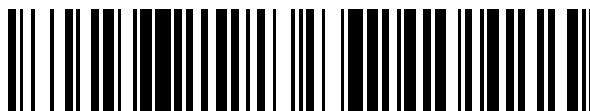


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 693**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/012** (2006.01)

**A61K 38/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2008 E 16175274 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3097926**

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

30 Prioridad:

**01.11.2007 US 984612 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.05.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 761 693 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

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

### 5 INTRODUCCIÓN

La coccidiosis, una enfermedad infecciosa de las aves de corral, porcinos y bovinos causada por el parásito protozoario apicomplejo *Eimeria*, 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. Otros miembros de la familia de apicomplejos también causan enfermedades, incluyendo *Plasmodium*, *Cryptosporidium* y *Toxoplasma*, que son los agentes causantes del paludismo, la criptosporidiosis y la toxoplasmosis, respectivamente. Las vacunas actualmente disponibles contra *Eimeria* se basan en dosis bajas controladas de parásitos de *Eimeria* esencialmente completamente virulentos pero sensibles a los fármacos. La vacunación con las vacunas actuales basadas en *Eimeria* produce una considerable morbilidad de reacción a la vacuna y pérdidas económicas en los rebaños vacunados. Por lo tanto, se necesita una vacuna eficaz de baja virulencia contra *Eimeria*. Una vacuna eficaz para *Eimeria* también puede resultar útil como vacuna contra otros parásitos apicomplejos.

### Sumario

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

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

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

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

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa el esquema para realizar mutaciones dirigidas al sitio en *Salmonella enteritidis*. La figura 2 representa el esquema de diseño del método de PCR de extensión superpuesta utilizado para generar las inserciones TRAP y TRAP-CD154 en el bucle 9 del polinucleótido *lamB*. La figura 3 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de mortalidad a los cinco días después de la infección con *Eimeria maxima* después de la inoculación con un vector de *Salmonella* que expresa la secuencia de TRAP de *Eimeria* indicada.

### Descripción detallada

Las tecnologías de ADN recombinante permiten una manipulación relativamente fácil de muchas especies bacterianas y virales. Algunas bacterias y virus son levemente patógenos o no patógenos, pero son capaces de generar una respuesta inmunitaria robusta. Estas bacterias y virus producen vacunas atractivas para provocar una respuesta inmunitaria a los antígenos. Las vacunas bacterianas o virales pueden imitar una infección natural y producir una inmunidad mucosa robusta y duradera. Las vacunas a menudo son relativamente baratas de producir y administrar. Además, tales vectores a menudo pueden transportar más de un antígeno y pueden proporcionar protección contra múltiples agentes infecciosos.

En un aspecto, se proporciona una vacuna que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido TRAP o un fragmento inmunogénico del mismo. El polipéptido TRAP puede comprender la SEQ ID NO: 11 o un fragmento inmunogénico de la SEQ ID NO:11. Una vacuna incluye cualquier composición que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido antigénico que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria al polipéptido. En otro aspecto, el uso de vectores, tales como vectores bacterianos, para la vacunación y la generación de respuestas inmunitarias contra *Eimeria* u otros parásitos apicomplejos, tales como *Plasmodium* (el agente causante del paludismo), Se desvela *Toxoplasma* y *Cryptosporidium*. Las cepas de *Salmonella* son vectores adecuados porque los genes bacterianos pueden mutarse o atenuarse para crear bacterias con poca o ninguna patogenicidad para el sujeto infectado o inmunizado, al tiempo que se mantiene la inmunogenicidad.

Se ha demostrado que un antígeno de alta masa molecular en estadio asexual de *Eimeria maxima* (EmTFP250) es un objetivo para los anticuerpos maternos producidos por gallinas reproductoras infectadas con este parásito protozoario (International Journal for Parasitology; 34 (2004) 861-872). 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 e tipo 1 y 31 dominios de unión a calcio similares al factor de crecimiento epidérmico. EmTFP250 o TRAP también contiene dos regiones hidrofílicas complejas bajas ricas en restos de ácido glutámico y de glicina, y un dominio transmembrana/cola citosólica asociada a la motilidad de deslizamiento del parásito que está altamente conservada dentro de las proteínas micronemas de apicomplejos. Se seleccionaron varios epítomos potenciales y se identifican en las SEQ ID NO: 1-3 y 11. Debido a la naturaleza conservada de este antígeno, la expresión de estos epítomos por un vector puede inducir inmunidad protectora contra múltiples parásitos apicomplejos.

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

Se describe una cepa de *Salmonella enteritidis* útil como vector, y varios vectores recombinantes hechos usando esta cepa. Específicamente, se proporciona una *Salmonella enteritidis* 13A (SE13A) capaz de expresar un polipéptido TRAP exógeno. Además, se desvela una vacuna y métodos para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto mediante la administración de la vacuna que comprende una secuencia de polinucleótidos TRAP que codifica un polipéptido TRAP y una secuencia de polinucleótidos CD154 que codifica un polipéptido CD154 o un homólogo del mismo que es capaz de unirse a CD40. Las vacunas se pueden usar para mejorar una respuesta inmunitaria contra *Eimeria* u otro parásito apicomplejo, tales como *Plasmodium*, *Toxoplasma* o *Cryptosporidium*, o puede usarse para reducir la morbilidad asociada a una infección causada por un parásito apicomplejo.

Un aislado de tipo salvaje de *Salmonella*, *Salmonella enteritidis* 13A (SE13A) (depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) el 13 de septiembre de 2006, número de depósito PTA-7871), se seleccionó basándose en su capacidad inusual de causar colonización de la mucosa y translocación submucosa en pollos, lo que permite una presentación robusta de antígenos o epítomos asociados en pollos comerciales. Es importante destacar que este aislado de *Salmonella* de tipo salvaje no causa enfermedad clínicamente detectable o pérdida de rendimiento en pollos comerciales, indicando poco potencial causante de enfermedad de la *Salmonella* de tipo salvaje en animales vertebrados.

El aislado de SE13A puede atenuarse más inactivando al menos un gen necesario para la replicación sostenida de la bacteria fuera de las condiciones de laboratorio o de fabricación. A continuación se describen cepas atenuadas o variantes de *Salmonella* que pueden usarse como vectores. SE13A se utilizó para generar cepas atenuadas de *Salmonella* para desarrollar vacunas y generar respuestas inmunitarias mejoradas. SE13A es invasivo, no patógeno para las aves de corral y no causa una morbilidad mensurable. Estas características dan como resultado una respuesta inmunitaria mejorada en comparación con los vectores bacterianos no invasivos. La atenuación de SE13A por la mutación de genes que limitan la capacidad de propagación de la bacteria puede aumentar la seguridad de la vacuna. Las cepas SE13A con mutaciones en *aroA* o *htrA* conservan la capacidad de generar una respuesta inmunitaria, pero tienen una replicación limitada en el huésped. Por consiguiente, la atenuación aumenta la seguridad del vector sin comprometer la inmunogenicidad.

Las mutaciones pueden realizarse en otros varios genes de *Salmonella*, incluidos, aunque no de forma limitativa, *cya*, *crp*, *asd*, *cdt*, *phoP*, *phoQ*, *ompR*, proteínas de la membrana externa, *dam*, *htrA* u otros genes relacionados con el estrés, *aro*, *pur* y *gua*. Tal como se muestra en los Ejemplos, se encontró que las mutaciones en *aroA* y *htrA* atenúan SE13A. Los genes *aro* son enzimas involucradas en la ruta de la biosíntesis de shikimato o la ruta de aromataza y los mutantes *aro* son auxotróficos para los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina. *htrA* es un gen de respuesta al estrés que codifica una proteasa periplásmica que degrada las proteínas aberrantes. Los mutantes en *htrA* también se atenúan y muestran una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno.

