroporación de los productos PCR como se ha descrito anteriormente. El gen de resistencia a Km se dirigió a la región genómica que contenía los genes de interés (*aroA* o *htrA*) flanqueando el gen de resistencia a Km con 200-300 pares de bases de secuencias homólogas a los genes de interés. Una vez que se obtenían las mutantes resistentes a Km, se confirmaron las mutaciones de eliminación de *aroA* y *htrA* por secuenciación de ADN. Las cepas análogas de *Salmonella aroA* y *htrA* se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 13 de septiembre de 2006 (Depósito N° PTA-7873 y Depósito N° PTA-7873, respectivamente). Las cepas atenuadas se ensayaron previamente *in vivo* con respecto al tiempo de aclaramiento. Ambas cepas atenuadas tenían tiempos de aclaramiento más rápidos que la cepa 13A de tipo silvestre, pero ambas eran capaces de colonizar el hígado, bazo y amígdalas cecales de los pollos tras la infección oral. Se aislaron las cepas atenuadas que comprendían TRAP-CD154 y carecían tanto de *aroA* como de *htrA*.

Ejemplo 3. Protección de los pollos de la mortalidad tras la infección por *Eimeria*

25 El día de la eclosión, los pollos (n=280) se vacunaron por vía oral con aproximadamente 1×10^8 ufc de los aislados de *Salmonella* que comprendían los tres polinucleótidos distintos que codificaban los polipéptidos TRAP de SEQ ID NO: 1-3 o un control de solución salina. A los 21 días de edad, los pollos se desafiaron por vía oral con 10^4 ooquistes esporulados de *Eimeria maxima*. Los pollos se controlaron diariamente tras el desafío. Como se representa en la figura 3, la mortalidad de los pollos el día 5 tras el desafío se redujo en comparación con los animales no vacunados independientemente de la cepa vacunal administrada. La mortalidad era la siguiente: TRAP (SEQ ID NO: 1) 7/43 (16.3 %); TRAP US (SEQ ID NO: 2) 1/46 (2,2 %); TRAP DS (SEQ ID NO: 3) 6/43 (11 %); Control (no vacunado) 10/46 (21.7 %). Sorprendentemente, los pollos vacunados con una *Salmonella* que comprende el polipéptido TRAP de SEQ ID NO: 2 demostraba una reducción de la mortalidad extraordinaria y significativa en comparación con los pollos no vacunados de control ($P < 0,001$). Se llevó a cabo la necropsia e indicaba que toda la mortalidad se relacionaba con infección por *Eimeria maxima*.

40 En un experimento repetido, la mortalidad en las aves vacunadas (6/48) era significativamente menor que los controles (17/50) y la actuación era mejor en los pollos vacunados, pero la diferencia no era significativa.

Además, se recolectó el suero de las aves inmunizadas y se llevó a cabo un ELISA para TRAP. Se generó una robusta respuesta a TRAP en las aves vacunadas con TRAP-US (SEQ ID NO: 2).

Ejemplo 4. Se limita la morbilidad asociada con la vacunación

45 Para evaluar la eficacia de TRAP US-CD154 (SEQ ID NO: 34) como una potencial vacuna candidata, se completó un estudio para investigar la morbilidad asociada con la vacunación. Se vacunaron pollos Broiler por vía oral con 1×10^8 ufc/ave de vacuna de *Salmonella* con la inserción TRAP US y CD154 (SEQ ID NO: 34) o falsamente vacunados con solución salina. El desafío con los coccidios se llevó a cabo con ooquistes esporulados de *Eimeria maxima* (10^5 ooquistes esporulados/ave) a las tres semanas tras la vacunación. Se evaluaron la ganancia de peso y las lesiones 7 días tras el desafío. Las aves inmunizadas mostraban una mejoría significativa ($p < 0,01$) en la actuación. Las aves inmunizadas tenían aproximadamente un 31 % de ganancia de peso en comparación con los controles no vacunados. Por lo tanto, la vacunación con una vacuna basada en *Salmonella* que comprende un polipéptido TRAP y un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40 puede proteger las aves de la morbilidad y mortalidad asociada con la infección por *Eimeria*.

