(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 758 759**

(51) Int. CI.:

A61K 39/002 (2006.01)
A61K 39/012 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2014 PCT/US2014/016359**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14127185**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2014 E 14751914 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2956165**

(54) Título: **Composiciones y métodos para potenciar las respuestas inmunitarias a eimeria o limitar la infección por eimeria**

(30) Prioridad:

14.02.2013 US 201361764681 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.05.2020

(73) Titular/es:

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS (50.0%)
2404 North University Avenue
Little Rock, AR 72207, US y
THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM (50.0%)

(72) Inventor/es:

BARTA, JOHN, R.;
BERGHMAN, LUC;
BIELKE, LISA;
HARGIS, BILLY;
SHIVARAMAIAH, SRICHAITANYA y
FAULKNER, OLIVIA, B.

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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 potenciar las respuestas inmunitarias a eimeria o limitar la infección por eimeria

Introducción

La coccidiosis, una enfermedad infecciosa de las aves de corral, los cerdos y el ganado causada por parásitos protozoarios apicomplexa *(Eimeria* spp. y parásitos relacionados) presenta problemas en todo el mundo. La coccidiosis se encuentra entre las diez principales enfermedades infecciosas de las aves de corral en términos de su impacto económico en la industria avícola, con pérdidas de producción estimadas en hasta 2 mil millones de dólares anuales. Otros parásitos apicomplexa también causan enfermedades, incluyendo *Plasmodium, Cryptosporidium* y *Toxoplasma,* que son los agentes causantes de la malaria, la criptosporidiosis y la toxoplasmosis, respectivamente.

Los signos típicos de coccidiosis incluyen pérdida rápida de apetito, reducción de peso, diarrea y mortalidad aguda. Los brotes en una parvada se producen tras la exposición a altos niveles de patógenos y, en la mayoría de los casos, la coccidiosis predispone a las aves a infecciones bacterianas secundarias. Los métodos tradicionales de control de enfermedades incluyen la administración de antibióticos y agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, con el uso continuo, esto ha llevado a problemas de resistencia. El uso de antibióticos también disminuye la aceptación social de la carne de aves de corral. La vacunación es un enfoque racional debido a su capacidad de conferir protección a largo plazo, generalmente para toda la vida de los pollos comerciales.

La mayoría de las vacunas disponibles comercialmente contra *Eimeria* se basan en dosis bajas controladas de parásitos de *Eimeria* esencialmente completamente virulentos pero sensibles a fármacos. La vacunación con las vacunas actuales basadas en *Eimeria* produce una considerable morbilidad de reacción a la vacuna y pérdidas económicas en las parvadas vacunadas. Por lo tanto, se necesita una vacuna eficaz de baja virulencia contra *Eimeria*. Una vacuna eficaz para *Eimeria* basada en dianas inmunogénicas conservados también puede resultar útil como vacuna contra otros parásitos apicomplexa. Li et al. (Veterinary Parasitology, Vol 184 (2012), páginas 154-160) divulgó un vector de vacuna de ADN (pVAX-ROM1) que codifica la proteína romboide 1 de T. gondii (TgROM1).

Sumario

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto. Las realizaciones y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas no se consideran parte de la presente invención. Esta invención se refiere a vectores de vacuna que comprenden una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido romboide de Apicomplexa opcionalmente expresado en la superficie del vector de vacuna, en donde el polipéptido Romboide consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 37, o un fragmento inmunogénico de la SEQ ID NO: 2 que comprende los aminoácidos 1-11, 18-27 o 31-43 de la SEQ ID NO: 2 y que además comprende una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido inmunoestimulador, en donde el polipéptido inmunoestimulador se expresa en la superficie del vector de vacuna, en donde el vector de vacuna produce una respuesta inmunitaria contra un parásito Apicomplexa en un sujeto, y en donde la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora. En algunos aspectos, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el vector de vacuna de la invención. En algunos aspectos, el vector de vacuna de la invención es para su uso en un método para potenciar la respuesta inmunitaria contra un parásito Apicomplexa en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto el vector de vacuna o la composición farmacéutica, y opcionalmente en donde el parásito Apicomplexa se selecciona del grupo que consiste en *Eimeria, Plasmodium, Toxoplasma, Neospora* y *Cryptosporidium.* Algunas realizaciones de la invención se exponen en las reivindicaciones 1-8 y 11-15.

También se divulga un vector de vacuna que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido romboide de Apicomplexa y se proporcionan en el presente documento, métodos de uso del mismo.

En un aspecto de la presente divulgación, se divulga un vector de vacuna que comprende un primer polinucleótido que codifica un polipéptido Romboide de Apicomplexa o un fragmento inmunogénico del mismo y una segunda secuencia polipeptídica que codifica un polipéptido inmunoestimulador. El polipéptido Romboide de Apicomplexa y el polipéptido inmunoestimulador se expresan adecuadamente en la superficie del vector de vacuna. El polipéptido Romboide de Apicomplexa puede comprender la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, un fragmento inmunogénico de al menos una de las SEQ ID NO: 1-4, 37-38 o combinaciones de las SEQ ID NO: 1-4 y 37-38. El polipéptido inmunoestimulador puede ser un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40 o un polipéptido HMGB1. Los polipéptidos CD154 incluyen menos de 50 aminoácidos y comprenden los aminoácidos 140-149 de CD154 o un homólogo del mismo.

En otro aspecto de la presente divulgación, un vector de vacuna comprende un primer polinucleótido que codifica un polipéptido Romboide de Apicomplexa de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, un fragmento inmunogénico de al menos una de las SEQ ID NO: 1-4, 37-38 o combinaciones de las SEQ ID NO: 1-4 o 37-38. El polipéptido Romboide de Apicomplexa puede expresarse en la superficie del vector de vacuna.

Los vectores de vacuna de acuerdo con la presente invención pueden ser un vector de virus, levadura, bacteria o liposoma. Las composiciones farmacéuticas pueden estar compuestas por los vectores de vacuna descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En aún otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan métodos para potenciar la respuesta inmunitaria contra un parásito Apicomplexa en un sujeto mediante la administración al sujeto de un vector de vacuna descrito en el presente documento. La respuesta inmunitaria potenciada puede ser una respuesta de anticuerpos potenciada, una respuesta de linfocitos T potenciada o una combinación de las mismas.

Aún en un aspecto adicional, se proporcionan métodos para reducir la morbilidad y mortalidad asociadas a la infección con un parásito apicomplexa en un sujeto mediante la administración de un vector de vacuna al sujeto como se describe en el presente documento. El vector de vacuna es capaz de reducir la morbilidad y mortalidad asociadas a la infección posterior con un parásito apicomplexa en sujetos a los que se administró el vector de vacuna en comparación con los controles.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática que muestra la homología de la secuencia MPP entre varios parásitos Apicomplexa. La secuencia consenso de MPP es muy similar en las secuencias de aminoácidos en los Apicomplexa. Las posiciones que no son idénticas se indican con una X en la secuencia consenso que se muestra en la línea superior de la figura y es la SEQ ID NO: 38. Las secuencias de *Toxoplasma gondii* (las primeras cuatro líneas debajo de la consenso) comparten una identidad del 100 % con la secuencia MPP de la SEQ ID NO: 2 de *Eimeria maxima.* Las dos secuencias inferiores son el homólogo de *Neospora caninum* (SEQ ID NO: 3) y de *Eimeria tenella* (SEQ ID NO: 4), respectivamente.

La Figura 2 es una representación esquemática de las construcciones del vector de vacuna descritas en los Ejemplos.

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra el peso corporal (gramos) de los pollos ocho días después de la infección con *Eimeria maxima* después de la inoculación con el vector de vacuna indicado que expresa las secuencias indicadas. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos de tratamiento se indican con letras diferentes.

La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra el peso corporal (gramos) de los pollos supervivientes 29 días después de la infección por exposición con *Eimeria maxima* después de la inoculación con el vector de vacuna indicado que expresa las secuencias indicadas. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos de tratamiento se indican con los valores reales de p y un asterisco (*).

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de mortalidad frente a una infección virulenta por exposición con *Eimeria maxima* a los ocho días después de la infección por exposición con *Eimeria maxima* después de la inoculación con el vector de vacuna indicado que expresa las secuencias indicadas. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) se indican con un asterisco (*).

Descripción detallada

Las vacunas convencionales contra la coccidiosis generalmente se basan en parásitos vivos/atenuados que se suministran en cantidades controladas. Sin embargo, el riesgo de infección no se elimina porque los parásitos son viables y capaces de producir enfermedades. Además, los costes de producción de este tipo de vacunas son extremadamente altos porque implica pasar los parásitos a través de aves vivas, recolectarlos a intervalos regulares y garantizar una cadena ininterrumpida de tránsito frío desde la producción hasta su uso en el criadero o la granja. Debido a que la vacunación es un método de control crítico, el uso de vacunas recombinantes puede mejorar la eficacia general de las vacunas basadas en coccidiosis al tiempo que disminuye los costes de producción.

Las especies de Eimeria son altamente inmunogénicas y son capaces de estimular respuestas inmunitarias fuertes del hospedador. El amplio repertorio de antígenos que forman parte de este eucariota son altamente especializados en su función y son dianas adecuadas para el desarrollo de vacunas recombinantes. Los esporozoítos y los merozoítos son las etapas más móviles del parásito y son responsables de iniciar y mantener una infección activa. La invasión de estas etapas en las células epiteliales intestinales es un proceso esencial para que el parásito continúe su ciclo de vida dentro de las células hospedadoras. Un conjunto altamente especializado de orgánulos ubicados en el extremo anterior (apical) del parásito está involucrado en el transporte de las numerosas proteínas necesarias para la translocación de estas etapas móviles desde la luz intestinal hacia la capa epitelial. Este complejo apical consiste en varios orgánulos secretores que incluyen una gran cantidad de micronemas que transportan un medio de proteínas a la superficie de los zoítos apicomplexa móviles en apoyo de la función esencial de la motilidad.

Entre varias proteínas asociadas a micronemas bien descritas, se ha utilizado la proteína adhesiva relacionada con la trombospondina (TRAP) como un antígeno recombinante exitoso en sistemas recombinantes de *Salmonella* y vectorizados con Bacillus como candidato a vacuna. Véase la Publicación de Estados Unidos N.º 2011/0111015. Muchas proteínas de micronemas tienen un modo de acción similar en el sentido de que se liberan del complejo de micronemas en el extremo anterior del esporozoíto a medida que se acercan a una célula hospedadora y actúan como un enlace entre el parásito y cualquier sustrato sobre el que se encuentren. La proteína de micronemas se transloca

entonces, a través de la superficie del parásito posteriormente, moviendo así el parásito más cerca de la célula hospedadora. Esta forma deslizante de motilidad es típica de todos los parásitos apicomplexa. Cuando la proteína de micronema se ha translocado al extremo posterior del parásito, necesita ser escindida y liberada de la superficie del parásito para completar con éxito el proceso de invasión. Esta función se realiza por una familia de proteasas que se expresan constitutivamente dentro o sobre la membrana celular del parásito. El proceso de escisión se produce intracelularmente y es un requisito absoluto para propagar la infección.

Un enfoque novedoso para el diseño de vacunas recombinantes implica dirigir esta proteasa e interferir con el proceso de escisión/invasión. La familia de proteasas que participan en el proceso de escisión se denominan proteasas romboides y están extremadamente bien descritas en especies de *Toxoplasma* con homólogos en *Eimeria* y otros Apicomplexa. Las proteasas romboides (ROM4 y ROM5, MPP) están implicadas de manera central en la escisión de las proteínas de micronemas y comparten una buena homología entre diferentes parásitos apicomplexa. Nuestra hipótesis se basó en la premisa de que si somos capaces de dirigir inmunitariamente la proteasa, la unión del anticuerpo interferiría con el proceso de escisión y, por lo tanto, perjudicaría la movilidad de esporozoíto/merozoíto. Para que se produzca una infección exitosa, el desarrollo intracelular del parásito es esencial y nuestro enfoque puede reducir la invasión celular, interfiriendo, de este modo, con el establecimiento del ciclo de vida. Una ventaja del direccionamiento a MPP es que la naturaleza conservada de esta proteína en muchas especies de apicomplexa la convierte en una diana adecuada no solo para *Eimeria,* sino también para otros Apicomplexa.

Las regiones antigénicas predichas de MPP (ROM5) se alinearon y se verificó la homología entre seis Apicomplexa diferentes (Figura 1). Las siete secuencias comparadas son las siguientes: *Eimeria tenella* ROM4 (JN558353), *Toxoplasma gondii* ME49 ROM5 (XP_002370238), *Toxoplasma gondii* ROM5 (AAT84606), *Toxoplasma gondii* ROM5 (AY587208), *Toxoplasma gondii* RH ROM5 (AM055942), *Toxoplasma gondii* (AY634626), y el inserto MPP de *Eimeria maxima* de SEQ ID NO: 2. Los parásitos Apicomplexa adecuados incluyen, pero sin limitación: especies de *Eimeria*, incluyendo, pero sin limitación, *Eimeria tenella, Eimeria maxima,* y *Eimeria brunetti; Toxoplasma gondii; Neospora caninum;* especies de *Cryptosporidium*; y especies de *Plasmodium*, incluyendo, pero sin limitación, *Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae, Plasmodium knowlesi* y *Plasmodium vivax.*

Las tecnologías de ADN recombinante permiten una manipulación relativamente fácil de muchas especies de levaduras, bacterias y virus. Algunos microorganismos son levemente patógenos o no patógenos, pero son capaces de generar una respuesta inmunitaria fuerte. Estos microorganismos producen vectores de vacunas atractivos para provocar una respuesta inmunitaria a los antígenos expresados de forma recombinante en el vector. Las vacunas vectorizadas por microorganismos pueden imitar una infección natural, ayudar a producir una inmunidad de la mucosa fuerte y duradera y pueden ser relativamente baratas de producir y administrar. Además, tales vectores a menudo pueden transportar más de un antígeno y tienen el potencial de proporcionar protección contra múltiples agentes infecciosos.