Las mutaciones en *aroA* y *htrA* descritas en los Ejemplos son mutaciones de delección, pero las mutaciones se pueden hacer de varias maneras. Adecuadamente, las mutaciones son mutaciones no reversibles que no pueden repararse en una sola etapa. Las mutaciones adecuadas incluyen delecciones, inversiones, inserciones y sustituciones. Un vector puede incluir más de una mutación, por ejemplo, un vector puede contener mutaciones tanto en *aroA* como en *htrA*. Los métodos para hacer tales mutaciones son bien conocidos en la técnica.

Los polinucleótidos que codifican los antígenos del polipéptido TRAP y otros antígenos de cualquier número de organismos patógenos pueden insertarse en el vector (por ejemplo, SE13A) y expresarse en la bacteria. 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 de la bacteria o estar codificados en plásmidos u otro ADN extracromosómico. Los expertos en la materia apreciarán que existen numerosas metodologías para obtener la expresión de polinucleótidos en vectores tales como *Salmonella*. Los polinucleótidos pueden estar operativamente conectados a un promotor (por ejemplo, un promotor constitutivo, un promotor inducible, etc.) por métodos conocidos por los expertos en la materia. Adecuadamente, los polinucleótidos que codifican los antígenos TRAP se insertan en un polinucleótido bacteriano que se expresa. Adecuadamente, el polinucleótido bacteriano codifica una proteína transmembrana y el polinucleótido que codifica el antígeno TRAP se inserta en la secuencia del polinucleótido bacteriano para permitir la expresión del antígeno TRAP en la superficie de la bacteria. Por ejemplo, el polinucleótido que codifica TRAP puede insertarse en marco en el polinucleótido bacteriano en una región que codifica una región de bucle externo de una proteína transmembrana de modo que la secuencia de polinucleótido bacteriano permanezca en marco. Véase el Ejemplo 1.

Como alternativa, el primer polinucleótido que codifica el antígeno TRAP puede insertarse en un polinucleótido que codifica un polipéptido secretado. Los expertos en la materia apreciarán que el polinucleótido que codifica el antígeno TRAP podría insertarse en una amplia variedad de polinucleótidos bacterianos para proporcionar expresión y presentación del antígeno TRAP a las células inmunes de un sujeto tratado con la vacuna. En los ejemplos, se insertó un primer polinucleótido que codifica el polipéptido TRAP en el bucle 9 del gen *lamB* de SE13A. El polinucleótido que codifica el antígeno TRAP puede incluirse en una sola copia o en más de una copia. También se puede generar un vector bacteriano que contiene múltiples copias del antígeno TRAP insertado en el bucle 9 de *lamB*. Como alternativa, se pueden insertar múltiples copias de un epítipo en el vector bacteriano en más de una ubicación.

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

Otros epítopos adecuados para su inclusión en una vacuna que tiene TRAP comprendida dentro de un vector incluyen, aunque sin limitación, polinucleótidos que codifican otros polipéptidos relacionados con *Eimeria*. Un experto en la materia apreciará que se pueden usar diversas secuencias en combinación con cualquier otro antígeno y también se puede usar junto con polipéptidos que codifican péptidos inmunoestimulantes, tales como un polipéptido de CD154.

Como se describe con mayor detalle a continuación, una vacuna que incluye un vector 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 su antígeno asociado. La participación de las células dendríticas (CD) es esencial para el inicio de una respuesta inmunitaria potente, ya que poseen la capacidad única de activar los linfocitos T intactos, causando expansión y diferenciación de linfocitos T en células efectoras. Es función de las CD, que es una célula presentadora de antígeno (CPA) que se encuentra en prácticamente todos los tejidos del cuerpo, capturar los antígenos, transportarlos al tejido linfoide asociado y, a continuación, presentarlos a los linfocitos T intactos. Tras la activación por las CD, los linfocitos T se expanden, se diferencian en células efectoras, salen de los órganos inmunitarios secundarios y entran en los tejidos periféricos. Los linfocitos T citotóxicos activados (LTC) pueden destruir las células infectadas por virus, las células tumorales o incluso las CPA infectadas con parásitos intracelulares (por ejemplo, *Salmonella*) y se ha demostrado que son cruciales en la protección contra la infección viral. CD40 es un miembro de la familia de moléculas del receptor de TNF y se expresa en diversos tipos de células, incluidas las células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales, tales como CD y linfocitos B. La interacción de CD40 con su ligando CD154 es extremadamente importante y estimulante para la inmunidad humoral y celular. La estimulación de las CD a través de CD40, expresado en la superficie de las CD, puede ser simulada por los anticuerpos anti-CD40. En el cuerpo, sin embargo, esto se produce por la interacción con el ligando natural para CD40 (es decir, CD154) expresado en la superficie de los linfocitos T activados. Resulta interesante que 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* y da como resultado una respuesta inmunitaria mejorada contra una secuencia peptídica presentada conjuntamente.

Tal como se ha descrito anteriormente, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos CD154 pueden insertarse en el cromosoma del vector o mantenerse extracromosómicamente. Un polipéptido CD154 puede ser una porción de la proteína de longitud completa CD154 o la proteína CD154 completa. Adecuadamente, el polipéptido CD154 es capaz de unirse a CD40. Un experto en la materia apreciará que estos polinucleótidos pueden insertarse en marco en diversos polinucleótidos y expresarse en diferentes partes del vector o pueden secretarse. El polinucleótido que codifica un polipéptido CD154 capaz de potenciar la respuesta inmunitaria a TRAP también puede codificar el antígeno TRAP. El polinucleótido que codifica un polipéptido CD154 puede estar unido al polinucleótido que codifica el antígeno TRAP, de forma tal que en el vector, el polipéptido CD154 y el antígeno TRAP están presentes en el mismo polipéptido. En los ejemplos, un polinucleótido que codifica un polipéptido de CD154 que es capaz de unirse a CD40 también codifica el antígeno TRAP. Véanse las SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 11 en el listado de secuencias adjunto.

En los ejemplos, los polinucleótidos (SEQ ID NO: 13-15) que codifican el antígeno TRAP y el polinucleótido que codifica el polipéptido CD154 están ambos insertados en el bucle 9 del gen *lamB*. Los expertos en la materia apreciarán que también se pueden usar polinucleótidos bacterianos que codifican otras proteínas transmembrana y otros bucles del gen *lamB*.

5 Como se ha mencionado anteriormente, puede incluirse en la vacuna un polinucleótido CD154 que codifica un polipéptido CD154 que es capaz de mejorar la respuesta inmunitaria al antígeno. Adecuadamente, 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 de ser humano se proporcionan en la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO:4, respectivamente.

15 Se han determinado las regiones de unión a CD40 de CD154 para varias especies, incluyendo seres humanos, pollo, patos, ratón y ganado vacuno, y se muestran en la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:6, la SEQ ID NO:7, la SEQ ID NO:8 y la SEQ ID NO:9, respectivamente. Aunque existe una variabilidad en las secuencias en la región de unión de CD40 entre especies, el polipéptido CD154 humano fue capaz de mejorar la respuesta inmunitaria en pollos. Por tanto, se puede practicar la invención utilizando polipéptidos CD154 específicos de especie o un polipéptido CD154 heterólogo como se define en las reivindicaciones.

20 En los ejemplos, se generaron varias bacterias recombinantes SE13A. En cada una de las cepas SE13A que contienen los polinucleótidos TRAP y CD154, el polipéptido TRAP y el polipéptido CD154 se codificaron en el mismo polinucleótido y estaban en marco entre sí y con el polinucleótido de *Salmonella lamB* en el que se insertaron. En realizaciones alternativas, el polipéptido CD154 y el polipéptido TRAP pueden estar codificados por polinucleótidos distintos. SE13A *aroA htrA TRAP* contiene una delección en *aroA* y *htrA* y codifica el epítipo TRAP (SEQ ID NO: 1-3) y, opcionalmente, el polipéptido CD154 (SEQ ID NO:4) insertado en el bucle 9 de *lamB*.

