



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 968 398**

⑮ Int. Cl.:

A61K 39/002 (2006.01)
A61K 39/012 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2014 E 19194676 (3)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023 EP 3610887**

⑮ Título: **Composiciones y métodos para potenciar las respuestas inmunitarias a Eimeria o limitar la infección por Eimeria**

⑯ Prioridad:

14.02.2013 US 201361764681 P

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.05.2024

⑯ 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%)**

⑯ Inventor/es:

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

⑯ Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 968 398 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 potenciar las respuestas inmunitarias a *Eimeria* o limitar la infección por *Eimeria*

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta

Introducción

10 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.

15 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.

20 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.

25 25 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*.

30 Una vacuna eficaz para *Eimeria* basada en dianas inmunogénicas conservados también puede resultar útil como vacuna contra otros parásitos apicomplexa.

35 Jianhua Li *et al.* describen que la proteína romboide 1 de *Toxoplasma gondii* (TgROMT) es un candidato a vacuna potencial contra la toxoplasmosis. Yingli Liu *et al.* describen la inmunidad protectora inducida por una vacuna de ADN que codifica el romboide contra la provocación homóloga. El documento WO 2009/059298 A2 se refiere a composiciones y métodos para mejorar las respuestas inmunitarias contra *Eimeria*. El documento US 2012/282291 A1 se refiere a vectores de vacunas y a métodos para mejorar las respuestas inmunitarias. Wang Q *et al.* describen la inmunidad protectora de *Mycobacterium bovis* BCG que expresa el gen romboide contra la exposición a *Eimeria tenella*. Jianhua Li *et al.* describen la efectividad de la proteína similar al romboide como una vacuna de subunidad en la inmunidad protectora contra la provocación homóloga. Salvaor Eugenio C. Caoili describe los problemas y los prospectos asociados a la predicción de epítopos de células B para el diseño de vacunas basadas en péptidos.

Sumario

45 45 En un primer aspecto, la invención proporciona un vector de vacuna que comprende 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: 38 y tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con 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 da como resultado pérdida de peso reducida y mortalidad reducida después de la posterior infección por un parásito Apicomplexa.

55 55 En algunas realizaciones, el polipéptido inmunoestimulador es un polipéptido HMGB1, en donde el polipéptido HMGB1 comprende opcionalmente un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15-23, un fragmento de al menos una de SEQ ID NO: 15-23, un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 15-23 y combinaciones de los mismos.

60 60 En algunas realizaciones, el polipéptido inmunoestimulador es un polipéptido CD154 capaz de unirse a CD40, teniendo el polipéptido CD154 menos de 50 aminoácidos y que comprende los aminoácidos 140-149 de SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y en donde el polipéptido CD154 se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en 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 SEQ ID NO: 26-30.

65 65 En algunas realizaciones, el vector comprende más de una copia del primer polinucleótido y/o más de una copia de la segunda secuencia de polinucleótido.

En algunas realizaciones, la primera secuencia de polinucleótido está enlazada en el mismo marco de lectura a la segunda secuencia de polinucleótido y en donde la primera secuencia de polinucleótido y la segunda secuencia de polinucleótido están opcionalmente enlazadas a través de nucleótidos espaciadores.