En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un vector de vacuna comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido Romboide de Apicomplexa de SEQ ID NO: 1-4, 37-38, un fragmento inmunogénico del mismo o combinaciones de los mismos. En otra realización, el vector de vacuna puede incluir un primer polinucleótido que codifica un polipéptido Romboide de Apicomplexa y se proporciona un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimulador. El polipéptido Romboide y el polipéptido inmunoestimulador opcional se expresan en la superficie del vector de vacuna. En algunas divulgaciones, el polipéptido Romboide puede comprender la proteína de longitud completa (SEQ ID NO: 39) o un fragmento inmunogénico tal como los proporcionados en las SEQ ID NO: 1-4 y 37-38. Por ejemplo, el polipéptido Romboide puede comprender, puede consistir esencialmente de o puede consistir en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 o un fragmento inmunogénico de cualquiera de estas SEQ ID NO. Las combinaciones de estos fragmentos también pueden usarse en un vector de vacuna. Un vector de vacuna puede incluir las SEQ ID NO: 1-4 o 37-38. Un solo vector de vacuna puede incluir también múltiples copias de un solo fragmento.

El fragmento inmunogénico de un polipéptido Romboide puede ser una secuencia que tiene al menos 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18 o 20 aminoácidos de largo y tiene al menos un 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con los fragmentos de las SEQ ID NO: 1-4 o 37-38 proporcionados en el presente documento. Sin quedar ligado a teoría alguna, se cree que los vectores de vacuna proporcionados en el presente documento reducen la morbilidad y la mortalidad asociadas a la infección por *Eimeria* al inducir una respuesta de anticuerpos que es capaz de bloquear la invasión de los parásitos en las células. Los expertos en la materia son conscientes de que los epítopos de linfocitos B a menudo son de naturaleza hidrófila y esta información se puede usar para generar fragmentos inmunogénicos para los polipéptidos de las SEQ ID Nº: 1-4 y 37-38 proporcionados en el presente documento. Un gráfico de hidrofilicidad de la SEQ ID NO: 2 revela tres áreas hidrófilas del péptido y tres posibles epítopos de linfocitos B que incluyen los aminoácidos 1-11, 18-27 y 31-43 de la SEQ ID NO: 2. Estos fragmentos de aminoácidos corresponden a los aminoácidos 7-16 de la SEQ ID NO: 3 y 37 a los aminoácidos 12-21 de SEQ ID NO: 4. Como se muestra en las dos secuencias consenso de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 38, los aminoácidos correspondientes a 18-27 de la SEQ ID NO: 2 están altamente conservados entre especies y géneros de parásitos Apicomplexa. Una respuesta inmunitaria a dicho epítopo tan altamente conservado puede permitir la inmunidad cruzada de especies o incluso cruzada de géneros de una sola vacuna.

Una vacuna incluye cualquier composición que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido antigénico que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria al polipéptido. Un vector de vacuna es una composición que se puede modificar por ingeniería para transportar antígenos o polipéptidos inmunoestimuladores y también puede comprender un adyuvante o administrarse con un adyuvante para aumentar aún más la respuesta inmunitaria al parásito y proporcionar una mejor protección contra la morbilidad y la mortalidad asociadas a una infección posterior. El uso de vectores, tales como vectores bacterianos, se divulga para la vacunación y la generación de respuestas inmunitarias contra *Eimeria* u otros parásitos apicomplexa tales como *Plasmodium* (el agente causante de la malaria),*Toxoplasma* y *Cryptosporidium*. Las respuestas inmunitarias después de la administración del vector de la vacuna no necesitan ser completamente protectoras, pero pueden disminuir la morbilidad o el porcentaje de mortalidad (es decir, la probabilidad de mortalidad) asociada a la infección posterior.

Los polinucleótidos que codifican antígenos de polipéptidos Romboides de SEQ ID NO: 1-4, 37-38 o fragmentos de los mismos y otros antígenos de cualquier cantidad de organismos patógenos pueden insertarse en el vector y expresarse en el vector. La expresión de estos polinucleótidos por el vector permitirá la generación de polipéptidos antigénicos después de la inmunización del sujeto. Los polinucleótidos pueden insertarse en el cromosoma del vector o codificarse en plásmidos u otro ADN extracromosómico. Los expertos en la materia apreciarán que existen diversas metodologías para obtener la expresión de polinucleótidos en vectores como *Salmonella* o *Bacillus.* Los polinucleótidos pueden conectarse operativamente a un promotor (por ejemplo, un promotor constitutivo, un promotor inducible, etc.) por métodos conocidos por los expertos en la materia. De manera adecuada, los polinucleótidos que codifican los antígenos Romboides se insertan en un vector, por ejemplo, un vector bacteriano, de modo que se expresa el polinucleótido.

Los polinucleótidos que codifican los antígenos Romboides pueden insertarse en marco en un polinucleótido que codifica una proteína transmembrana. El polinucleótido que codifica el antígeno Romboide se inserta en la secuencia de polinucleótidos del vector para permitir la expresión del antígeno Romboide en la superficie del vector. Por ejemplo, el polinucleótido que codifica el antígeno Romboide puede insertarse en marco en el polinucleótido del vector en una región que codifica una región de bucle externo de una proteína transmembrana de modo que la secuencia del polinucleótido del vector permanezca en marco. En una realización de la presente divulgación, el primer polinucleótido que codifica el polipéptido Romboide puede insertarse en el bucle 9 del gen *lamB* de *Salmonella*.

En otra realización de la presente divulgación, el primer polinucleótido se inserta dentro de o en un extremo expuesto a la superficie de una proteína que está unida a la pared celular, pero no es una proteína transmembrana. La proteína puede ser una proteína secretada que está anclada o fijada a la pared celular a través de un anclaje proteico o lipídico. En los Ejemplos, el polipéptido MPP (SEQ ID NO: 2) se inserta en el extremo 3' de la proteína de unión a fibronectina (FbpB) de *Bacillus subtilis.* Como alternativa, el primer polinucleótido que codifica el antígeno Romboide puede insertarse en un polinucleótido que codifica un polipéptido secretado.

Los expertos en la materia apreciarán que el polinucleótido que codifica el antígeno Romboide podría insertarse en una amplia variedad de polinucleótidos del vector para proporcionar la expresión y presentación del antígeno Romboide a las células inmunitarias de un sujeto tratado con la vacuna. El polinucleótido que codifica el antígeno Romboide se puede incluir en una sola copia o en más de una copia. Las copias múltiples pueden insertarse en una única ubicación o en más de una ubicación. Como alternativa, se pueden insertar múltiples epítopos tales como combinaciones de los antígenos Romboides proporcionados en el presente documento como la SEQ ID NO: 1-4 y 37-38 o combinaciones de este epítopo con otros epítopos de apicomplexa tal como TRAP o epítopos de otros patógenos en el vector en la misma o en más de una ubicación.

Adecuadamente, el primer polinucleótido codifica una porción del polipéptido Romboide, el polipéptido Romboide completo o más de un epítopo del polipéptido Romboide. Se contempla específicamente la combinación de epítopos de más de un polipéptido de un único parásito o patógeno o la combinación de epítopos de patógenos relacionados. El polinucleótido puede insertarse en el vector y puede insertarse como una proteína de fusión que contiene más de un único epítopo. En los Ejemplos, las SEQ ID NO: 2 y 15 (MPP-HMGB1) o las SEQ ID NO: 2, 40 y 15 (MPP-TRAP-HMGB1) se incorporaron en un vector de *Bacillus*. De manera adecuada, la porción del polipéptido Romboide insertado en el vector es un fragmento antigénico. Un fragmento antigénico es un péptido o polipéptido capaz de provocar una respuesta inmunitaria celular o humoral o capaz de reducir la morbilidad o mortalidad asociada a la infección posterior con el parásito.

Un polipéptido antigénico o epítopo incluye cualquier polipéptido que sea inmunogénico. Los polipéptidos antigénicos incluyen, pero sin limitación, antígenos que están relacionados con patógenos, relacionados con alérgenos, relacionados con tumores o relacionados con enfermedades. Los patógenos incluyen patógenos virales, parasitarios, fúngicos y bacterianos, así como patógenos proteicos tal como los priones. Los polipéptidos antigénicos pueden ser proteínas de longitud completa o porciones de las mismas. Está bien establecido que el reconocimiento por el sistema inmunitario de muchas proteínas se basa en un número relativamente pequeño de aminoácidos, a menudo denominado epítopo. Los epítopos pueden tener solo 4-8 aminoácidos de longitud. Por lo tanto, los polipéptidos antigénicos descritos en el presente documento pueden ser proteínas de longitud completa, epítopos de cuatro aminoácidos de longitud o cualquier porción entre estos extremos. De hecho, el polipéptido antigénico puede incluir

más de un epítopo de un solo patógeno o proteína. Los polipéptidos antigénicos puede tener al menos un 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con las SEQ ID NO proporcionadas en el presente documento. De manera adecuada, un fragmento antigénico del antígeno o polipéptido Romboide puede ser cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10 o más aminoácidos, 15 o más aminoácidos o 20 o más aminoácidos de la secuencia de la proteína de longitud completa.

Se pueden incluir múltiples copias del mismo epítopo o múltiples epítopos de las mismas o diferentes proteínas en el vector de vacuna. Los epítopos en el vector de vacuna pueden estar relacionados y ser homólogos para permitir el direccionamiento de múltiples patógenos relacionados con un solo vector de vacuna. Se prevé que varios epítopos o antígenos de los mismos o diferentes patógenos o enfermedades se puedan administrar en combinación en un solo vector de vacuna para generar una respuesta inmunitaria mejorada contra múltiples antígenos. Los vectores de vacuna recombinantes pueden codificar antígenos de múltiples microorganismos patógenos, virus o antígenos asociados a tumores. La administración de vectores de vacunas capaces de expresar múltiples antígenos tiene la ventaja de inducir inmunidad contra dos o más enfermedades al mismo tiempo, proporcionando una protección más amplia contra múltiples cepas de un único patógeno o una respuesta inmunitaria más fuerte contra un único patógeno.

En los ejemplos, el antígeno MPP (SEQ ID NO: 2) se coexpresó en varios de los vectores con un segundo polipéptido antigénico. Se demostró que un antígeno en fase asexual de alta masa molecular de *Eimeria maxima* (EmTFP250) era una diana para los anticuerpos maternos producidos por las gallinas reproductoras infectadas con este parásito protozoario. El análisis de la secuencia de aminoácidos del antígeno reveló un miembro nuevo 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. Véase en la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2011/0111015. EmTFP250 o TRAP también contiene dos regiones hidrófilas de bajo complejo ricas en ácido glutámico y restos de glicina, y un dominio transmembrana/cola citosólica asociada a la motilidad deslizante del parásito que está altamente conservado dentro de las proteínas de micronemas de apicomplexa. Se seleccionaron varios epítopos potenciales y se identifican en las SEQ ID NO: 1-3 y 11 de la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2011/0111015 que se reproducen en el presente documento como las SEQ ID NO: 5-8. La SEQ ID NO: 40 se usó en los Ejemplos proporcionados en el presente documento y también se denomina antígeno TRAP. La SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 6 varían mediante un único aminoácido. Una prolina en la posición 6 de la SEQ ID NO: 6 se cambia a una arginina en la misma posición 6 de la SEQ ID NO: 40. Este cambio se realizó para hacer que el epítopo sea más flexible e hidrófilo con el objetivo de convertirlo en un mejor antígeno. Los expertos en la materia pueden hacer otros cambios de aminoácidos únicos para mejorar la antigenicidad dentro del alcance de la presente divulgación. Debido a la naturaleza conservada de este antígeno, la expresión de estos epítopos por un vector puede inducir inmunidad protectora contra múltiples parásitos apicomplexa y la administración de un vector de vacuna que comprende dos polipéptidos antigénicos distintos puede inducir una respuesta inmunitaria más fuerte.

Los expertos en la materia apreciarán que los polipéptidos antigénicos de otros patógenos pueden usarse en los vectores de vacuna para potenciar la respuesta inmunitaria contra más de un patógeno por una única vacuna. Sería ventajoso administrar una única vacuna dirigida contra múltiples patógenos. Se prevé una vacuna capaz de provocar una respuesta inmunitaria a un parásito Apicomplexa, tal como *Eimeria*, en combinación con Gripe, Salmonella, Campylobacter u otros patógenos.

Por ejemplo, el segundo polipéptido antigénico puede ser un polipéptido de Gripe, adecuadamente es un polipéptido de Gripe H5N1 o un polipéptido asociada a múltiples cepas del virus de la Gripe, tal como un polipéptido de la proteína de Gripe M2. El ectodominio de la proteína M2 del virus de la Gripe A, conocido como M2e, sobresale de la superficie del virus. La porción M2e de la proteína M2 contiene aproximadamente 24 aminoácidos. El polipéptido M2e varía poco de uno aislado a otro dentro de la Gripe. De hecho, desde la epidemia de gripe de 1918, solo se han aislado algunas mutaciones de origen natural en M2e de humanos infectados. Además, los virus de la gripe aislados de los hospedadores aviares y porcinos tienen diferentes, aún conservadas, secuencias M2e. Para revisiones de las secuencias de polipéptidos M2e aisladas de hospedadores humanos, aviares y porcinos, véase Liu et al., Microbes and Infection 7:171-177 (2005) and Reid et al., J. Virol. 76:10717-10723 (2002). Adecuadamente, el polipéptido M2e completo puede insertarse en el vector de vacuna o puede usarse solamente una porción. Se incorporó un polipéptido de ocho aminoácidos (LM2 que tiene la secuencia de aminoácidos: EVETPIRN, SEQ ID NO: 9 o su variante M2eA que tiene la secuencia de aminoácidos EVETPTRN, SEQ ID NO: 10) en un vector de vacuna y se demostró que produce una respuesta de anticuerpos después de la administración a los pollos. Véase la Publicación de Estados Unidos N.º 2011/0027309.