30 También se proporcionan composiciones que comprenden una cepa atenuada de *Salmonella* y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es cualquier vehículo adecuado para la administración *in vivo*. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en la composición incluyen, aunque sin limitación, agua, soluciones tamponadas, soluciones de glucosa o fluidos de cultivo bacteriano. Los componentes adicionales de las composiciones pueden incluir adecuadamente, por ejemplo, excipientes, tales como estabilizantes, conservantes, diluyentes, emulsionantes y lubricantes. Los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen estabilizantes, tales como hidratos de carbono (por ejemplo, sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas, tales como albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas, tales como suero bovino o leche desgrasada y tampones (por ejemplo, tampón fosfato). Especialmente, cuando tales estabilizantes se añaden a las composiciones, la composición es adecuada para liofilización o desecación por pulverización.

40 También se proporcionan métodos para mejorar las respuestas inmunitarias en un sujeto mediante la administración de una vacuna que contiene un polipéptido TRAP y 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 mejorar la respuesta inmunitaria del sujeto a la vacuna. Adecuadamente, la vacuna contiene un polinucleótido que codifica un polipéptido que incluye los aminoácidos 140-149 del polipéptido CD154 humano (SEQ ID NO: 4) o un homólogo del mismo. Por tanto, un homólogo del aminoácido 140-149 derivado de una especie puede usarse para estimular una respuesta inmunitaria en una especie distinta.

50 Varios polipéptidos adecuados se identifican en el presente documento. Adecuadamente, el polinucleótido codifica un polipéptido CD154 de la misma especie que el sujeto. Adecuadamente, en sujetos humanos se usa un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:5, en pollos se usa un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 6, en patos se usa un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:7, en ratones se usa un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO: 8 y en vacas se usa un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:9. En los ejemplos, el polipéptido CD154 humano (SEQ ID NO: 5) se usó en una vacuna de pollo y se demostró que mejora la respuesta inmunitaria a un antígeno extraño. Por lo tanto, otras combinaciones heterólogas de polipéptidos CD154 y sujetos pueden ser útiles en los métodos descritos en el presente documento. El polipéptido CD154 puede usarse para mejorar la respuesta inmunitaria en el sujeto a cualquier antígeno extraño o polipéptido antigénico presente en la vacuna además del polipéptido TRAP. Un experto en la materia apreciará que el polipéptido CD154 podría usarse para mejorar la respuesta inmunitaria a más de un polipéptido antigénico presente en una vacuna.

65 El polipéptido del CD 154 estimula una respuesta inmunitaria al menos en parte al unirse a su receptor, CD40. Los ejemplos usaron un polipéptido homólogo al polipéptido CD154 que se expresa en las células inmunes del sujeto y que es capaz de unirse al receptor CD40 en los macrófagos y otras células presentadoras de antígeno. La unión de este complejo ligando-receptor estimula a los macrófagos (y las células de linaje de macrófagos, tales como las células dendríticas) para mejorar la fagocitosis y la presentación de antígenos, al tiempo que aumenta las

secreciones de citocinas que se sabe que activan otras células inmunes locales (tales como los linfocitos B). Como tales, las moléculas asociadas al péptido CD154 son, preferentemente, las dianas de la respuesta inmunitaria y la producción expandida de anticuerpos.

- 5 Los vectores potenciales para su uso en los métodos incluyen, aunque sin limitación, *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*), *Shigella*, *Escherichia* (*E. coli*), *Yersinia*, *Bordetella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Vibrio* (*Vibrio cholerae*), *Listeria*, adenovirus, *poxvirus*, herpesvirus, alfavirus y virus adenoasociados.

Además, se desvelan métodos para mejorar la respuesta inmunitaria contra un parásito apicomplejo y métodos para reducir la morbilidad asociada a la infección posterior con un parásito apicomplejo. Brevemente, los métodos comprenden administrar a un sujeto una vacuna que comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido TRAP en una cantidad efectiva. Los polipéptidos TRAP pueden incluir las SEQ ID NO: 1-3 y 11. La inserción de los polipéptidos TRAP en el vector se puede lograr de varias maneras conocidas por los expertos en la materia, incluidos, aunque sin limitación, el sistema de mutación dirigido al sitio sin cicatrices descrito en BMC Biotechnol. 2007 sept, 17: 7(1): 59, Mutagénesis sin cicatrices y dirigida al sitio en el cromosoma de *Salmonella enteritidis*. El vector también se puede diseñar para expresar los polipéptidos TRAP junto con otros polipéptidos capaces de mejorar la respuesta inmunitaria como se ha tratado anteriormente, tal como en la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO:10. En particular, un polipéptido de CD154 capaz de unirse a CD40 puede ser expresado por el vector para mejorar la respuesta inmunitaria del sujeto al polipéptido TRAP. Opcionalmente, el vector es una bacteria, ta como *Salmonella enteritidis*.

La dosis útil de la vacuna a administrar variará según la edad, el peso y la especie del sujeto, el modo y la vía de administración y el tipo de patógeno contra el cual se busca una respuesta inmunitaria. La composición puede administrarse en cualquier dosis suficiente para provocar una respuesta inmunitaria. Para vacunas bacterianas, se prevé que las dosis que varían  $10^3$  to  $10^{10}$  bacteria, de  $10^4$  a  $10^9$  bacterias o de  $10^5$  a  $10^7$  bacterias son adecuadas. 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 o por tres o más semanas. Las bacterias son adecuadamente viables antes de la administración, pero, en algunas realizaciones, las bacterias pueden ser eliminadas antes de la administración. En algunas realizaciones, las bacterias pueden replicarse en el sujeto, mientras que en otras realizaciones, las bacterias pueden no ser capaces de replicarse en el sujeto.

Para la administración a animales o seres humanos, las composiciones pueden administrarse por diversos medios, que incluyen, aunque no de forma limitativa, por vía intranasal, mucosal, por pulverización, intradérmica, parenteral, subcutánea, oral, por aerosol o por vía intramuscular. La administración por medio de gotas oculares o la adición de agua potable o alimentos también son adecuadas. Para pollos, las composiciones pueden administrarse *in ovo*.

Algunas realizaciones de esta divulgación proporcionan métodos para mejorar las respuestas inmunitarias en un sujeto. Los sujetos adecuados pueden incluir, aunque sin limitación, vertebrados, adecuadamente mamíferos, adecuadamente un ser humano, y pájaros, adecuadamente aves de corral, tales como pollos. También se pueden usar otros modelos animales de infección. Mejorar una respuesta inmunitaria incluye, aunque no de forma limitativa, inducir un efecto terapéutico o profiláctico que es mediado por el sistema inmune del sujeto. Específicamente, mejorar una respuesta inmunitaria puede incluir, aunque no de forma limitativa, la producción mejorada de anticuerpos, un cambio de clase mejorado de cadenas pesadas de anticuerpos, la maduración de las células presentadoras de antígeno, la estimulación de linfocitos T auxiliares, la estimulación de linfocitos T citolíticos o la inducción linfocitos T y B de memoria.

Se prevé que varios epítomos o antígenos de los mismos o diferentes patógenos se puedan administrar en combinación en una sola vacuna para generar una respuesta inmunitaria mejorada contra múltiples antígenos. Las vacunas recombinantes pueden codificar antígenos de múltiples microorganismos patogénicos, virus o antígenos asociados a tumores. La administración de una 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, tales como *Salmonella enteritidis* 13A, proporcionan un vector adecuado para provocar una respuesta inmunitaria contra múltiples antígenos.

Las vacunas bacterianas pueden construirse usando polinucleótidos exógenos que codifican antígenos que pueden insertarse en el genoma bacteriano en cualquier sitio no esencial o alternativamente pueden transportarse en un plásmido 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. Un ejemplo de una proteína transmembrana adecuada para la inserción de polinucleótidos es el gen *lamB*. En los ejemplos, los polinucleótidos TRAP y CD154 se insertaron en el bucle 9 de la secuencia de *lamB*.