- 5 En algunas realizaciones, el vector de vacuna se selecciona del 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.*
- 10 En algunas realizaciones, el vector de vacuna 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 SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 40, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 5, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 6, un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 7 y un fragmento inmunogénico de SEQ ID NO: 40.
- 15 En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el vector de vacuna del primer aspecto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 En un tercer aspecto, la invención proporciona el vector de vacuna del primer aspecto o la composición farmacéutica del segundo aspecto 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*. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria potenciada comprende una respuesta de anticuerpos potenciada, una respuesta de células T potenciada o ambas.
- 25 En un cuarto aspecto, la invención proporciona el vector de vacuna del primer aspecto o la composición farmacéutica del segundo aspecto para su uso en un método para reducir la morbilidad asociada a la 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*.
- 30 En algunas realizaciones de acuerdo con el tercer o el cuarto aspectos de la invención, el vector de vacuna se administra por una vía seleccionada del grupo que consiste en oral, mucosal, parenteral, subcutánea, intramuscular, intraocular e *in ovo* y, opcionalmente, en donde 10^4 a 10^9 o 10^5 a 10^7 copias de vector de la vacuna se administran al sujeto.
- 35 En algunas realizaciones de acuerdo con el tercer o el cuarto aspectos de la invención, el sujeto es una especie aviar o un mamífero y se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en un pollo, un pavo, un ser humano, un cerdo o una vaca.
- 40 En algunas realizaciones de acuerdo con el tercer o el cuarto aspectos de la invención, el vector de vacuna se destruye antes de la administración al sujeto o no es capaz de replicarse en el sujeto. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

45 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.
- 50 La Figura 2 es una representación esquemática de las construcciones del vector de vacuna descritas en los Ejemplos.
- 55 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.
- 60 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 (*).
- 65 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

- 5 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.
- 10 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 esporozoitos y los merozoitos 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 zoitos apicomplexa móviles en apoyo de la función esencial de la motilidad.
- 15 20 25 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 esporozoito 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.
- 30 35 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 esporozoito/merozoito.
- 40 45 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.
- 50 Las regiones antigenicas 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*.
- 55 60 65 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, se proporciona un vector de vacuna comprende una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido Romboide de Apicomplexa que consiste en SEQ ID NO: 38 y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 y que comprende además un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimulador que se expresa en la superficie del vector de vacuna, en donde el vector de vacuna efectúa una respuesta inmunitaria contra un parásito Apicomplexa en un sujeto y en donde la respuesta inmunitaria da como resultado pérdida de peso reducida y mortalidad reducida después de la posterior invención con un parásito Apicomplexa.
- 5 10 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 desvelados en el presente documento.
- 15 20 Un gráfico de hidrofilidad 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抗ígenos 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),
- 25 30 *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.
- 35 40 Los polinucleótidos que codifican抗ígenos de polipéptidos Romboides de SEQ ID NO: 1-4, 37-38 o fragmentos de los mismos y otros抗ígenos 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抗ígenos Romboides se insertan en un vector, por ejemplo, un vector bacteriano, de modo que se expresa el polinucleótido.
- 45 50 Los polinucleótidos que codifican los抗ígenos Romboides pueden insertarse en marco en un polinucleótido que codifica una proteína transmembrana. El polinucleótido que codifica el抗ígeno Romboide puede insertarse en la secuencia de polinucleótidos del vector para permitir la expresión del抗ígeno Romboide en la superficie del vector. Por ejemplo, el polinucleótido que codifica el抗ígeno 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, el primer polinucleótido que codifica el polipéptido Romboide puede insertarse en el bucle 9 del gen *lamB* de *Salmonella*.
- 55 60 En otra realización, 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抗ígeno Romboide puede insertarse en un polinucleótido que codifica un polipéptido secretado.
- 65 Los expertos en la materia apreciarán que el polinucleótido que codifica el抗ígeno Romboide podría insertarse en una amplia variedad de polinucleótidos del vector para proporcionar la expresión y presentación del抗ígeno Romboide a las células inmunitarias de un sujeto tratado con la vacuna. El polinucleótido que codifica el抗ígeno 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抗ígenos Romboides desvelados 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 invención. 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 antigenicos distintos puede inducir una respuesta inmunitaria más fuerte.

Los expertos en la materia apreciarán que los polipéptidos antigenicos 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 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, 29:139-162.

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. Adecuadamente, 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 a los polipéptidos HMGB1 de las SEQ ID NO: 15 o 16-23.

5 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 10 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 15 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 20 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 25 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. 30 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.

30 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 35 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.

40 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. 45 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.

50 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.