Otros epítopos adecuados para su inclusión en un vector de vacuna de la Gripe A incluyen, pero sin limitación, polipéptidos de la hemaglutinina (HA) o la proteína nuclear (NP) de Gripe A. Por ejemplo, pueden incluirse los péptidos de la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 en un vector de vacuna. Un experto en la materia apreciará que cualquiera de estas secuencias puede usarse en combinación con cualquier otro epítopo, incluidos los epítopos derivados de otros patógenos o antígenos.

Las moléculas inmunoestimuladoras incluidas como parte del vector de vacuna podrían activar potencialmente partes del sistema inmunitario críticas para una protección duradera o proporcionar un efecto adyuvante. Los polipéptidos inmunoestimuladores pueden ser polipéptidos capaces de estimular una respuesta inmunitaria sin tratamiento o

adaptativa. Los polipéptidos inmunoestimuladores no están asociados de forma natural con el vector de vacuna y son polipéptidos asociados de forma natural con un sistema inmunitario de vertebrados, tal como el del sujeto al que se administrará la vacuna. En el presente documento se describen dos polipéptidos inmunoestimuladores, a saber, los polipéptidos CD154 y Caja 1 del Grupo de Alta Movilidad (HMGB1), pero un experto en la materia apreciará que podrían usarse otros polipéptidos inmunoestimuladores o podrían usarse alternativamente en combinación con los descritos en el presente documento.

Los polinucleótidos adicionales que codifican polipéptidos implicados en desencadenar sistema inmunitario también pueden incluirse en un vector de vacuna. Los polinucleótidos pueden codificar moléculas del sistema inmunitario conocidas por sus efectos estimuladores, tal como una interleucina, Factor de Necrosis Tumoral, interferón, complemento u otro polinucleótido implicado en la regulación inmunitaria. La vacuna también puede incluir polinucleótidos que codifican péptidos que se sabe que estimulan una respuesta inmunitaria, tal como los polipéptidos CD154 o HMGB1 descritos en el presente documento.

El HMGB1 es secretado por los macrófagos activados y las células dañadas, y actúa como un mediador de citoquinas de la inflamación, afectando la respuesta inmunitaria innata. Se han incluido partes de la secuencia HMGB1 en los vectores de vacuna descritos en los Ejemplos. La proteína HMGB1 (Caja 1 del Grupo de Alta Movilidad) se identificó por primera vez como una proteína de unión a ADN crítica para la estructura y estabilidad del ADN. Es una proteína nuclear expresada de manera ubicua que se une al ADN sin especificidad de secuencia. La proteína está altamente conservada y se encuentra desde plantas hasta mamíferos. Las secuencias de aminoácidos de HMGB1 de pez cebra, pollo y humana se proporcionan en las SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 22, respectivamente. La secuencia en todos los mamíferos está altamente conservada con una identidad de aminoácidos del 98 % y los cambios de aminoácidos son conservativos. Por lo tanto, una proteína HMGB1 de una especie es probable que pueda sustituir a la de otra especie funcionalmente. La proteína HMGB1 de longitud completa o una porción de la misma puede usarse como el polipéptido HMGB1 en los vectores de vacuna descritos en el presente documento. HMGB1 tiene dos regiones de unión a ADN denominadas caja A como se muestra en la SEQ ID NO: 16 y 17 y caja B como se muestra en la SEQ ID NO: 18 y 19. Véase Andersson y Tracey, Annu. Rev. Immunol. 2011, 29:13-162.

HMGB1 es un mediador de la inflamación y sirve como señal de daño nuclear, como el de las células necróticas. El HMGB1 también puede ser secretado activamente por las células del linaje de monocitos/macrófagos en un proceso que requiere acetilación de la proteína, translocación a través del núcleo y secreción. El HMGB1 extracelular actúa como un potente mediador de la inflamación mediante la señalización a través del Receptor para Productos Finales de Glicación Avanzada (RAGE) y a través de miembros de la familia de receptores tipo Toll (TLR), en particular TLR4. La actividad de unión a RAGE ha sido identificada y requiere el polipéptido de la SEQ ID NO: 20. La unión a TLR4 requiere la cisteína en la posición 106 de la SEQ ID NO: 15, que se encuentra en la región de la caja B de HMGB1.

Las actividades inflamatorias de HMGB1 no requieren la proteína de longitud completa y se han identificado fragmentos funcionales. Se ha demostrado que la caja B es suficiente para mediar los efectos proinflamatorios de HMGB1 y, por lo tanto, las SEQ ID NO: 18 y 19 son polipéptidos HMGB1 o fragmentos funcionales de los mismos dentro del contexto de la presente invención. Además, el sitio de unión a RAGE y la actividad de citocinas proinflamatorias se han mapeado con la SEQ ID NO: 20 y la SEC ID NO: 21, respectivamente. Por lo tanto, estos polipéptidos son fragmentos funcionales de polipéptidos HMGB1 en el contexto de la presente invención.

Los expertos en la materia son capaces de identificar polipéptidos HMGB1 y fragmentos de los mismos capaces de estimular la actividad de citocinas proinflamatorias, utilizando métodos tales como los de la Publicación internacional N.º WO02/092004. El polipéptido HMGB1 incluye el dominio de unión a RAGE en los aminoácidos 150-183 de la SEQ ID NO: 15 (SEQ ID NO: 20 o un homólogo del mismo) y el dominio de actividad de citocinas proinflamatorias entre los aminoácidos 89-109 de la SEQ ID NO: 15 (SEQ ID NO: 21 o un homólogo del mismo). En particular, los polipéptidos HMGB1 y los fragmentos funcionales u homólogos de los mismos incluyen polipéptidos idénticos, o al menos un 99 % idénticos, al menos un 98 % idénticos, al menos un 97 % idénticos, al menos un 96 % idénticos, al menos un 95 % idénticos, al menos un 90 % idénticos, al menos un 85 % o al menos un 80 % idénticos a los polipéptidos HMGB1 de las SEQ ID NO: 15 o 16-23.

Como se describe con mayor detalle a continuación, un vector de vacuna puede incluir un polipéptido CD154 que es capaz de unirse a CD40 en el sujeto y estimular al sujeto para que responda al vector y a su antígeno asociado. La participación de las células dendríticas (CD) es esencial para el inicio de una respuesta inmunitaria poderosa, ya que poseen la capacidad única de activar los linfocitos T no tratados previamente, provocando la expansión y diferenciación de los linfocitos T en células efectoras. Es el papel de la CD, que es una célula presentadora de antígenos (APC) que se encuentra en prácticamente todos los tejidos del cuerpo, para capturar antígenos, transportarlos al tejido linfoide asociado y después presentarlos a los linfocitos T no tratados previamente. Tras la activación por CD, los linfocitos T se expanden, se diferencian en células efectoras, abandonan los órganos inmunitarios secundarios y entran en los tejidos periféricos. Los linfocitos T citotóxicos activados (CTL) pueden destruir células infectadas por virus, células tumorales o incluso APC infectadas con parásitos intracelulares (por ejemplo, *Salmonella)* y se ha demostrado que son críticos en la protección contra la infección vírica. CD40 es un miembro de la familia de moléculas del receptor de TNF y se expresa en varios tipos de células, incluidas las células presentadoras de antígeno (APC) profesionales, tales como las CD y los linfocitos B. La interacción de CD40 con su ligando CD154 es extremadamente importante y

estimulante para la inmunidad humoral y celular. La estimulación de CD a través de CD40, expresada en la superficie de las CD, puede estimularse mediante anticuerpos anti-CD40. En el cuerpo, sin embargo, esto se produce por interacción con el ligando natural para CD40 (es decir, CD154) expresado en la superficie de los linfocitos T activados. De forma interesante, se han identificado las regiones de unión a CD40 de CD154. La región de unión a CD40 de CD154 puede expresarse en la superficie de un vector, tal como un vector de *Salmonella* o *Bacillus*, y da como resultado una respuesta inmunitaria potenciada contra una secuencia peptídica presentada conjuntamente como se muestra en los Ejemplos proporcionados en el presente documento y en la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 2011/0027309. Un polipéptido CD154 puede ser una porción de la proteína de longitud completa CD154 o la proteína CD154 completa. De manera adecuada, el polipéptido CD154 es capaz de unirse a CD40.

Como se analiza anteriormente, puede incluirse en la vacuna un polinucleótido CD154 que codifica un polipéptido CD154 que es capaz de potenciar la respuesta inmunitaria al antígeno. De manera adecuada, el polipéptido CD154 tiene menos de 50 aminoácidos de longitud, más adecuadamente menos de 40, menos de 30 o menos de 20 aminoácidos de longitud. El polipéptido puede tener entre 10 y 15 aminoácidos, entre 10 y 20 aminoácidos o entre 10 y 25 aminoácidos de longitud. La secuencia CD154 y la región de unión a CD40 no están altamente conservadas entre las diversas especies. Las secuencias CD154 de pollo y humano se proporcionan en la SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25, respectivamente.

Las regiones de unión a CD40 de CD154 se han determinado para una serie de especies, incluyendo seres humanos, pollos, patos, ratones y vacas, y se muestran en la SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30, respectivamente. Aunque existe una variabilidad en las secuencias en la región de unión a CD40 entre especies, el polipéptido CD154 humano fue capaz de potenciar la respuesta inmunitaria en pollos. Por lo tanto, se puede practicar la invención usando polipéptidos CD154 específicos de especie o un polipéptido CD154 heterólogo. Por lo tanto, pueden incluirse en un vector de vacuna los polipéptidos CD154 de SEQ ID NO: 24-30 o puede incluirse en un vector de vacuna un polipéptido al menos un 99, 98, 97, 96, 95, 93, 90 u 85 % idéntico a las secuencias de la SEQ ID NO: 24 -30 a.

El polipéptido a partir de CD154 estimula una respuesta inmunitaria al menos en parte al unirse a su receptor, CD40. Un polipéptido homólogo al polipéptido CD154 que se expresa en células inmunitarias del sujeto y que es capaz de unirse al receptor CD40 en macrófagos y otras células presentadoras de antígeno. La unión de este complejo ligando-receptor estimula los macrófagos (y las células del linaje de los macrófagos, tal como las células dendríticas) para potenciar la fagocitosis y la presentación de antígenos al tiempo que aumenta las secreciones de citocinas que se sabe que activan otras células inmunitarias locales (tales como los linfocitos B). Por tanto, las moléculas asociadas al péptido CD154 se dirigen preferentemente a la respuesta inmunitaria y la producción expandida de anticuerpos.

Los polipéptidos antigénicos y los polipéptidos inmunoestimuladores se suministran a través de un vector de vacuna. Los vectores de vacuna pueden ser vectores bacterianos, de levadura, víricos o basados en liposomas. Posibles vectores de vacuna incluyen, pero sin limitación, *Bacillus* (*Bacillus subtilis), Salmonella (Salmonella enteritidis), Shigella, Escherichia (E. coli), Yersinia, Bordetella, Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Vibrio (Vibrio cholerae), Listeria,* levaduras tales como *Saccharomyces,* o *Pichia,* adenovirus, poxvirus, herpesvirus, alfavirus y virus adenoasociados. Los vectores de vacunas de bacterias, levaduras o virus vivos aún pueden presentar riesgos para los individuos inmunocomprometidos y requieren un control regulatorio adicional. Por lo tanto, es deseable el uso de vectores que están destruidos o inactivados o que califican como Organismos Generalmente Reconocidos Como Seguros (GRAS) por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA). El problema es generar una respuesta inmunitaria fuerte usando tales vectores. Los expertos en la materia conocen métodos para inactivar o destruir vectores de vacunas bacterianas, de levadura o víricos e incluyen, pero sin limitación, métodos tales como inactivación con formalina, inactivación basada en antibióticos, tratamiento térmico y tratamiento con etanol. Al incluir un polipéptido inmunoestimulador como el polipéptido HMGB1 (caja 1 del grupo de alta movilidad) en la superficie del vector de vacuna, se puede generar una respuesta inmunitaria fuerte contra un parásito apicomplexa utilizando un vector de *Bacillus* spp. De hecho, los Ejemplos demuestran que este vector se puede inactivar de tal manera que no se puede replicar y aún genera una respuesta inmunitaria fuerte después de la administración. Los vectores de vacuna pueden ser bacterias, levaduras o virus de tipo silvestre que no son patógenos. De manera alternativa, los vectores pueden atenuarse de modo que el vector tenga una capacidad limitada para replicarse en el hospedador o no sea capaz de crecer sin medios suplementados durante más de unas pocas generaciones. Los expertos en la materia apreciarán que hay varios formas de atenuar los vectores y los medios para hacerlo.