Los polinucleótidos exógenos incluyen, aunque sin limitación, polinucleótidos que codifican antígenos seleccionados de microorganismos o virus patogénicos e incluyen polinucleótidos que se expresan de tal manera que se genera una respuesta inmunitaria efectiva. Dichos polinucleótidos pueden derivarse de virus patogénicos, tales como la

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

Los polinucleótidos que codifican polipéptidos implicados en la activación del sistema inmunológico también pueden incluirse en un vector, tal como una vacuna viva atenuada de *Salmonella*. Los polinucleótidos pueden codificar moléculas del sistema inmunitario conocidas por sus efectos estimulantes, tales como una interleucina, el factor de necrosis tumoral, un interferón 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 el polipéptido CD154 descrito en el presente documento.

Los siguientes ejemplos pretenden ser solo ilustrativos y no pretenden ser limitaciones del alcance de la invención o de las reivindicaciones adjuntas.

## EJEMPLOS

### 20 Ejemplo 1. Construcción de insertos TRAP y TRAP/CD154.

#### Cepas y condiciones de cultivo

Todos los plásmidos se mantuvieron primero en células *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) a menos que se describa lo contrario. Se usó *Salmonella enteritidis* 13A para la introducción de mutaciones. La cepa 13A de *Salmonella enteritidis* era un aislado de campo disponible de USDA/APHIS/NVSL y se depositó en la ATCC como número de depósito PTA-7871. Las bacterias portadoras del plásmido pKD46 se cultivaron a 30 °C. Se cultivaron otras bacterias a 37 °C. El curado del plásmido se realizó a 37 °C.

Los medios de Luria-Bertani (LB) se usaron para el crecimiento de rutina de las células y se usó medio SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) para la expresión fenotípica después de la electroporación. Cuando sea adecuado, se añadieron los siguientes antibióticos al medio: ampicilina (Amp) a 100 µg/ml, kanamicina (Km) a 50 µg/ml y cloranfenicol (Cm) a 25 µg/ml.

#### 35 Plásmidos

Los plásmidos pKD46, pKD13 y pBC-I-SceI se han descrito previamente (Datsenko y Wanner, PNAS 2000, 97:6640-6645 y Kang et al., J Bacteriol 2004, 186:4921-4930). El plásmido pKD46 codifica enzimas recombinasas Red que median la recombinación homóloga del ADN lineal entrante con el ADN cromosómico. Este plásmido también contiene el gen de resistencia a la ampicilina y es sensible a la temperatura, por lo que requiere 30 °C para el mantenimiento en la célula. El plásmido pKD13 sirvió como molde para la amplificación del gen de resistencia a Km (Km<sup>r</sup>) utilizado en la PCR solapante. El plásmido pBC-I-SceI, que se mantiene en la célula a 37 °C, produce la enzima I-SceI, que fragmenta la siguiente secuencia de reconocimiento rara de 18 pares de bases: 5'-TAGGGATAACAGGGTAAT-3' (SEQ ID NO:16). El plásmido pBC-I-SceI también contiene el gen de resistencia al cloranfenicol (Cm<sup>r</sup>).

#### PCR

Todos los cebadores utilizados para la PCR se enumeran en la Tabla 1. Por lo general, la PCR se realizó utilizando aproximadamente 0,1 µg de plásmido genómico purificado o ADN generado por PCR (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.), 1x tampón de polimerasa clonado en *Pfu*, 5U de *Pfu* polimerasa (Stratagene La Jolla, CA, EE.UU.), dNTP 1 mM (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ) y 1,2 µM de cada cebador en un volumen total de 50 µl. El termociclador del motor de ADN (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) Se utilizó con las siguientes condiciones de amplificación: 94 °C durante 2 minutos; 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 58 °C durante 60 segundos, 72 °C durante 90 segundos por 1 kb; y 72 °C durante 10 minutos para la extensión final. Cada producto de PCR se purificó en gel (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) y eluyeron en 25 µl de tampón EB para la preparación de moldes utilizados en la PCR de extensión solapante o en 50 µl de tampón EB, precipitaron en etanol y se suspendieron en 5 µl de ddH<sub>2</sub>O para la electroporación en *S. enteritidis*.

Tabla 1. Secuencias del cebador

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

(continuación)

Cebador	Región amplificada	Secuencia del cebador
lam-abajo-f lam-abajo-r	bucle 9 abajo	5' <i>ATTTC</i> CGTTATGCCGCAGC 3' (SEQ ID NO:19) 5'GTAAACAGAGGGCGACGAG 3' (SEQ ID NO:20)
Km-f Km-r	I-SceI/gen de Km <sup>r</sup>	5' <i>GCTATATCAAAGACGGCGATAACTAACTATAACGGTCTCTAAGGT</i> <b>AGCGAATTTCCGGGGATCCGTCGA</b> 3' (SEQ ID NO:21) 5' <i>GCTGCGGCATAACGGGAAA</i> TTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3' (SEQ ID NO:22)
Kan4f Kan4r	dentro del gen de Km <sup>r</sup> : secuenciación	5'CAAAGCGCTCTGAAGTTCC 3' (SEQ ID NO:23) 5'GCGTGAGGGGATCTTGAAGT 3' (SEQ ID NO:24)
SEQ1 hCD154 arriba inversa	SEQ1 hCD154/bucle 9 arriba	5'GGAGGACGCAACCGCCGCGGTCGGAAAAACCACCACCGGAGGA GGAGTTATCGCCGTCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID NO:25)
SEQ1hCD 154 abajo directa	SEQ1hCD154/bucle 9 abajo	5'CCGCGGCGGTTGCGTCCTCCTCCTGGGCAGAAAAAGGTTATTAT ACCATGTCTTCTCCTCCATTTCCGTTATGCCGCAGC3' (SEQ ID NO:26)
SEQ2 hCD154 arriba inversa	SEQ2-hCD 154/bucle 9 arriba	5'TTTTCTTCTTCTTCTTCCGGTTCCGGACGTTTCATGACCTTCTTCGG CTTTCGGCTGAACCGCCGGGTTTCCGGCGCCGCGGAGGAG TTATCGCCGCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID NO:27)
SEQ2 hCD154 arriba inversa	SEQ2- hCD154/bucle 9 abajo	5'ACCGGAAGAAGAAGAAGAAAAAAGAAGAAGGTGGTGGTTT TCCGACCGCGCGGTTGCGTCCTCCTCCTGGGCAGAAAAAGGTTA TTATACCATGTCTTCTCCTCCATTTCCGTTATGCCGCAGC3' (SEQ ID NO:28)
SEQ3 Hcd154 arriba inversa	SEQ3 hCD154/bucle 9 arriba	5'GCAACACCACCACCAACCGCCGCGATCAGCAGAACACCACCAA CACCACCGCAACCGCCGCGGTCGGAAAAACCACCACCGGAGGAG GAGTTATCGCCGCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID NO:29)
SEQ3 hCD154 arriba inversa	SEQ3-hCD 154/bucle 9 abajo	5'GGCGGTTGGTGGTGGTGGTGGCGCGTTTACCTCCGGTGGTGGT GTGCGGTTGCGCAGGAATCCTCCTCCTGGGCAGAAAAAGGTTAT TATACCATGTCTTCTCCTCCATTTCCGTTATGCCGCAGC3' (SEQ ID NO:30)
lam 3f lam 3r	regiones externas del bucle 9: secuenciación	5'GCCATCTCGCTTGGTGATAA 3' (SEQ ID NO:31) 5'CGCTGGTATTTGCGGTACA 3' (SEQ ID NO:32)

En la Tabla 1, los nucleótidos en cursiva son complementarios a ambos lados del sitio de inserción del bucle 9 del gen *lamB*, que corresponde al nucleótido 1257 usando *S. typhimurium* como genoma de referencia anotado. Los nucleótidos en negrita representan el sitio de reconocimiento para I-SceI en el cebador de Km-f.