55 Los polipéptidos antigenicos 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, alfavírus 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 varias formas de atenuar los vectores y los medios para hacerlo.

Al menos una porción del polipéptido inmunoestimulador está presente o se expresa sobre la superficie del vector de vacuna. En algunas realizaciones, al menos una porción del péptido antigénico está presente o se expresa 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-inscripción)).

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 antigenicos 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 antigenico también puede codificar el polipéptido antigenico. El polinucleótido que codifica el polipéptido antigenico 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 antigenico 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 antigenico 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 antigenico y/o el polipéptido inmunoestimulador podría insertarse en una amplia variedad de polinucleótidos de vector de vacuna para proporcionar expresión y presentación del polipéptido antigenico 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 antigenicos e inmunoestimuladores en la superficie de un vector de vacuna. De manera adecuada, los polipéptidos antigenicos 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 antigenicos (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 antigenóico pueden estar codificados por polinucleótidos distintos. Los expertos en la materia apreciarán que se pueden usar varios métodos para obtener la expresión del polipéptido antigenóico y del polipéptido HMGB1 en la superficie del vector de vacuna. 5 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*. 10 De manera adecuada, el vehículo farmacéuticamente aceptable es aceptable para suministro oral, nasal o a la mucosa.

10 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, 15 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.

20 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 25 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 30 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 antigenóico 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 35 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 antigenóico 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 antigenóico 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 40 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, 45 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 antigenóico presente en un 50 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. 55 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 60 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 65

útiles en la aplicación de la invención.

Además, se divultan 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

5 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 opcionalmente expresado sobre la superficie del vector de vacuna, en donde el polipéptido Romboide consiste en SEQ ID NO: 38 y tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 y que comprende además un segundo polinucleótido que codifica un polipéptido inmunoestimulador expresado sobre la superficie del vector de vacuna, en donde el vector efectúa una
10 respuesta inmunitaria contra un parásito Apicomplexa en un sujeto, en donde la respuesta inmunitaria da como resultado una pérdida de peso reducida y mortalidad reducida después de la posterior infección por un parásito Apicomplexa. Los polipéptidos Romboides pueden consistir en SEQ ID NO: 38 y tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2. 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
15 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
20 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
25 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.

30 Para la administración a animales o seres humanos, las composiciones pueden administrarse por varios medios que consisten en administración oral, mucosal, parenteral, subcutánea, intramuscular, intraocular e *in ovo*. 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*.

35 Algunas realizaciones de la invención proporcionan vectores de vacuna o composiciones farmacéuticas para su uso en 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.

40 Algunas realizaciones de la invención proporcionan vectores de vacuna o composiciones farmacéuticas para su uso en 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.

45 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.

50 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.

55 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

60 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*.

5 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.

10 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., 15 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 20 candidatos atractivos para su uso en una vacuna de vector.

25 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.

30 30 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 35 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" 40 pueden significar uno o más de uno a menos que estén específicamente definidos.

45 45 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 50 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

60 60 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

xyI 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.

- 5 El plásmido pNDH10 que contiene la secuencia de vacuna, *fbpB* y el operón *xyI* 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-HMGB1 de conejo.

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

- 20 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 10⁵ ufc/pollito) durante 24 h. A los 21 días de edad, todos los grupos se pesaron y se expusieron con 4x10⁴ 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.

35 [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.

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: 38 y tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con 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 da como resultado pérdida de peso reducida y mortalidad reducida después de la posterior infección por un parásito Apicomplexa.
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 la primera secuencia de polinucleótidos y la segunda secuencia de polinucleótidos están opcionalmente unidas a través 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. Una composición farmacéutica que comprende el vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición farmacéutica de la reivindicación 8 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*.
10. El vector de vacuna o la composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 9, en donde la respuesta inmunitaria potenciada comprende una respuesta de anticuerpos potenciada, una respuesta de linfocitos T potenciada o ambas.
11. El vector de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición farmacéutica de la reivindicación 8 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*.
12. El vector de vacuna o la composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, 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.
13. El vector de vacuna o la composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, 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.