LISTA DE SECUENCIAS

60 <110> BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA AUMENTAR LAS RESPUESTAS INMUNITARIAS A *EIMERIA*

<130> 013961-9038 WO00

65 <140> Nuevo Pedido Internacional

<141> 03-11-2008

ES 2 599 905 T3

<150> US 60/984.612
 <151> 01-11-2007

<160> 35

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Eimeria maxima*

10

<400> 1

Gly Gly Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala
 1 5 10

15

<210> 2
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> *Eimeria maxima*

20

<400> 2

Ala Ala Pro Glu Thr Pro Ala Val Gln Pro Lys Pro Glu Glu Gly His
 1 5 10 15

Glu Arg Pro Glu Pro Glu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gly Gly
 20 25 30

Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala
 35 40

25

<210> 3
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> *Eimeria maxima*

30

<400> 3

Gly Gly Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala Gly Gly Val Gly Gly Val
 1 5 10 15

Leu Leu Ile Ala Ala Val Gly Gly Gly Val Ala Ala Phe Thr Ser Gly
 20 25 30

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gln Glu
 35 40

35

<210> 4
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40

<400> 4

ES 2 599 905 T3

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

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
 20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
 35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
 50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
 65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

ES 2 599 905 T3

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

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

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
 225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
 245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
 260

5 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5

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

15 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*
 <400> 6

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

25 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Anas sp.*
 <400> 7

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

35 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus sp.*

<400> 8

ES 2 599 905 T3

Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys

1 5 10

5

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> *Bos taurus*

<900> 9

Trp Ala Pro Lys Gly Tyr Tyr Thr Leu Ser

1 5 10

10

15

<210> 10
<211> 272
<212> PRT
<213> *Gallus gallus*

<400> 10

ES 2 599 905 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11
 <211> 70
 5 <212> PRT
 <213> *Eimeria maxima*
 <400> 11

Ala Ala Pro Glu Thr Pro Ala Val Gln Pro Lys Pro Glu Glu Gly His
 1 5 10 15

Glu Arg Pro Glu Pro Glu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gly Gly
 20 25 30

Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala Gly Gly Val Gly Gly Val Leu Leu
 35 40 45

Ile Ala Ala Val Gly Gly Gly Val Ala Ala Phe Thr Ser Gly Gly Gly
 50 55 60

Gly Ala Gly Ala Gln Glu
 65 70

10
 15 <210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Eimeria maxima*
 <400> 12

ES 2 599 905 T3

```

ggtggtggtt ttccgaccgc ggcggttgcg 30

<210> 13
<211> 120
5 <212> ADN
  <213> Eimeria maxima

<400> 13

      gcggcgccgg aaaccccggc ggttcagccg aaagccgaag aaggatcatga acgtccggaa      60
      ccggaagaag aagaagaaaa aaaagaagaa ggtggtggtt ttccgaccgc ggcggttgcg      120

10

<210> 14
<211> 120
15 <212> ADN
  <213> Eimeria maxima

<400> 14

      ggtggtggtt ttccgaccgc ggcggttgcg ggtggtggtg gtggtggttct gctgatcgcg      60
      gcggttgggtg gtggtggtgc ggcgtttacc tccggtggtg gtggtgcggg tgcgcaggaa      120

20

<210> 15
<211> 210
25 <212> ADN
  <213> Eimeria maxima

<400> 15

      gcggcgccgg aaaccccggc ggttcagccg aaagccgaag aaggatcatga acgtccggaa      60
      ccggaagaag aagaagaaaa aaaagaagaa ggtggtggtt ttccgaccgc ggcggttgcg      120
      ggtggtggtg gtggtggtct gctgatcgcg gcggttgggtg gtggtggtgc ggcgtttacc      180
      tccggtggtg gtggtgcggg tgcgcaggaa      210

30

<210> 16
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
  <223> Secuencia de reconocimiento de enzima I-SceI

<400> 16
taggataac aggtaac 18

40

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> arriba del bucle 9

<400> 17
50 tgtacaagtg gacccaatc 20

<210> 18