### Electroporación

La transformación de pKD46 en *S. enteritidis* fue el primer paso llevado a cabo para que las enzimas recombinasas Red pudieran usarse para participar en la recombinación de mutaciones posteriores. El plásmido pKD46 se cosechó de *E. coli* BW25113 (Datsenko y Wanner, PNAS 2000, 97:6640-6645) utilizando un kit de preparación de plásmidos (Qiagen Valencia, CA, EE.UU.). A continuación, se usaron 0,5 µl de ADN de pKD46 para la transformación en *S. enteritidis* 13A que se había preparado para la electroporación. (Datsenko y Wanner, PNAS 2000, 97:6640-6645). Brevemente, Las células se inocularon en 10-15 ml de caldo 2X YT y se cultivaron a 37 °C durante la noche. Luego, se volvieron a inocular 100 µl de cultivo durante la noche en 10 ml de caldo 2X YT recién preparado a 37 °C durante 3-4 horas. Las células a transformar con el plásmido pKD46 se calentaron a 50 °C durante 25 minutos para ayudar a inactivar la restricción del huésped. Las células se lavaron cinco veces en agua ddH<sub>2</sub>O y se resuspendieron en 60 µl de glicerol al 10 %. A continuación, se aplicaron a las células pulsos de 2400-2450 kV durante 1-6 ms, se incubaron en SOC durante 2-3 horas a 30 °C y se sembraron en medio LB con antibióticos apropiados. Los transformantes de *S. enteritidis* con pKD46 se mantuvieron a 30 °C. Cuando estos transformantes se prepararon para reacciones de electroporación adicionales, todas las etapas fueron iguales, excepto que se añadió arabinosa al 15 % para inducir enzimas recombinasas Red una hora antes del lavado, y las células no se sometieron a la etapa de calentamiento a 50 °C.

### 25 Construcción de Bucle 9 arriba-I-SceI/Km<sup>r</sup>-Bucle 9 abajo



La introducción del sitio de reconocimiento de la enzima I-SceI junto con el gen de Km<sup>r</sup> en el bucle 9 del gen *lamB* se realizó combinando el sistema de recombinasa Red (Datsenko y Wanner, PNAS 2000, 97:6640-6645) y PCR solapante (Horton et al., BioTechniques 1990, 8:528-535). El sitio de inserción corresponde al nucleótido 1257 del gen *lamB* usando *Salmonella typhimurium* LT2 (*S. typhimurium*) como genoma de referencia anotado. En primer lugar, las regiones aguas arriba y aguas abajo que flanquean inmediatamente el sitio de inserción del bucle 9 (bucle 9 hacia arriba y bucle 9 abajo, respectivamente) se amplificaron por separado. Los cebadores utilizados fueron lam-arriba-f y lam-arriba-r para el bucle 9 arriba y lam-abajo-f y lam-abajo-r para el bucle 9 abajo. A continuación, el gen de Km<sup>r</sup> del plásmido pKD13 se amplificó usando los cebadores Km-f y Km-r. En este caso, el sitio para la enzima I-SceI se añadió sintéticamente al extremo 5' del cebador Km-f, después se precedió por una región complementaria al cebador bucle-arriba-r. De manera análoga, una región complementaria al cebador bucle-abajo-f se añadió al extremo 5' del cebador Km-r. Las regiones complementarias permiten que los 3 productos de PCR hibriden cuando se usan como moldes en una reacción de PCR. La figura 2a representa este esquema de diseño. Los fragmentos de PCR que consisten en la secuencia del bucle 9 arriba-I-SceI/Km<sup>r</sup>-bucle 9 abajo (PCR-A) se electroporaron en células de *S. enteritidis*, que albergaban pKD46 y se indujeron con arabinosa, y, a continuación, se sembraron en placas con LB con Km. Para verificar la orientación correcta de la secuencia de la mutación, los inventores realizaron PCR de las colonias con los pares de cebadores Kan4F/lam3f y Kan4R/lam3r, donde Kan4F y Kan4R son cebadores específicos del gen Km<sup>r</sup> y lam3f y lam3r son cebadores localizados fuera de la región del bucle 9 de *lamB*. Estos fragmentos de PCR se purificaron en gel (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) y se utilizaron para la secuenciación del ADN.

### Construcción de Bucle 9 arriba-TRAP-CD154-Bucle 9 abajo

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

Para acortar la cantidad de etapas para la construcción del siguiente fragmento, la secuencia TRAP-CD154 se añadió sintéticamente al extremo 5' del cebador lam-abajo-f y fue precedida por la región complementaria al cebador bucle-arriba-r. El producto de PCR utilizado anteriormente para el bucle 9 hacia arriba podría usarse junto con el producto de PCR recién construido en el que se incorporaron los TRAP-CD154 en el extremo 5' del bucle 9 hacia abajo para realizar la reacción de PCR final. Sin embargo, para otras secuencias de inserción, se necesitaba una etapa de PCR adicional, debido a la mayor longitud de las secuencias de inserción, para amplificar el bucle 9 hacia arriba con nucleótidos añadidos específicos para secuencias de inserción conectadas al cebador de bucle-arriba-r. La secuencia de codificación para Gly (GGT) y Serina (TCC), así como todos los demás aminoácidos, se eligieron basándose en datos recopilados de los codones utilizados con más frecuencia en las proteínas de *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. Véase la Tabla 1 para obtener más detalles sobre el diseño del cebador.

### Mutación de inserción en el sitio I-SceI/Km<sup>r</sup>

La primera etapa de mutación consistió en diseñar un fragmento de PCR, PCR-A, que serviría como el portador del casete del sitio I-SceI/Km<sup>r</sup> para su inserción en el sitio *lamB*. La PCR-A consistió en el sitio de reconocimiento de la enzima I-SceI adyacente al gen Km<sup>r</sup> con aproximadamente 200-300 pb de ADN flanqueante en cada extremo homólogo a las regiones aguas arriba y aguas abajo del sitio de inserción del bucle 9 de *lamB* (bucle 9 hacia arriba y bucle 9 hacia abajo, respectivamente). El fragmento se introdujo en células de *S. enteritidis* que expresaban enzimas recombinasas Red y se seleccionaron las colonias Km<sup>r</sup>. Tras la selección de unas pocas colonias mediante PCR de las colonias, se secuenciaron los clones positivos para detectar la secuencia del sitio I-SceI/Km<sup>r</sup> insertada deseada y se seleccionó el mutante identificado y se designó como SE164.

### Sustitución genómica de I-SceI/Km<sup>r</sup> con TRAP-CD154

La segunda etapa de mutación requirió construir un fragmento de PCR, denominado PCR-B y mostrado en la Figura 2B, que consiste en la secuencia de inserción final, los TRAP-CD154, flanqueados por fragmentos homólogos de *lamB*. Los amplicones de PCR-B no tienen marcador de selección y deben ser contraseleccionados después de la sustitución para la mutación anterior sitio I-SceI/Km<sup>r</sup> en SE164. El plásmido pBC-I-SceI codifica el gen Cm<sup>r</sup> y la enzima I-SceI, que cortará el genoma en el sitio I-SceI de SE164. Por tanto, se realizó la electroporación de pBC-I-SceI en SE164 junto con PCR-B. Después de la recombinación de PCR-B para reemplazar PCR-A, los clones positivos se eligieron en función de la capacidad de crecer en Cm pero no en Km. Después de la secuenciación del ADN de los mutantes para confirmar la recombinación exitosa de PCR-B, las cepas se denominaron Secuencia 1, Secuencia 2 y Secuencia 3. Se usaron diez clones aleatorios para cada una de las inserciones de TRAP-CD154 para PCR con lam 3f y lam 3r y luego se digirieron usando sitios únicos de enzimas de restricción para cada secuencia de inserción y el 100 % de los clones analizados mediante digestión fueron positivos para la secuencia de mutación deseada. Los resultados de la secuenciación demostraron que la inserción de TRAP-CD154 fue exactamente en la región del bucle 9 sin la adición de nucleótidos extraños en cada caso. Los insertos de las vacunas TRAP-CD 154 son los siguientes: TRAP-CD154 (SEQ ID NO:33); TRAP-US-CD154 (SEQ ID NO:34); TRAP-DS-CD154 (SEQ ID NO:35).