Al menos una porción del polipéptido antigénico y al menos una porción del polipéptido inmunoestimulador están presentes o se expresan en la superficie del vector de vacuna. Presente en la superficie del vector de vacuna incluye polipéptidos que están comprendidos dentro de un bucle externo de una proteína transmembrana, que interactúa con, por ejemplo, enlaces entrecruzados covalente o químicamente con, una proteína transmembrana, un lípido de membrana o un carbohidrato o polipéptido anclado en membrana. Un polipéptido puede estar comprendido dentro de una proteína transmembrana teniendo los aminoácidos que comprenden el polipéptido unidos mediante un enlace peptídico al extremo N, el extremo C o en cualquier lugar dentro de la proteína transmembrana (es decir, insertado entre dos aminoácidos de la proteína transmembrana o en lugar de uno o más aminoácidos de la proteína transmembrana (es decir, supresión-inserción). De manera adecuada, los polipéptidos pueden insertarse en un bucle externo de una proteína transmembrana. Las proteínas transmembrana adecuadas son *srtA, cotB* y *lamB,* pero los

expertos en la materia apreciarán que hay muchas proteínas transmembrana adecuadas disponibles. Los polipéptidos se pueden unir a una proteína o lípido anclado a la membrana o a la pared celular de manera que el polipéptido antigénico y el polipéptido inmunoestimulador se expresen en la superficie del vector de vacuna.

Tal como se describe anteriormente, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos antigénicos o inmunoestimuladores pueden insertarse en el cromosoma del vector o mantenerse extracromosómicamente (por ejemplo, en un plásmido, BAC o YAC). Los expertos en la materia apreciarán que estos polinucleótidos pueden insertarse en marco en varios polinucleótidos y expresarse en diferentes partes del vector o pueden secretarse. El polinucleótido que codifica el polipéptido inmunoestimulador capaz de potenciar la respuesta inmunitaria al polipéptido antigénico también puede codificar el polipéptido antigénico. El polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico puede estar unido al polinucleótido que codifica el polipéptido inmunoestimulador, de modo que en el vector, los dos polipéptidos son porciones del mismo polipéptido, tal como en una proteína de fusión. En los Ejemplos, un polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico también codifica el polipéptido inmunoestimulador. En una realización, los dos polinucleótidos que codifican los polipéptidos se insertan ambos en marco en el bucle 9 del gen *lamB* de *Salmonella enteritidis* u otro vector de vacuna. Los expertos en la materia apreciarán que también se pueden usar polinucleótidos bacterianos que codifican otras proteínas transmembrana y otros bucles del gen *lamB*.

Como alternativa, el polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico y/o el polipéptido inmunoestimulador puede insertarse en un polipéptido secretado que se muestra o presenta en la superficie del vector de vacuna mediante asociación con una proteína, lípido o carbohidrato en la superficie del vector de vacuna. Los expertos en la materia apreciarán que el polinucleótido que codifica el polipéptido antigénico y/o el polipéptido inmunoestimulador podría insertarse en una amplia variedad de polinucleótidos de vector de vacuna para proporcionar expresión y presentación del polipéptido antigénico y/o el polipéptido inmunoestimulador a las células inmunitarias de un sujeto tratado con el vector de vacuna por expresión en la superficie del vector de vacuna. La región codificante del polipéptido Romboide de Apicomplexa y el polipéptido inmunoestimulador se puede fusionar con el extremo C de la proteína de unión a fibronectina de *Staphylococcus aureus* que contiene un motivo de clasificación para la separación de sortasa por *Listeria.* Esto permite que las proteínas secretadas se anclen en la pared celular de bacterias grampositivas tales como *Bacillus.* Véase Nguyen y Schumann, J Biotechnol (2006) 122: 473-482. Este sistema se usó en los Ejemplos para permitir la expresión del polipéptido Romboide unido a HMGB1 en la superficie de Bacillus. También se pueden usar otros métodos similares.

Como alternativa, los polipéptidos pueden estar unidos covalente o químicamente a proteínas, lípidos o carbohidratos en la membrana, la pared celular o la cápside si se usa un vector vírico a través de métodos disponibles para personas expertas en la materia. Por ejemplo, podrían usarse enlaces disulfuro o reticulación de biotina-avidina para presentar los polipéptidos antigénicos e inmunoestimuladores en la superficie de un vector de vacuna. De manera adecuada, los polipéptidos antigénicos y los polipéptidos inmunoestimuladores son parte de una proteína de fusión. Los dos polipéptidos pueden estar unidos directamente a través de un enlace peptídico o pueden estar separados por un enlazador, espaciador o una sección de una tercera proteína en la que se insertan en marco. En los Ejemplos, se usó un espaciador de aminoácidos entre los polipéptidos. El espaciador puede tener entre 2 y 20 aminoácidos, adecuadamente entre 4 y 10 aminoácidos, adecuadamente entre 6 y 8 aminoácidos. Adecuadamente, los aminoácidos en el espaciador tienen una pequeña cadena lateral y no están cargados, como la glicina, la alanina o la serina. En los Ejemplos, se usó un espaciador que incluye dos restos de glicina, dos restos de serina y arginina y dos restos más de serina. Los expertos en la materia apreciarán que podrían usarse otros espaciadores.

En los Ejemplos, los vectores de vacuna tienen los polipéptidos antigénicos (polipéptidos MPP y/o TRAP) y el polipéptido inmunoestimulador (ya sea CD154 o HMGB1 o ambos) codificados en el mismo polinucleótido y en marco entre sí. En realizaciones alternativas, el polipéptido inmunoestimulador y el polipéptido antigénico pueden estar codificados por polinucleótidos distintos. Los expertos en la materia apreciarán que se pueden usar varios métodos para obtener la expresión del polipéptido antigénico y del polipéptido HMGB1 en la superficie del vector de vacuna. Dichos métodos son conocidos por los expertos en la materia.

También se proporcionan composiciones que comprenden el vector de vacuna y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es cualquier vehículo adecuado para la administración *in vivo*. De manera adecuada, el vehículo farmacéuticamente aceptable es aceptable para suministro oral, nasal o a la mucosa. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir agua, soluciones tamponadas, soluciones de glucosa o fluidos de cultivo bacteriano. Componentes adicionales de las composiciones pueden incluir adecuadamente excipientes tales como estabilizantes, conservantes, diluyentes, emulsionantes y lubricantes. Ejemplos de 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 se añaden tales estabilizantes a las composiciones, la composición es adecuada para liofilización o secado por pulverización. El vector de vacuna en las composiciones puede no ser capaz de replicarse, el vector de vacuna se inactiva o destruye adecuadamente antes de la adición a la composición.

También se proporcionan métodos para potenciar las respuestas inmunitarias en un sujeto mediante la administración de un vector de vacuna. El vector de vacuna puede contener un primer polinucleótido que codifica un polipéptido

Romboide de Apicomplexa y se proporciona un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimulador. El polipéptido inmunoestimulador es adecuadamente un polipéptido asociado de forma natural con un sistema inmunitario de vertebrados e implicado en la estimulación de una respuesta inmunitaria. El polipéptido inmunoestimulador puede estimular la respuesta inmunitaria natural o adaptativa del sujeto. Adecuadamente, un polipéptido HMGB1 o un polipéptido CD154 como se describe más completamente anteriormente puede usarse como el polipéptido inmunoestimulador. En los métodos proporcionados en el presente documento, el vector de vacuna que comprende un polipéptido Romboide de Apicomplexa y un polipéptido inmunoestimulador se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para potenciar o efectuar una respuesta inmunitaria del sujeto al vector de vacuna y en particular al polipéptido Romboide antigénico y adecuadamente al parásito apicomplexa. La respuesta inmunitaria potenciada puede incluir el anticuerpo o la respuesta de linfocitos T. De manera adecuada la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora, aunque la respuesta inmunitaria puede no ser totalmente protectora, pero puede ser capaz de reducir la morbilidad o mortalidad asociada a la infección. Los polipéptidos inmunoestimuladores pueden usarse para potenciar la respuesta inmunitaria en el sujeto a cualquier antígeno extraño o polipéptido antigénico presente en el vector de vacuna además del polipéptido Romboide. Un experto en la materia apreciará que el polipéptido inmunoestimulador podría usarse para potenciar la respuesta inmunitaria a más de un polipéptido antigénico presente en un vector de vacuna. Potenciar una respuesta inmunitaria incluye, pero sin limitación, inducir un efecto terapéutico o profiláctico que está mediado por el sistema inmunitario del sujeto. Específicamente, potenciar una respuesta inmunitaria puede incluir, pero sin limitación, potenciar la producción de anticuerpos, potenciar el cambio de clase de las cadenas pesadas de los anticuerpos, maduración de las células presentadoras de antígeno, estimulación de linfocitos T auxiliares, estimulación de linfocitos T citolíticos o inducción de linfocitos T o B de memoria.

De manera adecuada, el vector de vacuna contiene un polinucleótido que codifica un polipéptido que incluye los aminoácidos 150-183 y 89-109 del polipéptido HMGB1 (SEQ ID NO: 15) o un homólogo del mismo. En los Ejemplos, se usó un polipéptido de 190 aminoácidos de HMGB1. De manera adecuada, el polinucleótido codifica un polipéptido HMGB1 de la misma especie que el sujeto. Las combinaciones heterólogas de polipéptidos HMGB1 y sujetos (por ejemplo, un polipéptido HMGB1 humano para usar en una vacuna de pollo) pueden ser útiles en la aplicación de la invención porque HMGB1 está altamente conservado a través de un amplio número de especies. El polipéptido HMGB1 puede usarse para potenciar la respuesta inmunitaria a más de un polipéptido antigénico presente en un vector de vacuna. El polipéptido de HMGB1 estimula una respuesta inmunitaria, al menos en parte, activando células dendríticas y macrófagos y estimulando así la producción de citocinas tales como IL-1, IL-6, IFN-γ y TNF -α. En los Ejemplos, un polipéptido de HMGB1 se expresa en la superficie del vector de vacuna.

El vector de vacuna puede contener adecuadamente un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40 y activar 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 efectiva para potenciar o afectar la respuesta inmunitaria del sujeto a la vacuna. De manera adecuada, la vacuna contiene un polinucleótido que codifica un polipéptido que incluye los aminoácidos 140-149 del polipéptido humano CD154 (SEQ ID NO: 25) o un homólogo del mismo. Como se ha señalado anteriormente, puede usarse un homólogo del aminoácido 140-149 derivado de una especie para estimular una respuesta inmunitaria en una especie distinta. De manera adecuada, el polinucleótido codifica un polipéptido CD154 de la misma especie que el sujeto. De manera adecuada, un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO: 26 se usa en sujetos humanos, un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 27 se usa en pollos, un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 28 se usa en patos, un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 29 se usa en ratones y un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 30 se usa en vacas. El polipéptido CD154 humano (SEQ ID NO: 26) se ha utilizado en una vacuna de pollos y se demostró que potencia la respuesta inmunitaria a un antígeno extraño. Así, otras combinaciones heterólogas de polipéptidos CD154 y sujetos pueden ser útiles en la aplicación de la invención.

Además, se divulgan métodos para potenciar la respuesta inmunitaria contra un parásito apicomplexa y métodos para reducir la morbilidad asociada a la infección posterior con un parásito apicomplexa. En resumen, los métodos comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un vector de vacuna que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido Romboide de Apicomplexa. El vector de vacuna también puede incluir un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimulador en una cantidad eficaz. Los polipéptidos Romboides pueden incluir la SEQ ID NO: 1-4, 37, 38 o combinaciones o fragmentos de las mismas. La inserción de los polipéptidos Romboides en el vector se puede lograr de varias maneras conocidas por los expertos en la materia, que incluyen, sin limitación, el sistema de mutación dirigida al sitio descrito en BMC Biotechnol. 2007 Sept, 17: 7(1): 59, Scarless and Site-directed Mutagenesis in *Salmonella* Enteritidis chromosome, y el método usado en el mismo descrito en Nguyen and Schumann J Biotechnol 2006 122: 473-482. El vector también puede modificarse por ingeniería para expresar los polipéptidos Romboides junto con otros polipéptidos antigénicos de parásitos apicomplexa tales como TRAP o de otros patógenos, incluidos virus como Gripe M2e o bacterias tales como *Salmonella* o *E. coli.* En particular, el vector puede expresar un polipéptido de CD154 capaz de unirse a CD40 o HMGB1 para potenciar la respuesta inmunitaria del sujeto al polipéptido Romboide.

Las composiciones que contienen polipéptidos antigénicos también se pueden usar para disminuir la morbilidad asociada a la infección posterior por un parásito apicomplexa. Las composiciones pueden evitar que el parásito provoque enfermedad o pueden limitar o reducir cualquier morbilidad asociada en un sujeto al que se administraron las composiciones o vectores de vacuna descritos en el presente documento. Las composiciones y los vectores de

vacuna descritos en el presente documento pueden reducir la gravedad de la enfermedad posterior al disminuir la duración de la enfermedad, pérdida de peso, la gravedad de los síntomas de la enfermedad, disminuir la morbilidad o mortalidad asociada a la enfermedad o reducir la probabilidad de contraer la enfermedad. Las composiciones también pueden reducir la propagación del parásito al inhibir la transmisión. La morbilidad o mortalidad asociada a la enfermedad después de la administración de los vectores de vacuna descritos en el presente documento puede reducirse en un 25%, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90% o incluso 100% en comparación con sujetos similares que no reciben el vector de vacuna.

Para la administración a animales o seres humanos, las composiciones pueden administrarse por varios medios que incluyen, pero sin limitación, por vía intranasal, a la mucosa, por pulverización, por vía intradérmica, por vía parenteral, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intracraneal, por vía oral, mediante aerosol o por vía intramuscular. La administración de gotas oculares, la administración por sonda oral o por adición al agua potable o alimentos también son adecuadas. Para aves de corral, las composiciones pueden administrarse *in ovo.*

Algunas divulgaciones proporcionan métodos para potenciar las respuestas inmunitarias en un sujeto. Sujetos adecuados pueden incluir, pero sin limitación, vertebrados, adecuadamente mamíferos, adecuadamente un ser humano, y aves, adecuadamente aves de corral tales como pollos o pavos. También se pueden usar otros animales de granja tales como vacas, gatos, perros o cerdos. De manera adecuada, el sujeto no es humano y puede ser un animal agropecuario.