```

ES 2 599 905 T3

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

5 <220>
 <223> arriba del bucle 9

<400> 18
 gttatcgccg tctttgatat agcc 24

10 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> abajo del bucle 9

<400> 19
 atttcccggt atgccgcagc 20

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

25 <220>
 <223> abajo del bucle 9

<400> 20
 gttaaacaga gggcgacgag 20

30 <210> 21
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> gen I-Scel/Kmr

40 <400> 21

gctatatcaa agacggcgat aactaactat aacggtccta aggtagcga tttccgggga 60
 tccgtcga 68

45 <210> 22
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> gen I-Scel/Kmr

<400> 22
 gctgcgcat aacgggaaat tgtaggctgg agctgctcg 90

55 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> gen interior Kmr: secuenciación

ES 2 599 905 T3

```

<400> 23
caaaagcgct ctgaagtcc 20

5 <210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> gen interior Kmr: secuenciación

<900> 24
gcgtgagggg atctgaagt 20

15 <210> 25
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> SEQ1 hCD154/ arriba del bucle 9

<400> 25

        ggaggacgca accgccgcgg tcggaaaacc accaccggag gaggagtat cgccgtcttt      60
        gatatagcc                                                                                                       69

25 <210> 26
<211> 82
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> SEQ1hCD154/ abajo del bucle 9

35 <400> 26

        ccgcggcggg tgcgtcctcc tctgggcag aaaaaggta ttataccatg tcttcctcct      60
        ccatttcccg ttatgccgca gc                                                                                       82

40 <210> 27
<211> 113
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> SEQ2-hCD154/ arriba del bucle 9

<400> 27

        ttttcttctt cttcttccgg ttccggacgt tcatgacctt cttcgcttt cggetgaacc      60
        gccggggttt ccggcgcgcg ggaggaggag ttatcgccgt ctttgatata gcc                                                                 113

50 <210> 28
<211> 129
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>

```

ES 2 599 905 T3

<223> SEQ2-hCD154/ abajo del bucle 9

<400> 28

```

    accggaagaa gaagaagaaa aaaaagaaga aggtggtggt tttccgaccg cggcgggtgc      60
    gtctctctcc tgggcagaaa aaggttatta taccatgtct tcctctctcca tttcccgta      120
5      tgccgcagc      129

```

<210> 29
 <211> 113
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> SEQ3 hCD154/ arriba del bucle 9

15

<400> 29

```

    gcaacaccac caccaaccgc cgcgatcagc agaacaccac caacaccacc cgcaaccgcc      60
    gcggtcggaa aaccaccacc ggaggaggag ttatcgccgt ctttgatata gcc      113

```

<210> 30
 <211> 129
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> SEQ3-hCD154/ abajo del bucle 9

25

<400> 30

```

    ggcggttggg ggtggtggtg cggcgtttac ctccggtggt ggtggtgcgg gtgcgcagga      60
    atctctctcc tgggcagaaa aaggttatta taccatgtct tcctctctcca tttcccgta      120
    tgccgcagc      129

```

30

<210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Regiones exteriores del bucle 9: secuenciación

40

<400> 31
 gccatctgc ttggtgataa 20

<210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Regiones exteriores del bucle 9: secuenciación

50

<400> 32
 cgctggtatt ttgcgtaca 20

<210> 33

ES 2 599 905 T3

<211> 87
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> TRAP-CD154

<400> 33

tcctcctccg gtggtggttt tccgaccgcg gcggttgctg cctcctcctg ggcagaaaaa 60
 ggattattata ccatgtcttc ctctccc 87