**Ejemplo 2. Atenuación de mutantes/insertos TRAP-CD154.**

- 5 La atenuación de SE13A se logró mediante la mutación por delección del gen *aroA* y/o el gen *htrA*. La mutación del gen *aroA*, un gen clave en la vía del ácido corísmico de las bacterias, da como resultado una deficiencia metabólica severa que afecta a siete vías bioquímicas separadas. La mutación del gen *htrA* reduce la capacidad de la célula para soportar la exposición a bajas y altas temperaturas, pH bajo y agentes oxidativos y dañinos para el ADN y reduce la virulencia de las bacterias.
- 10 Para lograr mutaciones de delección en SE13A, la secuencia del gen diana en el genoma bacteriano de *S. enteritidis* se reemplazó con la secuencia del gen resistente a Km. Esto se completó usando una PCR de extensión solapante y electroporación de los productos de PCR como se ha descrito anteriormente. El gen de resistencia a Km se dirigió a la región genómica que contenía los genes de interés (*aroA* o *htrA*) flanqueando el gen de resistencia a Km con 200-300 pares de bases de secuencias homólogas a los genes de interés. Una vez que se obtuvieron mutantes resistentes a Km, las mutaciones de delección *aroA* y *htrA* se confirmaron mediante secuenciación del ADN. Las cepas de *Salmonella aroA* y *htrA* análogas se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 13 de septiembre de 2006 (n.º de depósito PTA-7872 y n.º de depósito PTA-7873, respectivamente). Las cepas atenuadas se analizaron previamente *in vivo* con respecto al tiempo de eliminación. Ambas cepas atenuadas tuvieron tiempos de eliminación más rápidos que la cepa 13A de tipo salvaje, pero ambas podían colonizar el hígado, el bazo y las amígdalas cecales de los pollos después de infección oral. Se aislaron cepas atenuadas que comprendían TRAP-CD154 y que carecían tanto de *aroA* como de *htrA*.

**Ejemplo 3. Protección de polluelos frente a la mortalidad después de la infección por *Eimeria***

- 25 Los polluelos del día de la eclosión (n = 280) se vacunaron por vía oral con aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc de los aislados de *Salmonella* que comprenden los tres polinucleótidos distintos que codifican los polipéptidos TRAP de SEQ ID NO: 1-3 o control salino. A los 21 días de edad, los polluelos fueron expuestos oralmente a  $10^4$  oocistos esporulados de *Eimeria maxima*. Se realizó un seguimiento diario de los polluelos después de la exposición. Tal como se representa en la figura 3, la mortalidad de los polluelos el día 5 después de la exposición se redujo en comparación con los animales no vacunados, independientemente de la cepa de vacuna administrada. La mortalidad fue la siguiente: TRAP (SEQ ID NO:1) 7/43 (16,3 %); TRAP US (SEQ ID NO:2) 1/46 (2,2 %); TRAP DS (SEQ ID NO:3) 6/43 (11 %); Control (no vacunados) 10/46 (21,7 %). De manera sorprendente, los polluelos vacunados con *Salmonella* que comprende el polipéptido TRAP de la SEQ ID NO: 2 demostraron una mortalidad marcada y significativamente reducida en comparación con los polluelos no vacunados de control (P <0,001). Se realizó la necropsia e indicó que toda la mortalidad estaba relacionada con la infección por *Eimeria maxima*.

En un experimento repetido, la mortalidad en el ave vacunada (6/48) fue significativamente menor que en los controles (17/50) y el rendimiento fue mejor en los polluelos vacunados, pero la diferencia no fue significativa.

- 40 Además, se recogió suero de aves inmunizadas y se realizó un ELISA para TRAP. Se generó una robusta respuesta de anticuerpo específica de TRAP en las aves vacunadas con TRAP-US (SEQ ID NO: 2).

**Ejemplo 4. La morbilidad asociada a la vacunación es limitada**

- 45 Para evaluar la eficacia de TRAP US-CD154 (SEQ ID NO: 34) como posible candidato a vacuna, se realizó un estudio similar para investigar la morbilidad asociada a la vacunación. Los pollos de engorde se vacunaron por vía oral con  $1 \times 10^8$  ufc/ave de la vacuna de *Salmonella* con TRAP US y el inserto CD154 (SEQ ID NO: 34) o se vacunaron de forma simulada con solución salina. La exposición a coccidios se realizó con oocistos esporulados de *Eimeria maxima* ( $10^5$  oocistos esporulados/ave) a las tres semanas de la vacunación. El aumento de peso corporal y las lesiones se evaluaron 7 días después de la exposición. Las aves inmunizadas mostraron una mejora significativa (p <0,01) en el rendimiento. Las aves inmunizadas tuvieron un aumento de peso de aproximadamente el 31 % en comparación con los controles no vacunados. Por consiguiente, la vacunación con una vacuna a base de *Salmonella* que comprende un polipéptido TRAP y un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40 puede proteger a las aves de la morbilidad y mortalidad asociadas a la infección por *Eimeria*.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 60 <110> The Board of Trustees of the University of Arkansas The Texas A&M University System University of Guelph
- <120> Composiciones y métodos para mejorar las respuestas inmunitarias a *Eimeria*
- <130> SMK/FP6700603
- 65 <140> EP 08843740.5
- <141> 03/11/2008

ES 2 761 693 T3

<150> PCT/US2008/082254  
 <151> 03/11/2008

5 <150> US 60/984.612  
 <151> 01/11/2007

<160> 35

10 <170> PatentIn versión 3.5  
 6

<210> 1  
 <211> 10  
 15 <212> PRT  
 <213> *Eimeria maxima*

<400> 1

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

20

<210> 2  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 25 <213> *Eimeria maxima*

<400> 2

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

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

Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala  
 35 40

30

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

35 <400> 3

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

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

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gln Glu  
 35 40

40

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

ES 2 761 693 T3

<400> 4

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

ES 2 761 693 T3

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

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

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

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

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

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

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

35 <210> 8  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus sp.  
  
<400> 8

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

ES 2 761 693 T3

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

5 <400> 9

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

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

15 <400> 10

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

ES 2 761 693 T3

				165						170					175
Lys	Ala	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Ser	Phe	Cys	Thr	Lys
			180					185					190		
Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Pro
			195				200					205			
Met	Glu	Glu	Asp	Arg	Leu	Leu	Met	Lys	Gly	Leu	Asp	Thr	His	Ser	Thr
	210					215					220				
Ser	Thr	Ala	Leu	Cys	Glu	Leu	Gln	Ser	Ile	Arg	Glu	Gly	Gly	Val	Phe
225					230					235					240
Glu	Leu	Arg	Gln	Gly	Asp	Met	Val	Phe	Val	Asn	Val	Thr	Asp	Ser	Thr
				245					250					255	
Ala	Val	Asn	Val	Asn	Pro	Gly	Asn	Thr	Tyr	Phe	Gly	Met	Phe	Lys	Leu
			260					265					270		

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

5

<400> 11

Ala	Ala	Pro	Glu	Thr	Pro	Ala	Val	Gln	Pro	Lys	Pro	Glu	Glu	Gly	His
1				5					10					15	
Glu	Arg	Pro	Glu	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	Lys	Glu	Glu	Gly	Gly
			20					25					30		
Gly	Phe	Pro	Thr	Ala	Ala	Val	Ala	Gly	Gly	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Leu
			35				40					45			
Ile	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Phe	Thr	Ser	Gly	Gly	Gly
	50					55					60				

Gly Ala Gly Ala Gln Glu  
 65 70

10

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

15

<400> 12  
 ggtggtggtt ttccgaccgc ggcggtgcg 30

20

<210> 13  
 <211> 120

ES 2 761 693 T3

<212> ADN  
 <213> *Eimeria maxima*

<400> 13

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

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

<400> 14

10           ggtggtggtt ttccgaccgc ggcggttgcg ggtggtggtg gtggtggttct gctgatcgcg           60  
               gcggttgggtg gtggtggttgc ggcggttacc tccggtggtg gtggtgctggg tgcgcaggaa           120