La dosificación útil de la vacuna a administrar puede variar dependiendo de la edad, peso y la especie del sujeto, el modo y la ruta de administración y el tipo de patógeno contra el que se busca una respuesta inmunitaria. La composición puede administrarse en cualquier dosis suficiente para suscitar una respuesta inmunitaria. Se prevé que son adecuadas dosis que varían de 10^3 a 10^{10} copias de vectores (es decir, unidades formadoras de colonias o unidades formadoras de placas), de 10^4 a 10^9 copias de vectores, o de 10^5 a 10^7 copias de vectores.

La composición puede administrarse solo una vez o puede administrarse dos o más veces para aumentar la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la composición puede administrarse dos o más veces separadas por una semana, dos semanas, tres semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año o más. El vector de vacuna puede comprender microorganismos viables antes de la administración, pero en algunas realizaciones el vector puede destruirse antes de la administración. En algunas realizaciones, el vector puede ser capaz de replicarse en el sujeto, mientras que en otras realizaciones el vector puede no ser capaz de replicarse en el sujeto. Los expertos en la materia conocen métodos para inactivar microorganismos usados como vectores. Por ejemplo, un vector de vacuna bacteriana puede inactivarse usando formalina, etanol, exposición al calor o antibióticos. Los expertos en la materia también pueden usar otros métodos.

Se prevé que varios epítopos o antígenos de los mismos o diferentes patógenos se puedan administrar en combinación en una única vacuna para generar una respuesta inmunitaria mejorada contra múltiples antígenos. Las vacunas recombinantes pueden codificar antígenos de múltiples microorganismos patógenos, virus o antígenos asociados a tumores. La administración de vacuna capaz de expresar múltiples antígenos tiene la ventaja de inducir inmunidad contra dos o más enfermedades al mismo tiempo. Por ejemplo, las bacterias vivas atenuadas proporcionan un vector adecuado para provocar una respuesta inmunitaria contra múltiples antígenos de un solo patógeno, por ejemplo, TRAP (SEQ ID NO: 6) y MPP de *Eimeria* (SEQ ID NO: 2); o contra múltiples antígenos de diferentes patógenos, por ejemplo, *Eimeria* y Gripe o *Salmonella.*

Los vectores de vacuna pueden construirse usando polinucleótidos exógenos que codifican antígenos que pueden insertarse en el vector de vacuna en cualquier sitio no esencial o, alternativamente, pueden transportarse en un plásmido u otro vehículo cromosómico adicional (por ejemplo, un BAC o YAC) usando métodos bien conocidos en la técnica. Un sitio adecuado para la inserción de polinucleótidos es dentro de porciones externas de proteínas transmembrana o acoplado a secuencias que se dirigen al polinucleótido exógeno para vías secretoras y/o permiten la fijación a la pared celular. Un ejemplo de una proteína transmembrana adecuada para la inserción de polinucleótidos es el gen *lamB*. Se proporciona un método adecuado de fijación a la pared celular en los Ejemplos.

Los polinucleótidos exógenos incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos que codifican antígenos seleccionados de microorganismos o virus patógenos e incluyen polinucleótidos que se expresan de tal manera que se genera una respuesta inmunitaria eficaz. Dichos polinucleótidos pueden derivar de virus patógenos tales como la gripe(p. ej., M2e, hemaglutinina o neuraminidasa), herpesvirus (p. ej., los genes que codifican las proteínas estructurales de los herpesvirus), retrovirus (p. ej., la proteína de la envoltura gp160), adenovirus, paramixovirus, coronavirus y similares. Los polinucleótidos exógenos también se pueden obtener a partir de bacterias patógenas, por ejemplo, genes que codifican proteínas bacterianas tales como toxinas, proteínas de la membrana externa u otras proteínas altamente conservadas. Adicionalmente, los polinucleótidos exógenos de parásitos, tales como otros parásitos Apicomplexa, son candidatos atractivos para su uso en una vacuna de vector.

La presente divulgación no se limita a los detalles específicos de construcción, disposición de componentes o etapas del método expuestos en el presente documento. Las composiciones y métodos divulgados en el presente documento son capaces de hacerse, practicarse, usarse, desarrollarse y/o formarse de varias maneras que serán evidentes para

un experto en la materia a la luz de la divulgación que sigue. La fraseología y terminología usadas en el presente documento son únicamente para fines de descripción y no deberían considerarse limitantes del alcance de las reivindicaciones. Los indicadores ordinales, como el primero, el segundo y el tercero, tal como se usan en la descripción y en las reivindicaciones para referirse a diversas estructuras o etapas del método, no deben interpretarse para indicar estructuras o etapas específicas, ni ningún orden o configuración particular para tales estructuras o etapas. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se contradiga claramente de otro modo por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, está destinado simplemente a facilitar la divulgación y no implica ninguna limitación en el alcance de la divulgación a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva, y ninguna estructura mostrada en los dibujos, debe interpretarse como que indica que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica del tema divulgado. El uso en el presente documento de las expresiones "que incluye", "que comprende", o "que tiene", y variaciones de las mismas, pretende incluir los elementos enumerados a continuación en el presente documento y equivalentes de los mismos, así como elementos adicionales. Las realizaciones que se relatan como "que incluye", "que comprende", o "que tiene" determinados elementos también se contemplan como "que consisten esencialmente en" y "que consisten en" esos determinados elementos. Los términos "un/una", "unos/unas" y "el" pueden significar uno o más de uno a menos que estén específicamente definidos.

La enumeración de intervalos de valores en el presente documento está destinada meramente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor por separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor por separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara en el presente documento de manera individual. Por ejemplo, si un intervalo de concentración se establece como de 1 % a 50 %, se pretende que valores como de 2 % a 40 %, de 10 % a 30 %, o de 1 % a 3 %, etc., estén enumerados expresamente en la presente memoria descriptiva. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente, y todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre e incluyendo, el valor más bajo y el valor más alto enumerado deben considerarse expresamente establecidos en la presente divulgación. El uso de la palabra "aproximadamente" para describir una cantidad o intervalo de cantidades relatados particulares tiene el propósito de indicar que los valores muy cercanos a la cantidad relatada se incluyen en esa cantidad, tal como los valores que podrían o naturalmente se tendrían en cuenta debido a las tolerancias de fabricación, instrumento y error humano en la formación de mediciones, y similares. Todos los porcentajes que se refieren a cantidades son en peso a menos que se indique lo contrario.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de vectores de vacuna

Se construyeron múltiples combinaciones de vacunas con el fin de probar la eficacia y determinar la influencia de cada una en la protección contra la exposición a *Eimeria maxima*. En la figura 2 se muestra un dibujo que muestra las construcciones utilizadas en los ejemplos. Las secuencias TRAP MPP HMGB1 y MPP HMGB1 se sintetizaron y se insertaron en el plásmido pNDH10 para la expresión en la superficie celular. Cada secuencia se sintetizó con un sitio de restricción BamHI en el extremo 5' y un sitio de restricción AatII en el extremo 3' inmediatamente adyacente a la proteína B de unión a fibronectina *(fbpB).* La expresión de la secuencia de vacuna y *fbpB* está regulada por un operón *xyl* previamente insertado en el plásmido pNDH10 [1]. La *fbpB* incluía un motivo de clasificación que era reconocido por la sortasa A que ancla la *fbpB* a la superficie celular de una bacteria que expresa sortasa A [1]. Por lo tanto, las secuencias de vacuna se colocan cadena arriba y en marco con la secuencia *fbpB* de modo que cuando la *fbpB* se ancla a sortasa A en la pared celular, la secuencia del vector de vacuna se expresará en la superficie de la bacteria. El plásmido pNDH10 que contiene la secuencia de vacuna, *fbpB* y el operón *xyl* se transformó en *Bacillus subtilis* 1A857 que expresa sortasa A [2]. Cada plásmido se transformó en 1A857 añadiendo 0,6 µg de inserto/plásmido en un cultivo competente de 1A857 con ácido etilenglicol tetraacético 0,1 M (EGTA). Tras la transformación, 1A857 que expresa pNDH10 se seleccionó en agar LB que contenía 5 µg/ml de cloranfenicol para seleccionar solo células que portaban resistencia a antibióticos conferida por el plásmido a través de una secuencia *cat* que codifica la cloranfenicol acetil transferasa. Los plásmidos pNDH10 transformados en *Bacillus subtilis* 1A857 con de MPP HMGB1 (SEQ ID NO: 33), o TRAP MPP HMGB1 (SEQ ID NO: 31) se confirmaron mediante extracción de plásmidos seguido de PCR. Cada construcción 1A857/pNDH10/inserto se cultivó e indujo en xilosa al 0,6 % en caldo LB + glucosa al 0,1 % con 5 µg/ml de cloranfenicol durante 9 h a 37 °C mientras se agitaba. La expresión de las proteínas MPP-HMGB1 (SEQ ID NO: 34) y TRAP-MPP-HMGB1 (SEQ ID NO: 32) se confirmó mediante transferencia Western y microscopía de fluorescencia indirecta con anticuerpos anti-HMGBl de conejo.

Ejemplo 2. Reducción de la morbilidad y mortalidad de los pollitos después de la infección por *Eimeria*

Las vacunas vectorizadas MPP HMGB1 y TRAP MPP HMGB1 se probaron para determinar la capacidad de proporcionar protección contra una exposición a *Eimeria maxima* cuando se administraron a través del agua potable junto con un adyuvante de quitosano modificado. Los pollos de engorde se vacunaron a los 4 y 14 días de edad con la vacuna respectiva en el agua potable a una dilución de 1:128 (5 X 10^5 ufc/pollito) durante 24 h. A los 21 días de edad, todos los grupos se pesaron y se expusieron con $4x10^4$ oocistos esporulados de *E. maxima* por sonda oral. A la edad de 28 días, el peso corporal (PC) y la ganancia de peso corporal de los sobrevivientes (GPC) se registraron

durante el período de exposición. Además, la mortalidad se documentó para determinar la eficacia del candidato a vacuna. Ocho días después de la exposición, el PC fue significativamente mayor en los pollitos vacunados con TRAP-MPP-HMGB1 y MPP-HMGB1 en comparación con los pollitos no vacunados (Figura 3). La GPC fue significativamente mayor para todos los grupos vacunados 8 días después de la exposición en comparación con los controles (Figura 4). La mortalidad también fue significativamente menor en los grupos vacunados con TRAP-MPP-HMGB1 y MPP-HMGB1 que en el grupo no vacunado (Figura 5).

[1] Kim L, Mogk A, Schumann W. A xylose-inducible Bacillus subtilis integration vector and its application. Gene 1996 Nov 28;181(1-2):71-6.
[2] Nguyen HD, Schumann W. Establishment of an experimental system allowing immobilization of proteins on the surface of Bacillus subtilis cells. Journal of biotechnology 2006 Apr 20;122(4):473-82.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SHIVARAMAIAH, Srichaitanya
HARGIS, Billy
BARTA, John
BERGHMAN, Luc
FAULKNER, Olivia
BIELKE, Lisa

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA POTENCIAR LAS RESPUESTAS INMUNITARIAS A EIMERIA O LIMITAR LA INFECCIÓN POR EIMERIA

<130> 5658-00201

<150> US 61/764.681
<151> 14/02/2013

<160> 40

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: epítopo compuesto mínimo

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es Arg o Met

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> Xaa es Val o Ile

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa es Ser o Arg

<220>
<221> misc_feature
<222> (6).. (6)
<223> Xaa es Phe o Tyr

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa es His o Tyr

<400> 1

Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Gly Ala Cys Glu Xaa Asn Leu Gly
1 5 10 15

<210> 2
<211> 43
<212> PRT
<213> Eimeria maxima

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(43)
<223> MPP de Eimeria maxima

<400> 2

Pro Ser His Asp Ala Pro Glu Ser Glu Arg Thr Pro Arg Val Ile Ser
1 5 10 15

Phe Gly Tyr Gly Ala Cys Glu His Asn Leu Gly Val Ser Leu Phe Arg
20 25 30

Arg Glu Glu Thr Lys Lys Asp Pro Arg Gly Arg
35 40

<210> 3
<211> 28
<212> PRT
<213> Neospora canium

<400> 3

Pro Arg Ile Val Ser Phe Gly Tyr Gly Ala Cys Glu His Asn Leu Gly
1 5 10 15

Met Ser Leu Tyr Asp Arg Gln Gly Leu Gln Arg Gln
20 25

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> Eimeria tenella

<400> 4

Glu Ser Gln Arg Ala Pro Met Val Ile Arg Tyr Gly Tyr Gly Ala Cys
1 5 10 15

Glu Tyr Asn Leu Gly
20

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Eimeria maxima

<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(10)
<223> TRAP-1 de Eimeria maxima

<400> 5

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

<210> 6
<211> 40
<212> PRT
<213> Eimeria maxima

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> TRAP-02 de Eimeria maxima

<400> 6

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

<210> 7
<211> 40
<212> PRT
<213> Eimeria maxima

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> TRAP-03 de Eimeria maxima

<400> 7

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

<210> 8
<211> 70
<212> PRT
<213> Eimeria maxima

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(70)
<223> TRAP de Eimeria maxima

<400> 8

```
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
```

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Gripe Aviar

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(8)
<223> Virus de Gripe Aviar m2e

<400> 9

```
Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn
1               5
```

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Gripe Aviar

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(8)
<223> Virus de Gripe Aviar m2e

<400> 10

```
Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn
1               5
```

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Gripe Aviar

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(12)
<223> Virus de la Gripe Aviar HA5 UA

<400> 11

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

<210> 12
<211> 19
<212> PRT
<213> Gripe Aviar

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> Virus de la gripe aviar HA5 LB