10

<210> 34
 <211> 177
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> TRAP-US-CD154

20

<400> 34

tcctcctccg cggcgccgga aaccccgccg gttcagccga aagccgaaga aggtcatgaa 60
 cgtccggaac cggaagaaga agaagaaaaa aaagaagaag gtggtggttt tccgaccgcg 120
 gcggttgctg cctcctcctg ggcagaaaaa ggattattata ccatgtcttc ctctccc 177

25

<210> 35
 <211> 177
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> TRAP-DS-CD154

<400> 35

tcctcctccg gtggtggttt tccgaccgcg gcggttgccg gtggtgttg tggtgttctg 60
 ctgatcgcgg cggttggtgg tggtgttgcg gcgtttacct cgggtgttg tggtgcgggt 120

ggcaggaat cctcctcctg ggcagaaaaa ggattattata ccatgtcttc ctctccc 177

35

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende una primera secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido TRAP o un fragmento inmunogénico del mismo, en la que el primer polinucleótido codifica un polipéptido TRAP que es SEQ ID NO: 2 o codifica un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 2.
2. La vacuna de la reivindicación 1, que comprende además una segunda secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40, teniendo el polipéptido CD154 menos de 50 aminoácidos y comprendiendo:
- (i) los aminoácidos 140-149 de SEQ ID NO: 4,
 - (ii) SEQ ID NO: 5,
 - (iii) SEQ ID NO: 6,
 - (iv) SEQ ID NO: 7,
 - (v) SEQ ID NO: 8, o
 - (vi) SEQ ID NO: 9.
3. La vacuna de la reivindicación 2, en donde la vacuna comprende más de una copia de la primera secuencia de polinucleótido, más de una copia de la segunda secuencia de polinucleótido o más de una copia de la primera secuencia de polinucleótido y más de una copia de la segunda secuencia de polinucleótido.
4. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en la que la primera secuencia de polinucleótido está unida en fase a la segunda secuencia de polinucleótido.
5. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en la que el primer polinucleótido está comprendido en un vector.
6. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el primer polinucleótido está comprendido dentro de una bacteria, comprendiendo la bacteria el polipéptido TRAP en su superficie.
7. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el primer polinucleótido está comprendido dentro de una bacteria y la bacteria se selecciona de entre el grupo que consiste en especies de *Salmonella*, especies de *Bacillus*, especies de *Escherichia* y especies de *Lactobacillus*.
8. La vacuna de la reivindicación 7, en la que la bacteria es una *Salmonella enteritidis* que se selecciona de entre las cepas depositadas en la ATCC como PTA-7871, ATCC PTA-7872 y ATCC PTA-7873.
9. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la primera secuencia de polinucleótido está insertada en una secuencia de polinucleótido que codifica una parte externa de una proteína transmembrana.
10. Un uso de una vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en la preparación de un medicamento para aumentar la respuesta inmunitaria contra un parásito *Eimeria* en un sujeto, comprendiendo el aumento de la respuesta inmunitaria la administración al sujeto de la vacuna en una cantidad eficaz para aumentar la respuesta inmunitaria del sujeto al parásito *Eimeria*.
11. El uso de la reivindicación 10, en el que el aumento de la respuesta inmunitaria comprende un aumento de la respuesta de anticuerpos o un aumento de la respuesta de linfocitos T.
12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en el que la vacuna no es capaz de replicarse.
13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que el parásito *Eimeria* es *Eimeria maxima*.
14. Una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un método para aumentar la respuesta inmunitaria contra un parásito *Eimeria* en un ave de granja, comprendiendo el método la administración al ave de granja de la vacuna en una cantidad eficaz para aumentar la respuesta inmunitaria del ave de granja contra el parásito *Eimeria*.