15

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

20           <400> 15

              gcggcgccgg aaaccccggc gggtcagccg aaagccgaag aaggatcatga acgtccggaa           60  
               ccggaagaag aagaagaaaa aaaagaagaa ggtggtggtt ttccgaccgc ggcggttgcg           120  
               ggtggtggtg gtggtggttct gctgatcgcg gcggtggtg gtggtggttgc ggcggttacc           180  
               tccggtggtg gtggtgctggg tgcgcaggaa   210

25

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

30           <220>  
 <223> Secuencia de reconocimiento de la enzima I-SceI

<400> 16

35           tagggataac aggtaat   18

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

40

<220>  
 <223> bucle 9 arriba

<400> 17

45           tgtacaagtg gacccaat   20

<210> 18  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> bucle 9 arriba

55



ES 2 761 693 T3

	<400> 18 gttatcgccg tctttgatat agcc	24	
5	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> bucle 9 abajo		
	<400> 19 atttcccggt atgccgcagc	20	
15	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> bucle 9 abajo		
25	<400> 20 gttaaacaga gggcgacgag	20	
30	<210> 21 <211> 68 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> I-Scel/gen de Kmr		
35	<400> 21  gctatatcaa agacggcgat aactaactat aacggtccta aggtagcgaa tttccgggga  tccgtcga	60  68	
40	<210> 22 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> I-Scel/gen de Kmr		
	<400> 22 gctgcgcat aacgggaaat tgtaggctgg agctgctcg	40	
50	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> dentro del gen Kmr: secuenciación		
	<400> 23 caaaagcgct ctgaagtcc	20	
60	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		

ES 2 761 693 T3

<220>  
 <223> dentro del gen Kmr: secuenciación

<400> 24  
 5 gcgtgagggg atctgaagt 20

<210> 25  
 <211> 69  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial

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

15 <400> 25

ggaggacgca accgccgagg tcggaaaacc accaccggag gaggagttat cgccgtcttt 60  
 gatatagcc 69

<210> 26  
 <211> 82  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> SEQ1hCD154/bucle 9 abajo

25 <400> 26

ccggggcggg tgcgtcctcc tcctgggcag aaaaagggtta ttataccatg tcttcctcct 60  
 ccatttcccg ttatgcgcga gc 82

30

<210> 27  
 <211> 113  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial

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

40 <400> 27

ttttcttctt cttcttcagg ttccggacgt tcatgacctt cttcggcttt cggetgaacc 60  
 gccgggggtt ccggcgccgc ggaggaggag ttatcgccgt ctttgatata gcc 113

<210> 28  
 <211> 129  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> SEQ2-hCD154/bucle 9 abajo

50 <400> 28

accggaagaa gaagaagaaa aaaaagaaga aggtggtggt tttccgaccg cggcggttgc 60  
 gtcctcctcc tgggcagaaa aaggttatta taccatgtct tcctcctcca tttcccgtta 120  
 tgccgcagc 129

ES 2 761 693 T3

<210> 29  
 <211> 113  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> SEQ3 hCD154/bucle 9 arriba  
 <400> 29  
 10           gcaacaccac caccaaccgc cgcgatcagc agaacaccac caacaccacc cgcaaccgcc           60  
              gcggtcggaa aaccaccacc ggaggaggag ttatcgccgt ctttgatata gcc           113  
 <210> 30  
 <211> 129  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> SEQ3-hCD154/bucle 9 abajo  
 20  
 <400> 30  
              ggcggttggt ggtggtggtg cggcgtttac ctccggtggt ggtggtgcgg gtgcgcagga           60  
              atcctcctcc tgggcagaaa aaggttatta taccatgtct tcctcctcca tttcccgtta           120  
              tgccgcagc   129  
 25     <210> 31  
        <211> 20  
        <212> ADN  
        <213> Secuencia artificial  
 30     <220>  
        <223> regiones externas del bucle 9: secuenciación  
        <400> 31  
        gccatctcgc ttggtgataa   20  
 35  
        <210> 32  
        <211> 20  
        <212> ADN  
        <213> Secuencia artificial  
 40     <220>  
        <223> regiones externas del bucle 9: secuenciación  
        <400> 32  
        cgctgtatt ttgcgtaca   20  
 45  
        <210> 33  
        <211> 87  
        <212> ADN  
        <213> Secuencia artificial  
 50     <220>  
        <223> TRAP-CD154  
 55     <400> 33  
              tcctcctccg gtggtggttt tccgaccgag gcggttgcgt cctcctcctg ggcagaaaaa           60  
              ggttattata ccatgtcttc ctccctcc   87

ES 2 761 693 T3

5 <210> 34  
<211> 177  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> TRAP-US-CD154

10 <400> 34

tcctcctccg cggcgccgga aaccccgggc gttcagccga aagccgaaga aggtcatgaa 60  
cgtccggaac cggagaaga agaagaaaa aaagaagaag gtggtggtt tccgaccgcg 120  
gcggttgcgt cctcctcctg ggcagaaaa ggttattata ccatgtcttc ctcctcc 177

15 <210> 35  
<211> 177  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> TRAP-DS-CD154

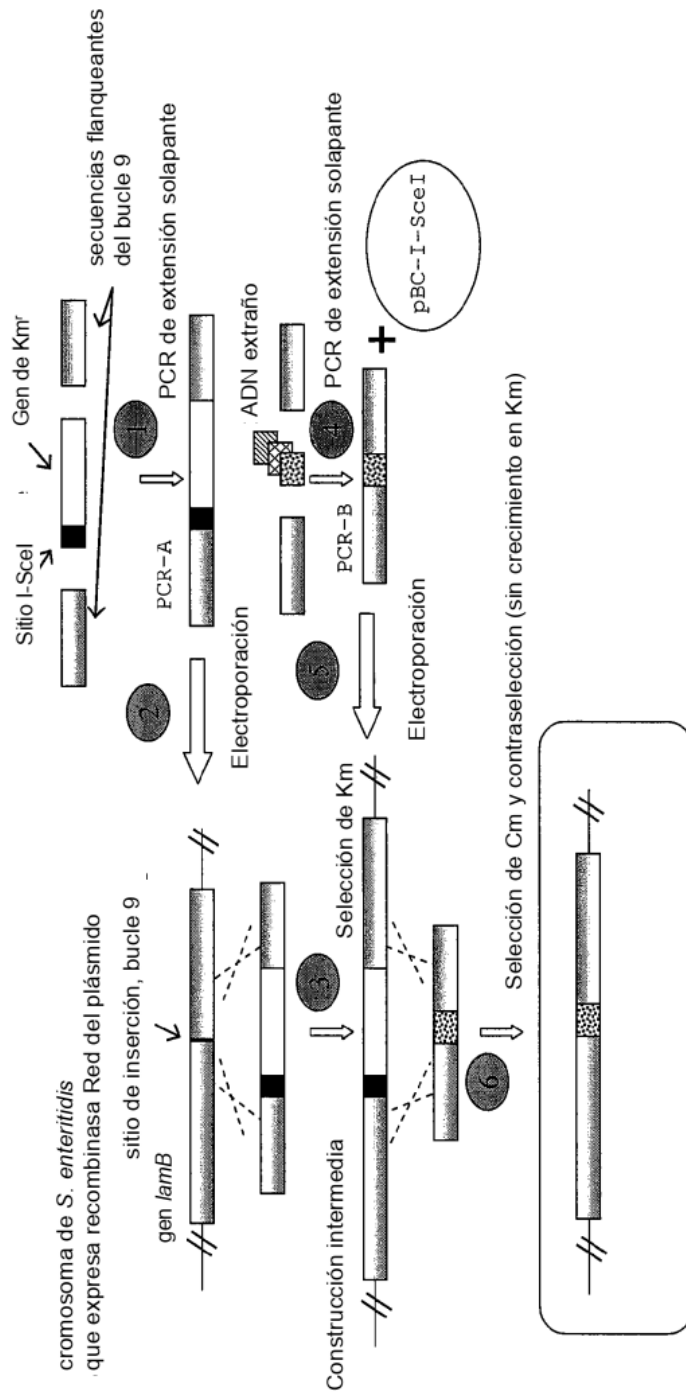
<400> 35

tctcctccg gtggtggtt tccgaccgcg gcggttgcgg gtggtgttg tgggtttctg 60  
ctgatcgcgg cggttggtg tgggttgcg gcgtttacct ccggtggtg tggtgccggt 120  
gcgcaggaat cctcctcctg ggcagaaaa ggttattata ccatgtcttc ctcctcc 177