<400> 12

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

Glu Glu Leu

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> Gripe Aviar

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(16)
<223> Virus de la Gripe Aviar NP 54-69

<400> 13

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

<210> 14
<211> 14
<212> PRT
<213> Gripe Aviar

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(14)
<223> Virus de la Gripe Aviar NP 147-160

<400> 14

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

<210> 15
<211> 190
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(190)
<223> aminoácido de HMGB1 de pollo

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 85
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: caja al de HMGB1

<400> 16

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

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

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

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

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

Pro Lys Gly Glu Thr
                85
```

<210> 17
<211> 54
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: caja a2 de HMGB1

<400> 17

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

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

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

Pro Pro Lys Gly Glu Thr
    50
```

<210> 18
<211> 73
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: caja bl de HMGB1

<400> 18

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

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

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

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

Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr
65                  70
```

<210> 19
<211> 69
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: caja b2 de HMGB1

<400> 19

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

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

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

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

Lys Asp Ile Ala Ala
65
```

<210> 20
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: dominio de unión a RAGE de HMGB1

<400> 20

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

Cys Ser Glu Phe Arg
20

<210> 21
<211> 33
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: actividad de citocinas proinflamatorias de HMGB1

<400> 21

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

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

Lys

<210> 22
<211> 215
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(215)
<223> HMGB1

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
    210                 215
```

<210> 23
<211> 205
<212> PRT
<213> Danio rerio

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(205)
<223> HMGB1 de pez cebra

<400> 23

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

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

```
                20                  25                  30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24
<211> 272
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(272)
<223> CD154 de pollo

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Glu Glu Lys Arg Gln Pro Ile Ala Thr His Leu Ala Gly Val Lys
    130                 135                 140

Ser Asn Thr Thr Val Arg Val Leu Lys Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
<211> 261

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(261)
<223 >CD154 humano

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Leu Lys Leu
            260
```

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(11)
<223> Péptido CD154 humano

<400> 26

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

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(11)
<223> Péptido CD154 de pollo

<400> 27

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

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Anas sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(10)
<223> Péptido CD154 de pato

<400> 28

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

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(10)
<223> Péptido CD154 de ratón

<400> 29

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

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Bos taurus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(10)
<223> Péptido CD154 de vaca

<400> 30

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

<210> 31
<211> 918
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de nucleótidos de TRAP MPP HMGB1

<400> 31

ggatccatgg gcggtagcag cagaagcagc gcagcacctg aaacgagagc agtccagccg 60

aaacctgaag aaggccatga aagacctgaa cctgaagaag aagaagagaa aaaagaagaa 120

ggcggcggct ttcctacagc agcagtcgcg ggcggatcaa gcagatcttc cccttctcat 180

gatgcgcctg aaagcgaacg gacgcctcgg gttatctcct ttggttacgg tgcgtgcgaa 240

cataatctgg gcgtctctct ttttagacgc gaagaaacga aaaaagatcc gcgtggacgg 300

ggcggatcaa gcagatcttc catgggtaaa ggcgacccga aaaaacctcg gggcaaaatg 360

tcaagctacg catttttcgt ccaaacatgc agagaagaac ataagaaaaa acatcctgat 420

gctagcgtaa acttttcaga atttagcaaa aaatgttctg aacgttggaa aacgatgtct 480

tccaaagaaa agggtaaatt tgaagatatg gctaaagccg acaaattgcg gtacgaaaaa 540

gaaatgaaaa actacgtacc gcctaaagga gaaacaaaga aaaaatttaa agatccgaac 600

gcccctaaaa gaccgccttc tgcatttttc ctgttttgct ccgaatttcg cccgaaaatt 660

aaaggagaac atcctggtct gagcatcggc gacgttgcga aaaaacttgg agaaatgtgg 720

aataacacgg cagcggatga caaacagccg tatgagaaaa aagctgccaa attgaaagaa 780

aaatacgaaa aagatatcgc agcgtaccgc gcaaaaggaa aagtggacgc gggtaaaaaa 840

gttgtggcta aagcggaaaa atcaaagaag aaaaaggaag aagaagaaga cggcggctca 900

tctcggtcct ccgacgtc 918

<210> 32
<211> 306
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: péptido TRAP MPP HMGB1

<400> 32

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

Ala Val Gln Pro Lys Pro Glu Glu Gly His Glu Arg Pro Glu Pro Glu
20 25 30

Glu Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gly Gly Gly Phe Pro Thr Ala Ala
35 40 45

Val Ala Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Pro Ser His Asp Ala Pro Glu
50 55 60

Ser Glu Arg Thr Pro Arg Val Ile Ser Phe Gly Tyr Gly Ala Cys Glu
65 70 75 80

His Asn Leu Gly Val Ser Leu Phe Arg Arg Glu Glu Thr Lys Lys Asp
85 90 95

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

Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln
115 120 125

```
Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn
    130                 135                 140

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

Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Leu
                165                 170                 175

Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Glu Thr
            180                 185                 190

Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala
        195                 200                 205

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

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

Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala
                245                 250                 255

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

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

Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser
    290                 295                 300

Asp Val
305
```

<210> 33
<211> 777
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: nucleótido MPP HMGB1

<400> 33

```
ggatccatgg gcggtagcag cagaagcagc ccttctcatg atgcgcctga aagcgaacgg       60

acgcctcggg ttatctcctt tggttacggt gcgtgcgaac ataatctggg cgtctctctt      120

tttagacgcg aagaaacgaa aaaagatccg cgtggacggg gcggatcaag cagatcttcc      180
```

atgggtaaag gcgacccgaa aaaacctcgg ggcaaaatgt caagctacgc atttttcgtc 240

caaacatgca gagaagaaca taagaaaaaa catcctgatg ctagcgtaaa cttttcagaa 300

tttagcaaaa aatgttctga acgttggaaa acgatgtctt ccaaagaaaa gggtaaattt 360

gaagatatgg ctaaagccga caaattgcgg tacgaaaaag aaatgaaaaa ctacgtaccg 420

cctaaaggag aaacaaagaa aaaatttaaa gatccgaacg cccctaaaag accgccttct 480

gcatttttcc tgttttgctc cgaatttcgc ccgaaaatta aaggagaaca tcctggtctg 540

agcatcggcg acgttgcgaa aaaacttgga gaaatgtgga ataacacggc agcggatgac 600

aaacagccgt atgagaaaaa agctgccaaa ttgaaagaaa aatacgaaaa agatatcgca 660

gcgtaccgcg caaaaggaaa agtggacgcg ggtaaaaaag ttgtggctaa agcggaaaaa 720

tcaaagaaga aaaaggaaga agaagaagac ggcggctcat ctcggtcctc cgacgtc 777

<210> 34
<211> 259
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: péptido MPP HMGB1

<400> 34

Gly Ser Met Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Pro Ser His Asp Ala Pro
1 5 10 15

Glu Ser Glu Arg Thr Pro Arg Val Ile Ser Phe Gly Tyr Gly Ala Cys
20 25 30

Glu His Asn Leu Gly Val Ser Leu Phe Arg Arg Glu Glu Thr Lys Lys
35 40 45

Asp Pro Arg Gly Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Met Gly Lys Gly
50 55 60

Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val
65 70 75 80

Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val
85 90 95

Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met
100 105 110

Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys
115 120 125

```
Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Glu
    130                 135                 140

Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser
145                 150                 155                 160

Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu
                165                 170                 175

His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met
            180                 185                 190

Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala
        195                 200                 205

Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala
    210                 215                 220

Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys
225                 230                 235                 240

Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ser Ser Arg Ser
                245                 250                 255

Ser Asp Val
```

<210> 35
<211> 768
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: secuencia de nucleótidos de TRAP HMGB1

<400> 35

```
ggatccatgg gcggtagcag cagaagcagc gcagcacctg aaacgagagc agtccagccg       60

aaacctgaag aaggccatga aagacctgaa cctgaagaag aagaagagaa aaaagaagaa      120

ggcggcggct ttcctacagc agcagtcgcg ggcggatcaa gcagatcttc catgggtaaa      180

ggcgacccga aaaaacctcg gggcaaaatg tcaagctacg cattttcgt ccaaacatgc       240

agagaagaac ataagaaaaa acatcctgat gctagcgtaa acttttcaga atttagcaaa      300

aaatgttctg aacgttggaa aacgatgtct tccaaagaaa agggtaaatt tgaagatatg      360

gctaaagccg acaaattgcg gtacgaaaaa gaaatgaaaa actacgtacc gcctaaagga      420

gaaacaaaga aaaaatttaa agatccgaac gcccctaaaa gaccgccttc tgcatttttc      480

ctgttttgct ccgaatttcg cccgaaaatt aaaggagaac atcctggtct gagcatcggc      540
```

gacgttgcga aaaaacttgg agaaatgtgg aataacacgg cagcggatga caaacagccg 600

tatgagaaaa aagctgccaa attgaaagaa aaatacgaaa aagatatcgc agcgtaccgc 660

gcaaaaggaa aagtggacgc gggtaaaaaa gttgtggcta aagcggaaaa atcaaagaag 720

aaaaaggaag aagaagaaga cggcggctca tctcggtcct ccgacgtc 768

<210> 36
<211> 256
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: péptido TRAP HMGB1

<400> 36

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

Ala Val Gln Pro Lys Pro Glu Glu Gly His Glu Arg Pro Glu Pro Glu
20 25 30

Glu Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gly Gly Gly Phe Pro Thr Ala Ala
35 40 45

Val Ala Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys
50 55 60

Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys
65 70 75 80

Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser
85 90 95

Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys
100 105 110

Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr
115 120 125

Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys
130 135 140

Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe
145 150 155 160

Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly
165 170 175

```
Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn
            180                 185                 190

Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu
        195                 200                 205

Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys
    210                 215                 220

Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys
225                 230                 235                 240

Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Asp Val
                245                 250                 255
```

<210> 37
<211> 32
<212> PRT
<213> Toxoplasma gondii

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(32)
<223> Toxoplasma gondii RH

<400> 37

```
Pro Arg Val Ile Ser Phe Gly Tyr Gly Ala Cys Glu His Asn Leu Gly
1               5                   10                  15

Val Ser Leu Phe Arg Arg Glu Glu Thr Lys Lys Asp Pro Arg Gly Arg
            20                  25                  30
```

<210> 38
<211> 43
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: Secuencia consenso

<220>
<221> misc_feature
<222> (11).. (11)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
<221> misc_feature
<222> (13).. (17)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
<221> misc_feature
<222> (24) .. (24)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
<221> misc_feature
<222> (28).. (28)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
<221> misc_feature
<222> (31).. (32)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(39)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 38

```
Pro Ser His Asp Ala Pro Glu Ser Glx Arg Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa
1               5                  10                  15

Xaa Gly Tyr Gly Ala Cys Glu Xaa Asn Leu Gly Xaa Ser Leu Xaa Xaa
            20                  25                  30

Arg Glx Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Arg Gly Arg
        35                  40
```

<210> 39
<211> 841
<212> PRT
<213> Toxoplasma gondii

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(841)
<223> R0M5 de Toxoplasma gondii

<400> 39

```
Met Ser Ser Lys Gly Gly Ser Ser Arg Leu Gly Ser Lys Asp Leu Lys
1               5                  10                  15

Lys Met Thr Ser Arg Thr Glu Arg Glu Leu Arg Asp Ser Gly Arg Val
            20                  25                  30

Arg Gly Glu Val Glu Arg Val Glu Lys Arg Leu Arg Ala Thr Ala Lys
        35                  40                  45

Val Lys Glu Gln Pro Pro Thr Gly Asp Tyr Lys Arg Arg Ala Leu Ala
    50                  55                  60

Ser Pro Gly Glu Thr Ala Ala Pro Thr Phe Leu Val Asp Ser Arg Gly
65                  70                  75                  80
```

```
Ile Pro Arg Lys Thr Ser Ser Thr Ala Pro Arg Lys Ala Thr Leu Arg
                85                  90                  95

Pro Ala Ser Ser Ser Pro Arg Leu Ala Ser Ser Ser Arg Pro Thr Glu
            100                 105                 110

Ser Thr Leu Pro Ser Ser Ser Ser Arg Ala Leu Gln Gly Ala Ser Ser
        115                 120                 125

Ser Ser Ser Ser Arg Pro Arg Arg Leu His Glu Ser Ala Ser Gly Arg
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Gly Glu Leu Arg Gln Glu Lys Lys Arg
145                 150                 155                 160

Leu Pro Glu Leu Glu Ala Ala Glu Ala Ala Pro Ala Ser Cys Val Val
                165                 170                 175

Glu Leu Arg Asp Val Thr Ala Arg Lys Gly Arg Thr Ser Pro Ala Thr
            180                 185                 190

Pro Pro Glu Thr Ala Gly Ser Ser Val Cys Gly Gln Gly Ser His Ala
        195                 200                 205

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

Ser Arg Arg Gly Ser Val Asp Ala Glu Thr Trp Ala Thr Pro Gly Asp
225                 230                 235                 240

Gly Ser Ser Ser His Glu Phe Glu Ser Ser Pro Gln Arg Glu Glu Arg
                245                 250                 255

Met Gln Pro Gln Glu Thr Gly Arg Arg Glu Leu Ser Ser Glu Pro Arg
            260                 265                 270

Ser Gly Asp Leu Thr Lys Asn Gly Gly Asp Gly Gly Pro Arg Arg His
        275                 280                 285

Ser Cys Ala Trp Arg Lys Trp Arg Glu His Met Ile Gln Ser Phe Asp
    290                 295                 300

Ile Thr Thr His Pro Phe Pro Pro Arg Gly Asp Gly Ser Pro Arg Arg
305                 310                 315                 320