- 5 14. El vector de vacuna o la composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en donde el vector de vacuna se destruye antes de la administración al sujeto o no es capaz de replicarse en el sujeto.

Observaciones:

El documento completo que incluye las Tablas de Referencia y el Listado de Secuencias se puede descargar de la página web de la EPO.

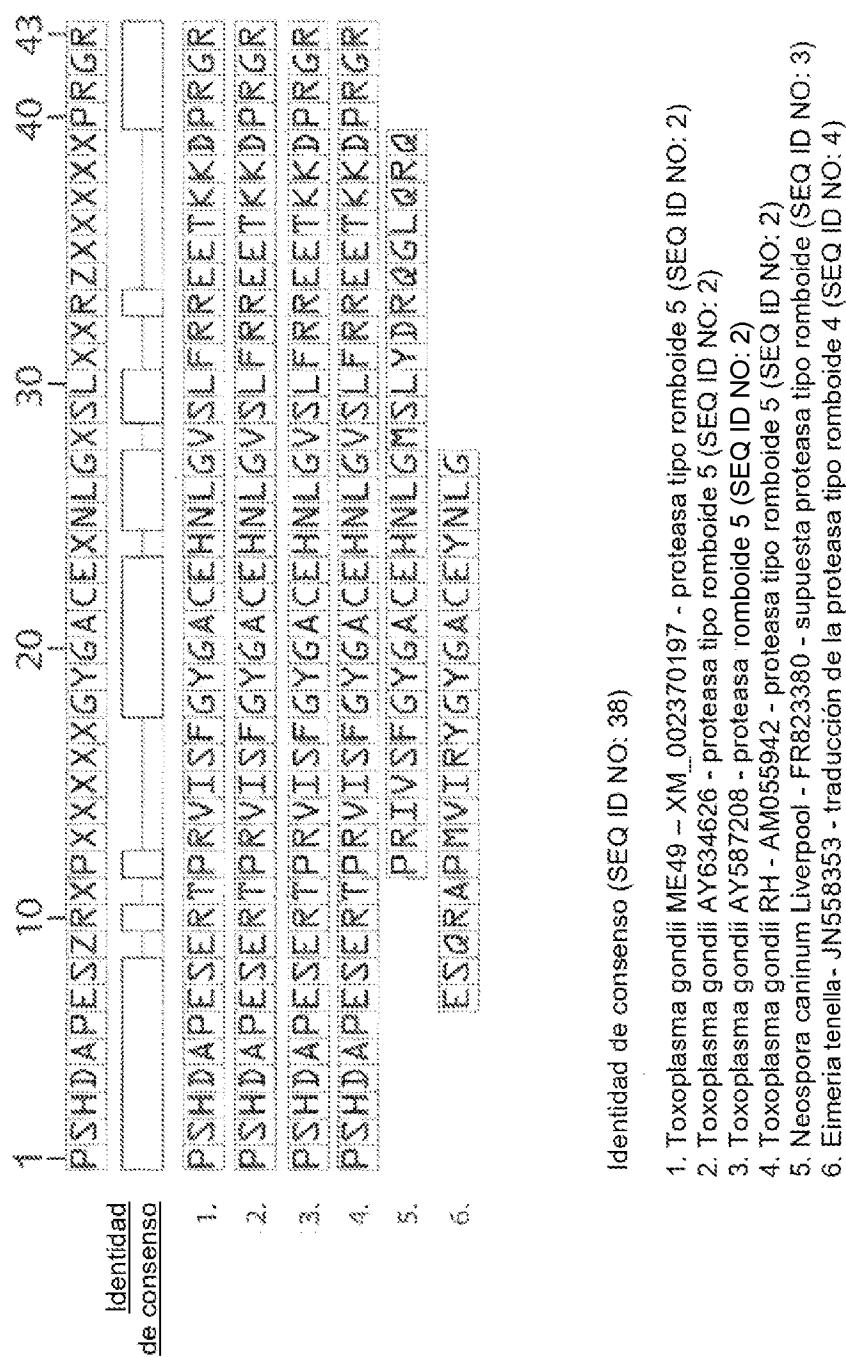