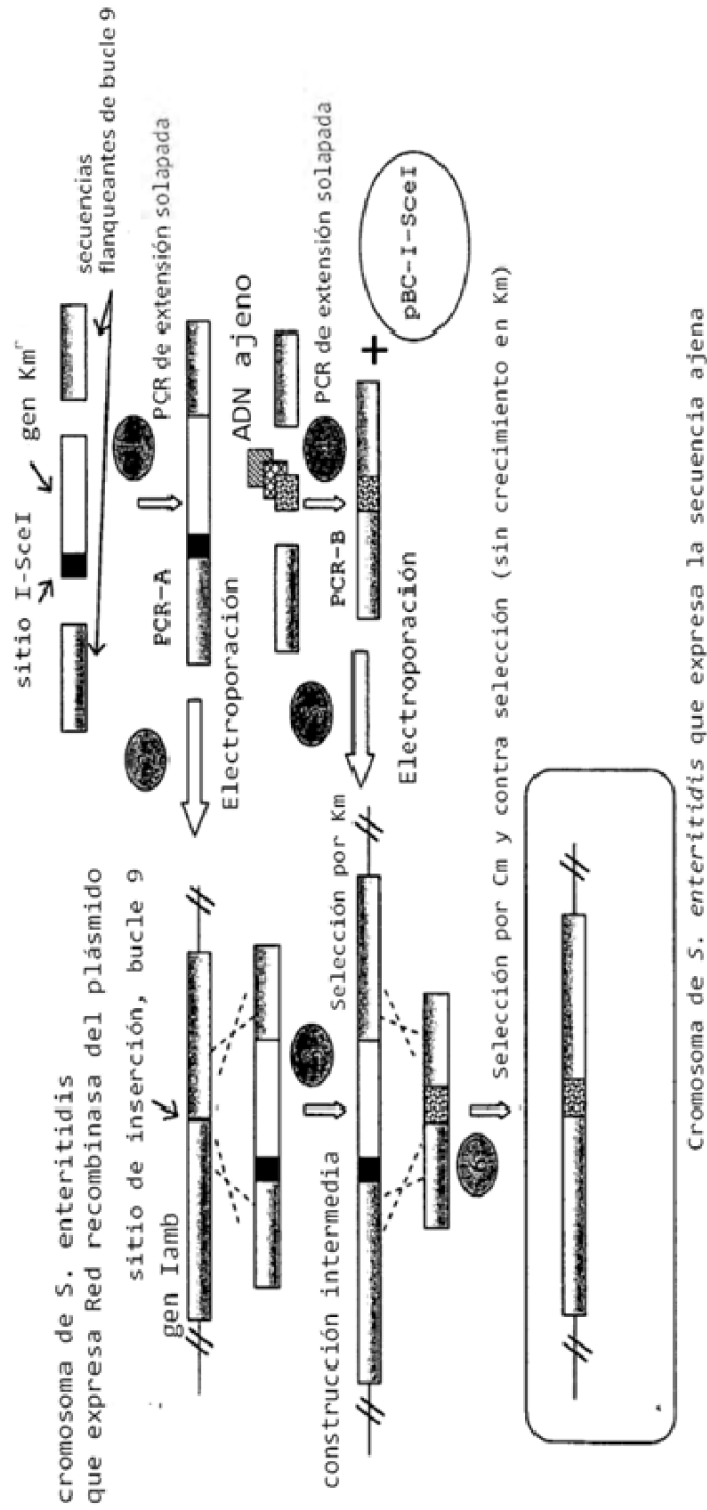
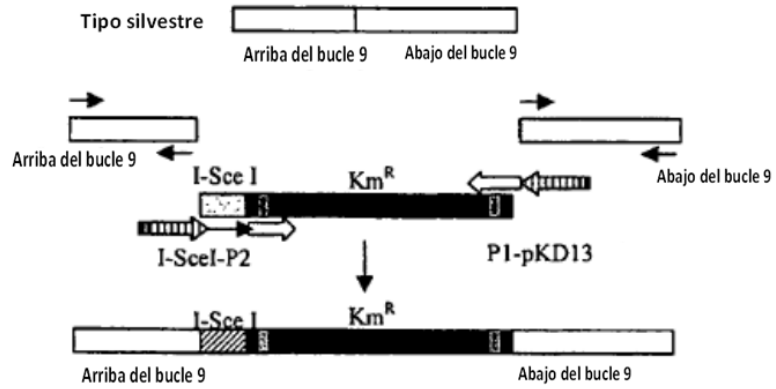