25

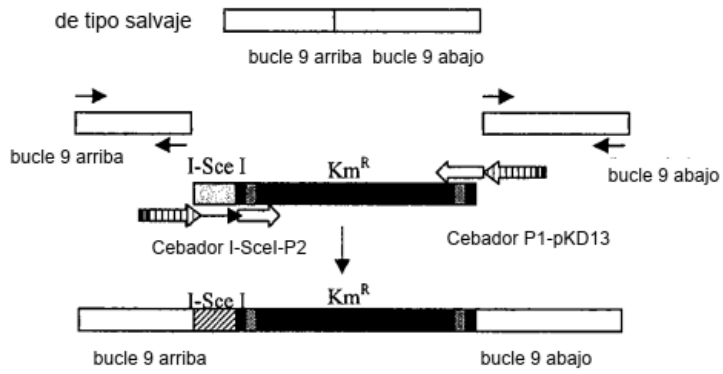
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una vacuna, que comprende una primera secuencia de polinucleótidos, que codifica un polipéptido TRAP o un fragmento inmunogénico del mismo, en donde el primer polinucleótido codifica un polipéptido TRAP, que se selecciona de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, y un fragmento inmunogénico de la SEQ ID NO:3.
- 10 2. La vacuna de la reivindicación 1, que comprende además una segunda secuencia de polinucleótidos, que codifica un polipéptido CD 154 capaz de unirse a CD40, teniendo el polipéptido CD154 menos de 50 aminoácidos y que comprende los aminoácidos 140-149 de la SEQ ID NO:4, de la SEQ ID NO:5, de la SEQ ID NO:6, de la SEQ ID NO:7, de la SEQ ID NO: 8 o de la SEQ ID NO: 9.
- 15 3. La vacuna de la reivindicación 2, en donde la vacuna comprende más de una copia de la primera secuencia de polinucleótidos, más de una copia de la segunda secuencia de polinucleótidos, o más de una copia de la primera secuencia de polinucleótidos y más de una copia de la segunda secuencia de polinucleótidos.
- 20 4. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en la que la primera secuencia de polinucleótidos está unida en marco a la segunda secuencia de polinucleótidos.
- 5 5. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el primer polinucleótido está comprendido dentro de un vector.
- 25 6. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el primer polinucleótido está comprendido dentro de una bacteria, comprendiendo la bacteria el polipéptido TRAP en su superficie.
- 30 7. La vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el primer polinucleótido está comprendido dentro de una bacteria y la bacteria se selecciona del grupo que consiste en especies de *Salmonella*, especies de *Bacillus*, especies de *Escherichia* y especies de *Lactobacillus*.
- 35 8. La vacuna de la reivindicación 7, en la que la bacteria es *Salmonella enteritidis*, seleccionada de cepas depositadas como ATCC PTA-7871, ATCC PTA-7872 y ATCC PTA-7873.
- 40 9. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la primera secuencia de polinucleótidos está insertada en una secuencia de polinucleótidos, que codifica una porción externa de una proteína transmembrana.
- 45 10. Uso de una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en la preparación de un medicamento para mejorar la respuesta inmunitaria contra un parásito de *Eimeria* en un sujeto, comprendiendo la mejora de la respuesta inmunitaria administrar al sujeto la vacuna en una cantidad eficaz para mejorar la respuesta inmunitaria del sujeto al parásito de *Eimeria*.
- 50 11. El uso de la reivindicación 10, en donde la respuesta inmunitaria mejorada comprende una respuesta de anticuerpo mejorada o una respuesta de linfocitos T mejorada.
12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en donde la vacuna no es capaz de replicarse.
13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde el parásito de *Eimeria* es *Eimeria maxima*.
14. Una vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en un método para mejorar la respuesta inmunitaria contra un parásito de *Eimeria* en un ave de corral, comprendiendo el método administrar a las aves de corral la vacuna en una cantidad efectiva para mejorar la respuesta inmunitaria de las aves de corral al parásito de *Eimeria*.



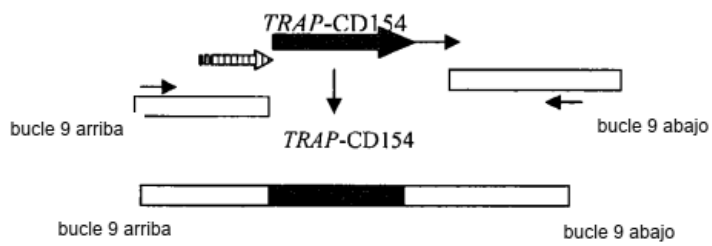
cromosoma de *S. enteritidis* que expresa la secuencia extraña

**FIG. 1**



**PCR-A**

**FIG. 2A**



**PCR-B**

**FIG. 2B**

Mortalidad a los 5 días de la exposición de pollos de engorde expuestos a los 21 días de edad a  $10^4$ /ave de oocistos esporulados de *E. maxima*.

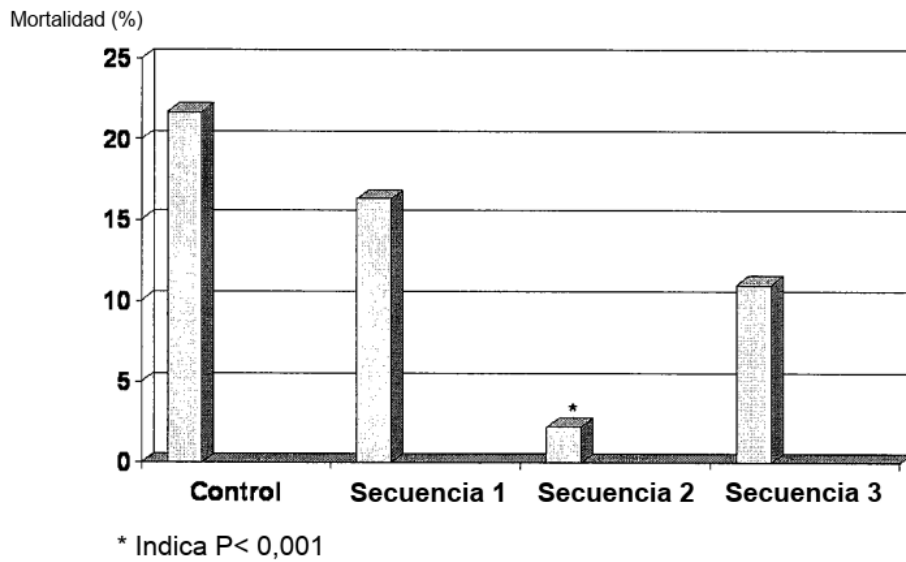


Figura 3. En este experimento, no se vacunó (control) a los polluelos el día de la eclosión o se les vacunó con el vector de *Salmonella* que expresa la Secuencia 1, 2 o 3 de la proteína TRAP de *Eimeria maxima* como se describe en el apéndice. Se expuso a todos los polluelos a exactamente la misma dosis de *Eimeria maxima* el día 21. La necropsia confirmó que toda la mortalidad estaba relacionada con la infección por *Eimeria maxima*. La mortalidad se redujo de forma marcada y significativa en el grupo vacunado con el vector que expresaba la secuencia 2.