Fig. 1

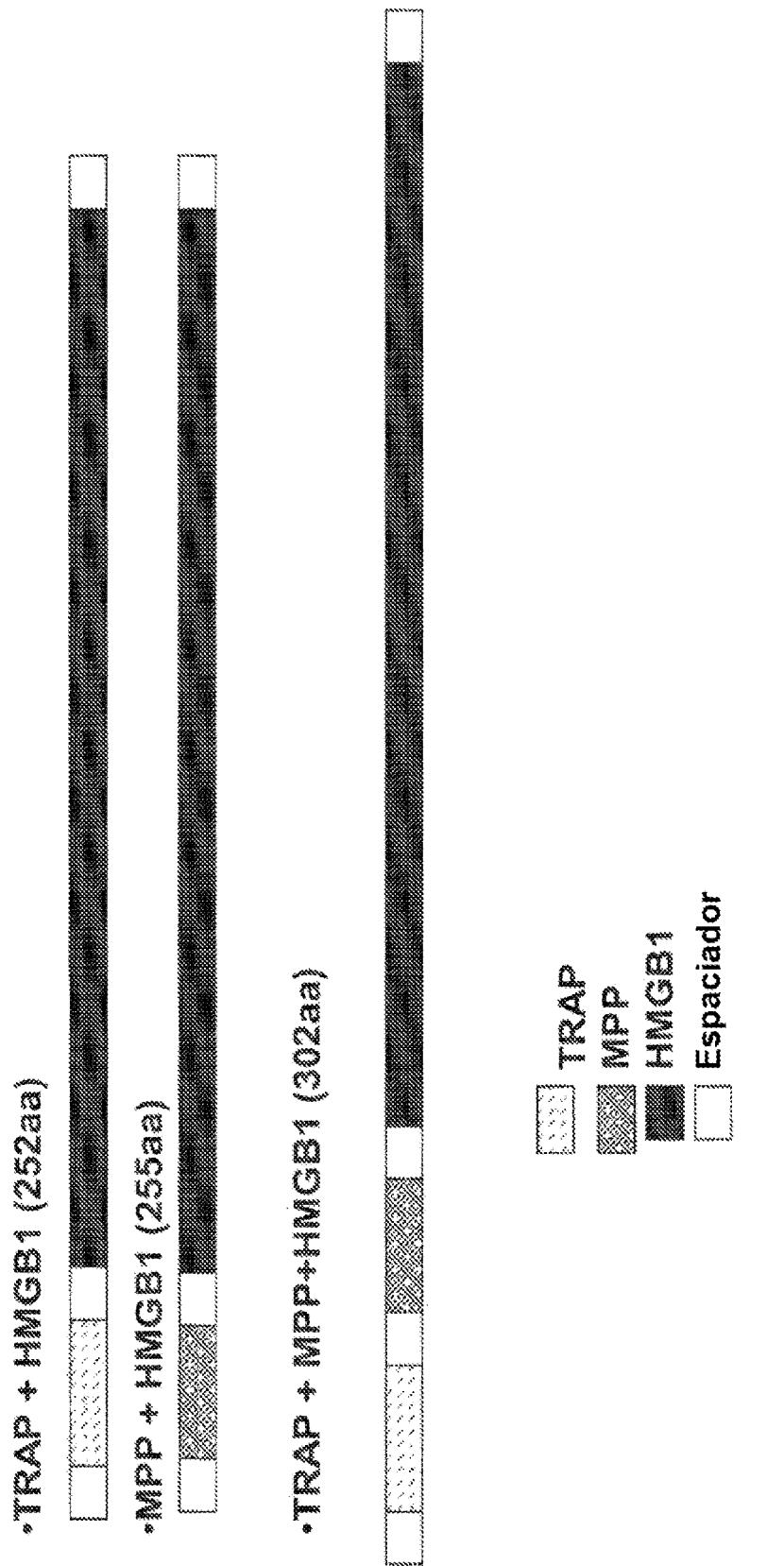


Fig. 2

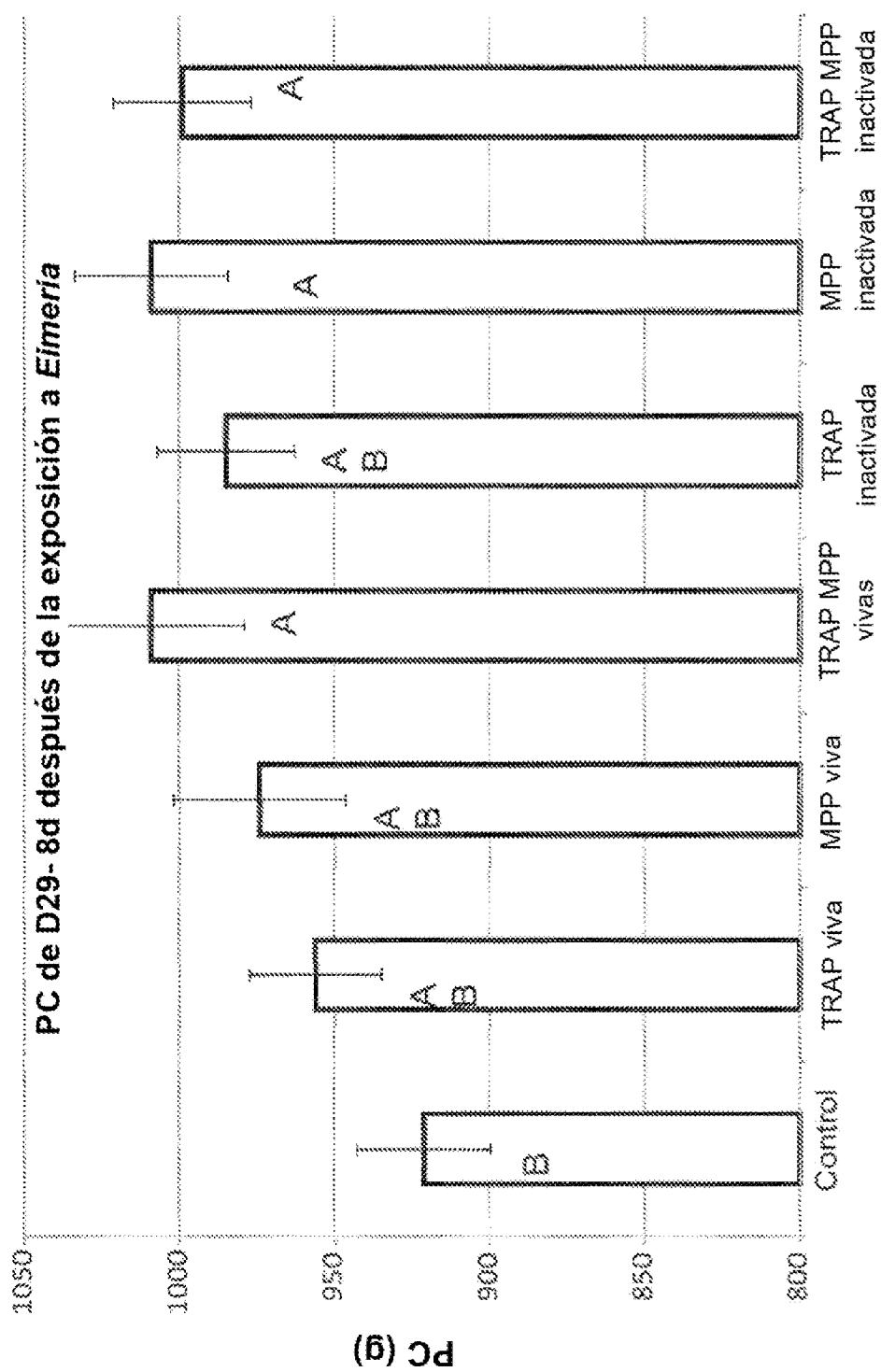


FIG. 3

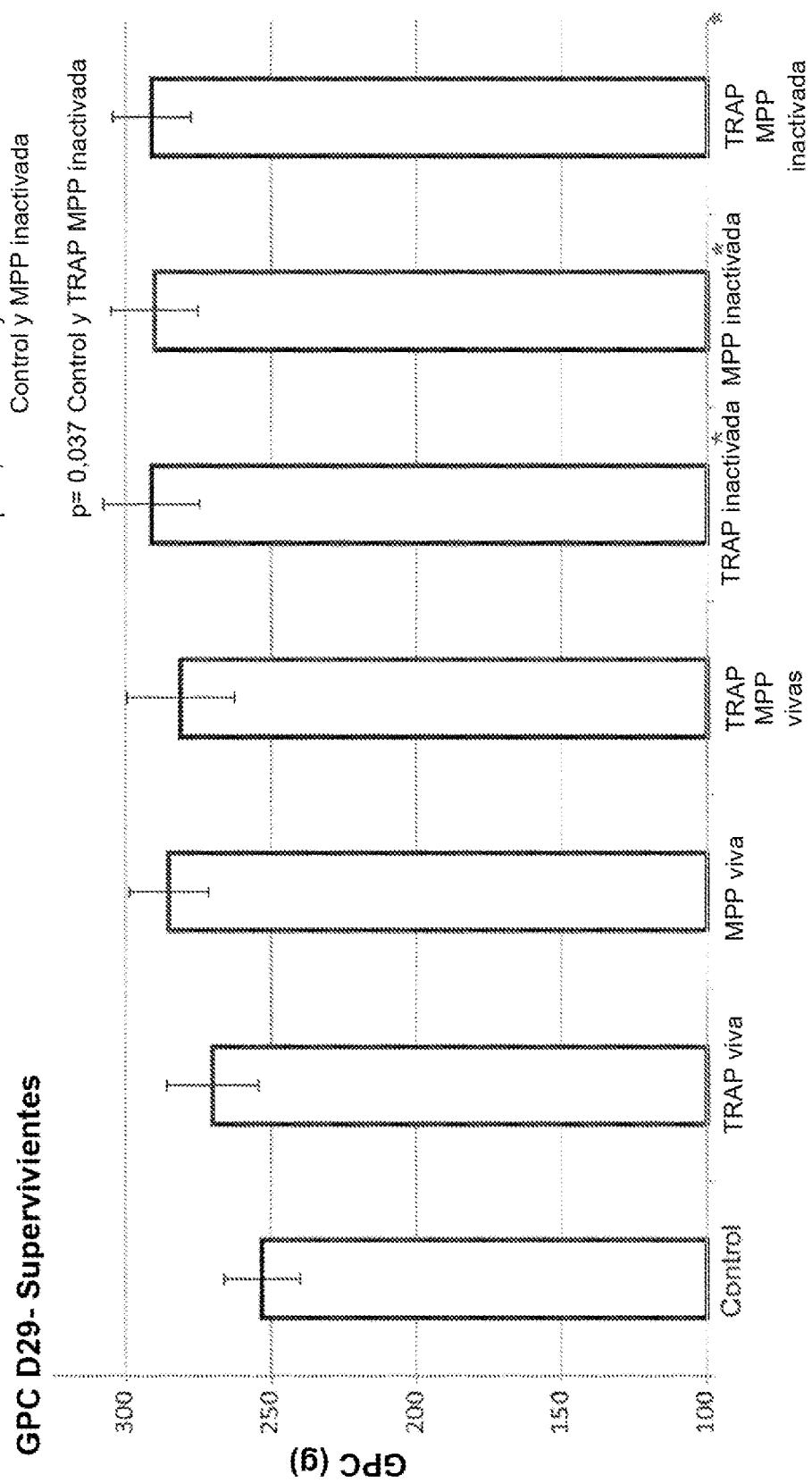