Gly Lys Phe Leu Met Ile Phe Leu Thr Ser Ser Val Leu Phe Phe Val
                325                 330                 335
```

```
Phe Leu Gln Glu Leu Val Leu Asn Val Thr Thr Phe Asn Gly Arg Cys
            340                 345                 350

Met Ser Pro Val Leu Tyr Pro Ser His Asp Ala Pro Glu Ser Glu Arg
        355                 360                 365

Thr Pro Arg Val Ile Ser Phe Gly Tyr Gly Ala Cys Glu His Asn Leu
    370                 375                 380

Gly Val Ser Leu Phe Arg Arg Glu Glu Thr Lys Lys Asp Pro Arg Gly
385                 390                 395                 400

Arg Trp Thr Pro Gly Pro Leu Thr Glu Arg Cys Ala Ser Gly Arg Cys
                405                 410                 415

Ala Ser Asp Asp Gly Trp Pro Ser Asp Leu Val Gln Arg Gly Arg Ala
            420                 425                 430

Gln Arg Ser Pro Ala Ala Phe Asp Ser Pro Asn Pro Arg Val Phe Ser
        435                 440                 445

Ser Leu Gly Ala Leu Asp Thr Asn Lys Val Arg Asn Tyr Gly Glu Met
    450                 455                 460

Phe Arg Val Val Trp Gly Met Phe Leu His Gly Gly Trp Met His Leu
465                 470                 475                 480

Leu Leu Asn Val Ser Cys Gln Ala Gln Thr Leu Trp Ile Leu Glu Pro
                485                 490                 495

Ala Trp Gly Phe Leu Arg Thr Leu Ser Leu Trp Ile Val Gly Gly Val
            500                 505                 510

Ser Gly Ser Leu Leu Ser Ala Val Ala Asn Pro Cys Thr Val Thr Val
        515                 520                 525

Gly Ser Ser Gly Ala Phe Tyr Gly Leu Leu Gly Ala Leu Val Pro Phe
    530                 535                 540

Ser Ile Glu Tyr Trp Asp His Ile Ala Ser Pro Ala Trp Phe Leu Phe
545                 550                 555                 560

Cys Val Ser Val Leu Val Met Val Ala Gln Phe Gly Asn Met Val Gly
                565                 570                 575