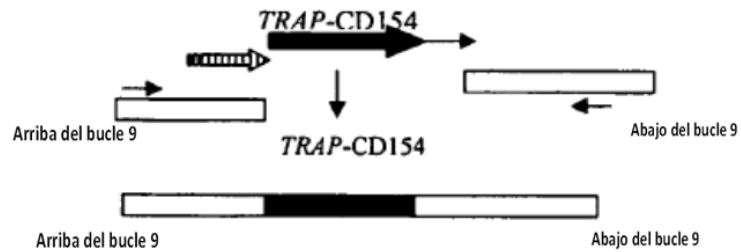
FIG. 1

Cromosoma de *S. enteritidis* que expresa la secuencia ajena



PCR-A

FIG. 2A



PCR-B

FIG. 2B

Mortalidad a los 5 días tras el desafío de pollos broiler desafiados a los 21 días de edad con 10^4 /ave de ooquistes esporulados de *E. maxima*.

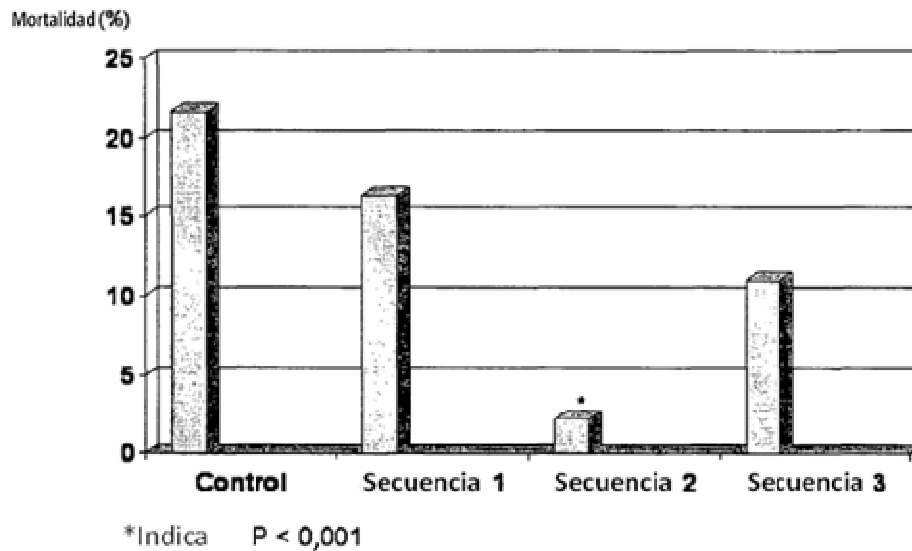


Figura 3: En este experimento, el día de la eclosión los pollos se vacunaron o no (control) con el vector de *Salmonella* que expresaba la Secuencia 1, 2, o 3 de proteína TRAP de *Eimeria maxima* descrita en el apéndice. Todos los pollos se desafiaron con exactamente la misma dosis de *Eimeria maxima* el día 21. La necropsia confirmaba que toda la mortalidad se relacionaba con la infección por *Eimeria maxima*. La mortalidad se reducía extraordinariamente y significativamente en el grupo vacunado con el vector que expresaba la Secuencia 2.