Fig. 4

Mortalidad total después de la exposición a *Eimeria*

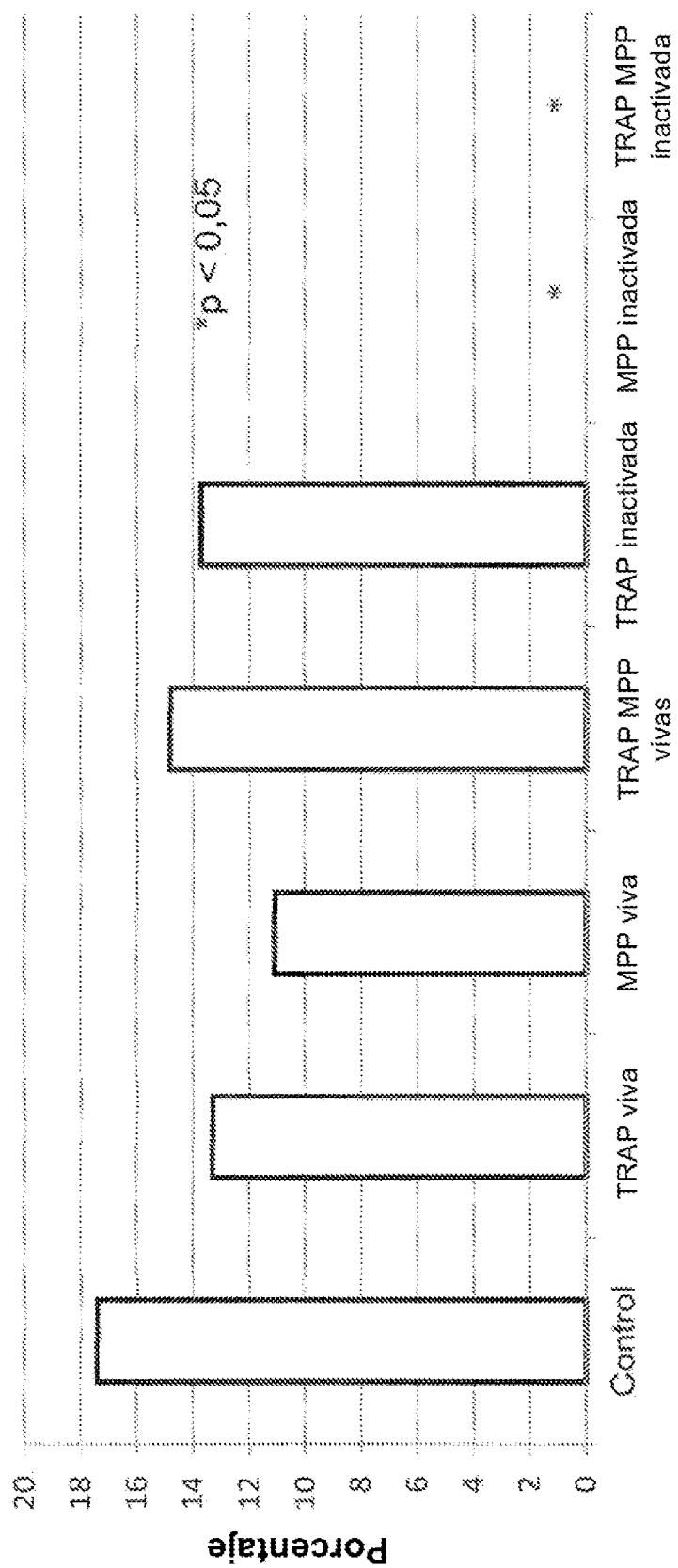


Fig. 5