Val Gln Gly Val Asp Asn Asn Ala His Leu Gly Gly Leu Ile Gly Gly
```

580 585 590

Leu Leu Phe Gly Phe Ala Thr Ile Arg Ser Val His Ala Phe Arg Trp
595 600 605

Gln Gly Val Ala Glu Arg Met Ala Ser Ser Thr Leu Phe Trp Trp Met
610 615 620

Phe Pro Ala Glu Lys Arg Arg Ser Leu Arg Glu Asp Asn Leu Gln Arg
625 630 635 640

Val Ala Arg Glu Arg Glu Glu Arg Ser Ser Gly Arg Ile Pro Pro Pro
645 650 655

Lys Phe Val Trp Lys Phe Arg Gly His Glu Arg Glu Trp Cys Val Arg
660 665 670

Phe Ala Ala Ala Val Gly Leu Val Thr Phe Trp Ser Val Leu Trp Leu
675 680 685

Tyr Leu Leu Val Pro Ser Tyr Tyr Glu Ser Leu Ser Ser Pro Pro Gly
690 695 700

Asn Phe Ser Phe Leu Gly Ser Thr Gly Cys His Cys Cys Arg Val Gln
705 710 715 720

Pro Phe Pro Gly Glu Glu Asp Lys Leu Pro Ala Phe His Pro Val Arg
725 730 735

Val Asn Arg Gly Leu Phe Trp Cys Phe Val Ser Glu Gly Val Ala Asn
740 745 750

Leu Phe Cys Gly Arg Ser Ser Ala Leu Asn Arg Gly Ala Asp Val Tyr
755 760 765

Gly Gln Thr Arg Gln Phe Glu Glu Ala Leu Gly Asp Leu Pro Ser Ala
770 775 780

Arg Ala Gly Glu Ala Pro Leu Arg Ile Ala Lys Glu Glu Gly Glu Ser
785 790 795 800

Ala Ser Val Trp Gln Arg Leu Val Lys Ser Ala Lys Lys Thr Tyr Asn
805 810 815

Ala Val Leu Gly Asn Thr Thr Thr Pro Ala Ala Pro Ser Ala Ala Glu
820 825 830

Leu Ala Gln Gln Thr Arg Ala Gly Gln
835 840

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(40)
<223> TRAP-02A de Eimeria maxima

<400> 40

Ala Ala Pro Glu Thr Arg 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

REIVINDICACIONES

1. Un vector de vacuna que comprenden una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido Romboide de Apicomplexa opcionalmente expresado en la superficie del vector de vacuna, en donde el polipéptido Romboide consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 37, o un fragmento inmunogénico de la SEQ ID NO: 2 que comprende los aminoácidos 1-11, 18-27 o 31-43 de la SEQ ID NO: 2 y que además comprende una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido inmunoestimulador, en donde el polipéptido inmunoestimulador se expresa en la superficie del vector de vacuna,
en donde el vector de vacuna produce una respuesta inmunitaria contra un parásito Apicomplexa en un sujeto, y en donde la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora.

2. El vector de vacuna de la reivindicación 1, en donde el polipéptido inmunoestimulador es un polipéptido HMGB1, en donde el polipéptido HMGB1 comprende opcionalmente un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 15-23, un fragmento de al menos uno de las SEQ ID NO: 15-23, un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 15-23 y combinaciones de los mismos.

3. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el polipéptido inmunoestimulador es un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40, teniendo el polipéptido CD154 menos de 50 aminoácidos y comprendiendo los aminoácidos 140-149 de la SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, y en donde el polipéptido CD154 se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y polipéptidos que tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia con al menos una de las SEQ ID NO: 26-30.

4. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el vector comprende más de una copia de la primera secuencia de polinucleótidos y/o más de una copia de la segunda secuencia de polinucleótidos.

5. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la primera secuencia de polinucleótidos está unida en el mismo marco de lectura a la segunda secuencia de polinucleótidos, y en donde el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido están opcionalmente unidos a través de una secuencia de nucleótidos espaciadores.

6. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el vector de vacuna se selecciona de entre el grupo que consiste en un virus, una bacteria, una levadura y un liposoma y opcionalmente en donde el vector de vacuna es un *Bacillus* spp.

7. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además un tercer polinucleótido que codifica un polipéptido TRAP, y en donde el polipéptido TRAP se selecciona opcionalmente de un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 40, un fragmento inmunogénico de la SEQ ID NO:5, un fragmento inmunogénico de la SEQ ID NO:6, un fragmento inmunogénico de la SEQ ID NO:7 y un fragmento inmunogénico de la SEQ ID NO:40.

8. El vector de vacuna de la reivindicación 1, en donde el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido codifican un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 y polipéptidos que tienen un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 32 o la SEQ ID NO: 34.

9. Una composición farmacéutica que comprende el vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9 para su uso en un método para potenciar la respuesta inmunitaria contra un parásito Apicomplexa en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto el vector de vacuna o la composición farmacéutica, y opcionalmente en donde el parásito Apicomplexa se selecciona del grupo que consiste en *Eimeria, Plasmodium, Toxoplasma, Neospora* y *Cryptosporidium.*

11. El vector de vacuna o la composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 10, en donde la respuesta inmunitaria potenciada comprende una respuesta de anticuerpos potenciada, una respuesta de linfocitos T potenciada o ambas.

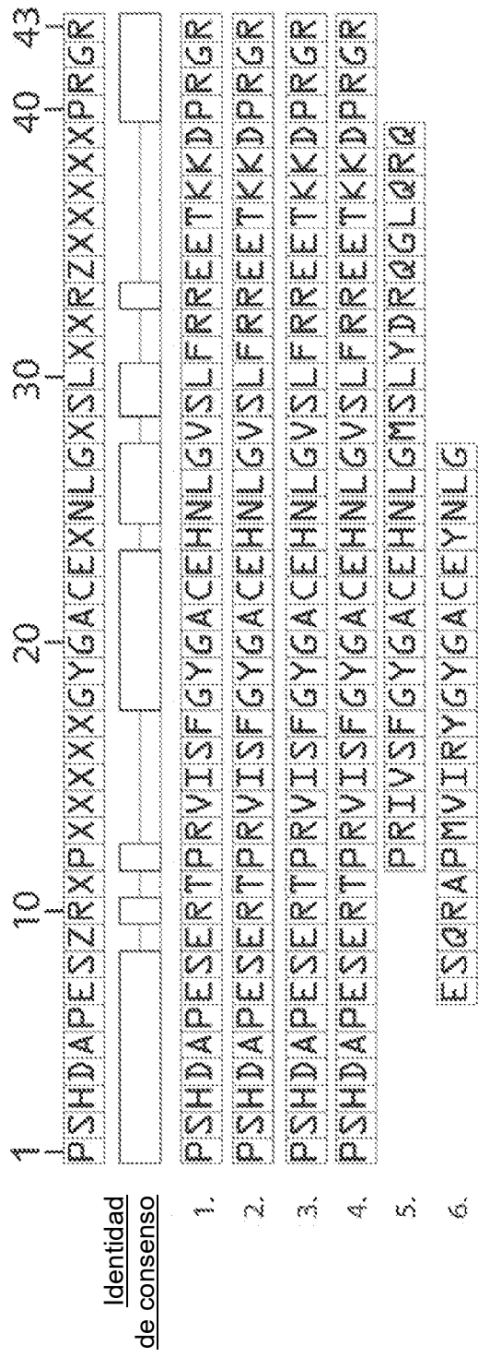
12. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9 para su uso en un método para reducir la morbilidad asociada a una infección por un parásito Apicomplexa en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto el vector de vacuna o la composición farmacéutica, y opcionalmente en donde el parásito Apicomplexa se selecciona del grupo que consiste en *Eimeria, Plasmodium, Toxoplasma, Neospora* y *Cryptosporidium.*

13. El vector de vacuna o la composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde el vector de vacuna se administra por una ruta seleccionada del grupo que consiste en oral, de la mucosa, parenteral, subcutánea, intramuscular, intraocular e *in ovo*, y opcionalmente en donde se administran 10^4 a 10^9 o 10^5

a 10^7 copias de vector de la vacuna al sujeto.

14. El vector de vacuna o la composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en donde el sujeto es una especie de aves de corral o un mamífero y se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en pollo, pavo, ser humano, cerdo o vaca.

15. El vector de vacuna o la composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en donde el vector de vacuna se destruye antes de la administración al sujeto o no es capaz de replicarse en el sujeto.



Identidad de consenso (SEQ ID NO: 38)

1. Toxoplasma gondii ME49 – XM_002370197 - proteasa tipo romboide 5 (SEQ ID NO: 2)
2. Toxoplasma gondii AY634626 - proteasa tipo romboide 5 (SEQ ID NO: 2)
3. Toxoplasma gondii AY587208 - proteasa tipo romboide 5 (SEQ ID NO: 2)
4. Toxoplasma gondii RH - AM055942 - proteasa tipo romboide 5 (SEQ ID NO: 2)
5. Neospora caninum Liverpool - FR823380 - supuesta proteasa tipo romboide (SEQ ID NO: 3)
6. Eimeria tenlla - JN558353 - traducción de la proteasa tipo romboide 4 (SEQ ID NO: 4)

Fig. 1

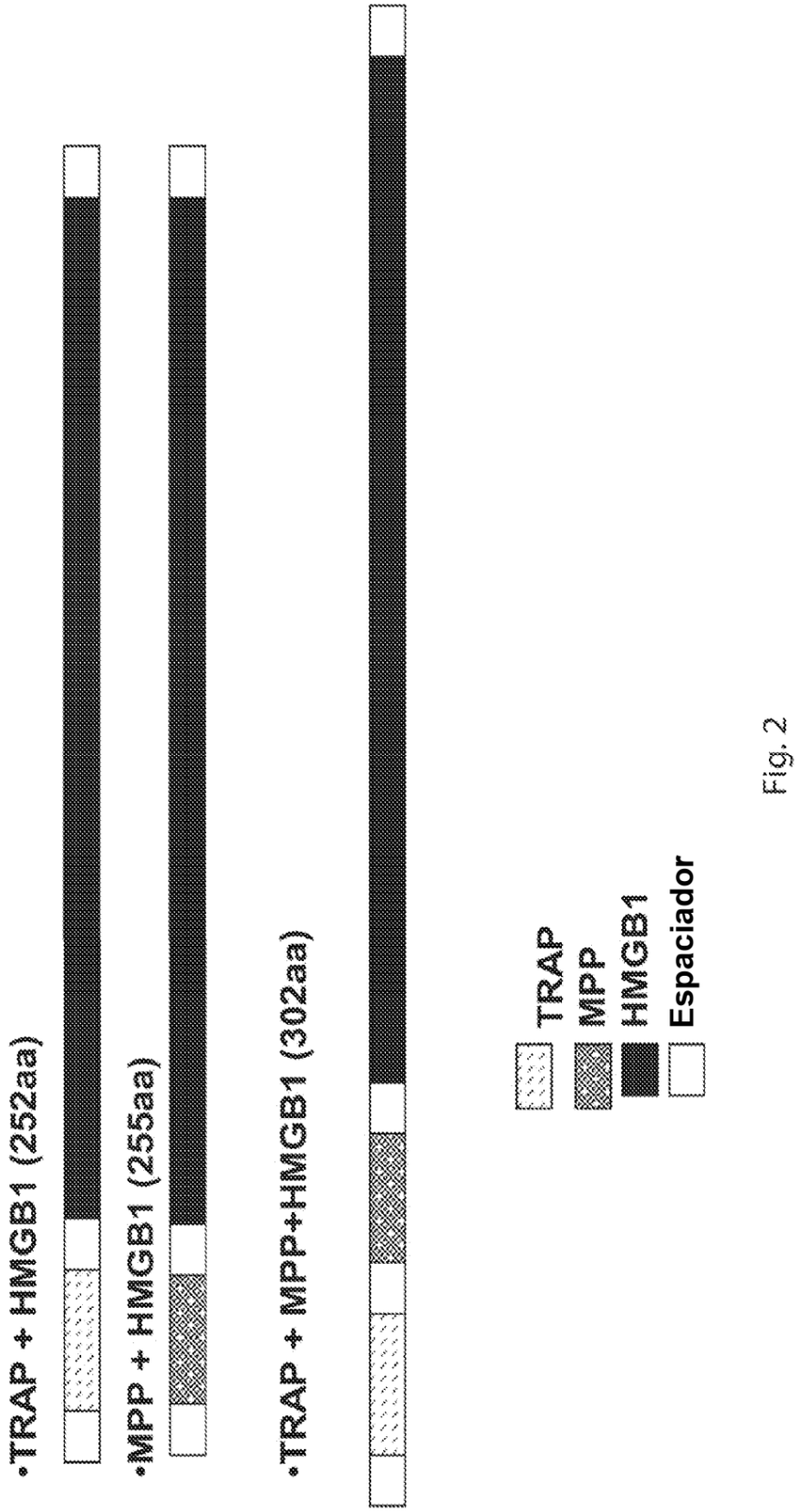

•TRAP + HMGB1 (252aa)
•MPP + HMGB1 (255aa)
•TRAP + MPP+HMGB1 (302aa)
TRAP
MPP
HMGB1
Espaciador

Fig. 2

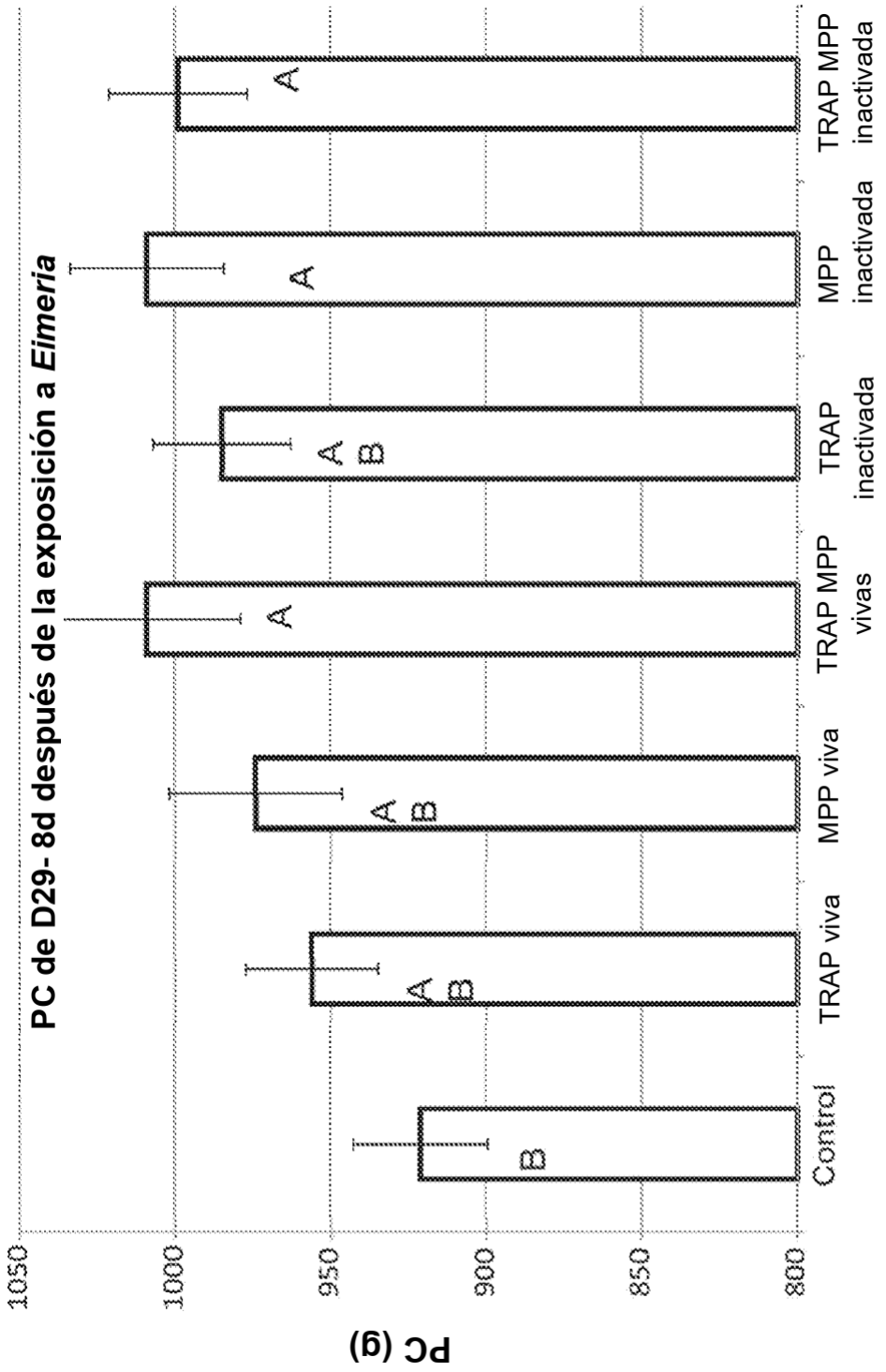

PC de D29- 8d después de la exposición a *Eimeria*
PC (g)
1050
1000
950
900
850
800
Control
TRAP viva
MPP viva
TRAP MPP vivas
TRAP inactivada
MPP inactivada
TRAP MPP inactivada
A
B

Fig. 3

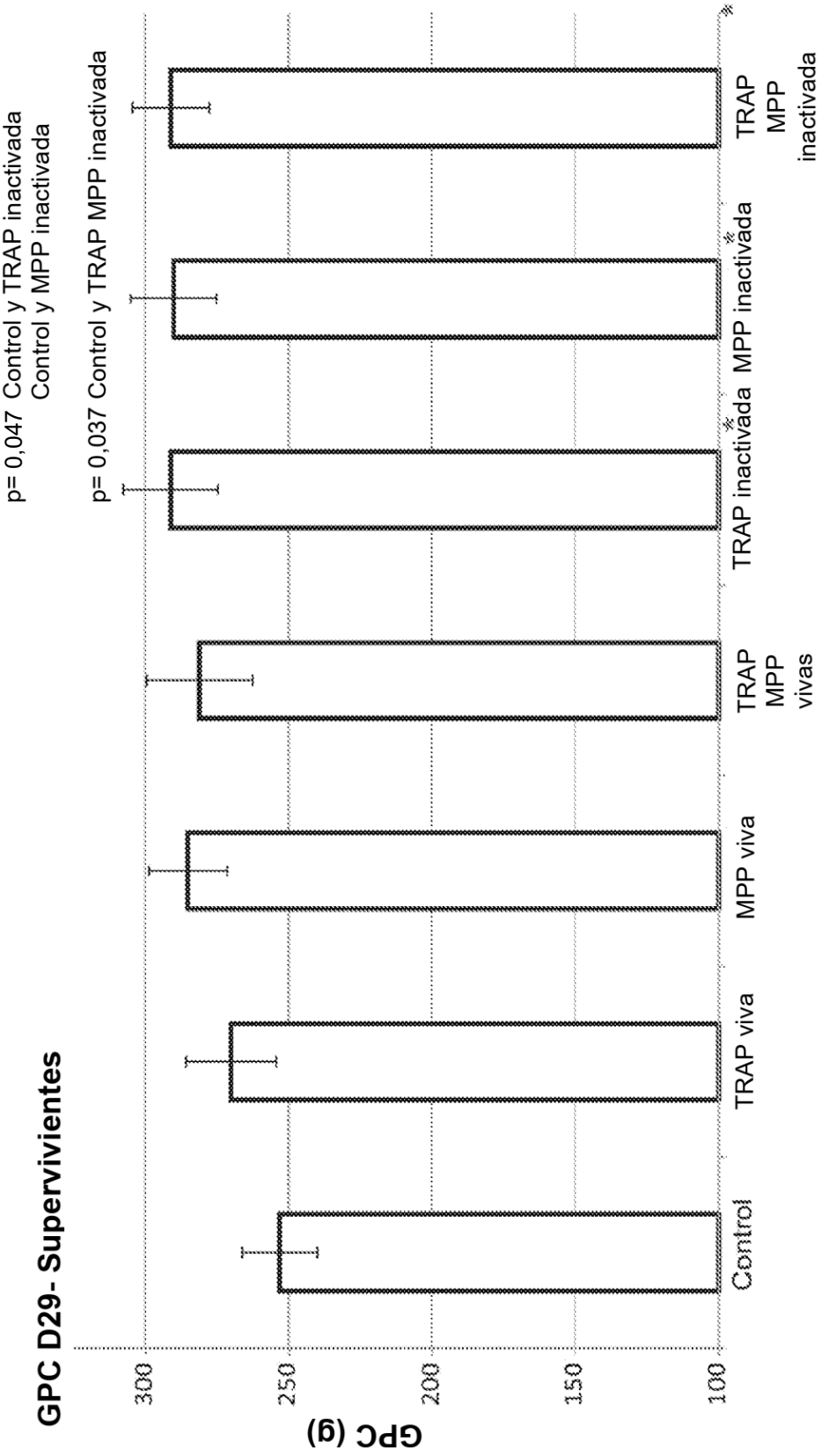

GPC D29- Supervivientes
GPC (g)
300
250
200
150
100
Control
TRAP viva
MPP viva
TRAP MPP vivas
TRAP inactivada
MPP inactivada
TRAP MPP inactivada
p= 0,037 Control y TRAP MPP inactivada
p= 0,047 Control y TRAP inactivada
Control y MPP inactivada

Fig. 4

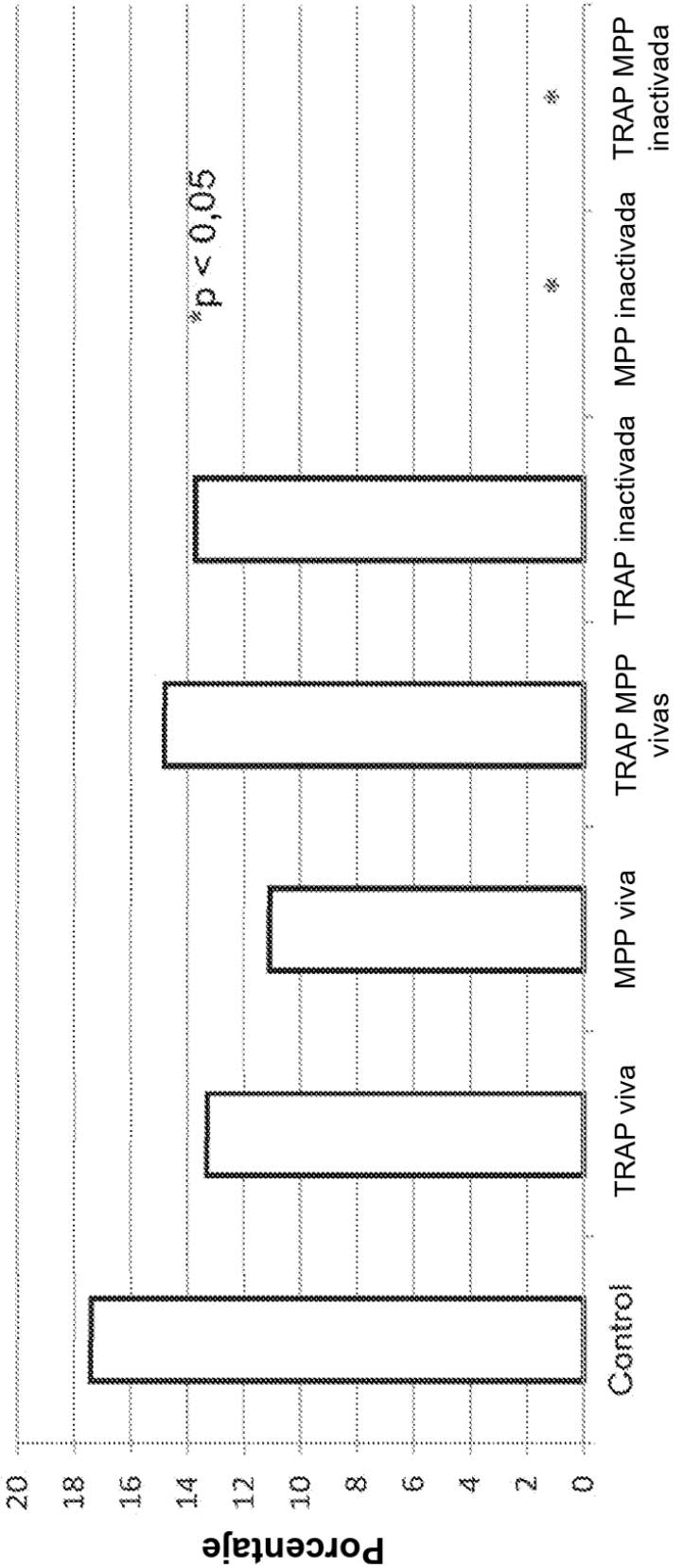

Mortalidad total después de la exposición a *Eimeria*
Porcentaje
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
*p < 0,05
*
*
Control
TRAP viva
MPP viva
TRAP MPP vivas
TRAP inactivada
MPP inactivada
TRAP MPP inactivada

Fig. 5