



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

(11) PI 0819229-4 B1



(22) Data do Depósito: 03/11/2008

(45) Data de Concessão: 22/01/2019

(54) Título: VACINAS PARA REFORÇAR REAÇÕES IMUNES CONTRA EIMERIA

(51) Int.Cl.: A61K 39/012; A61K 38/04.

(30) Prioridade Unionista: 01/11/2007 US 60/984,612.

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

(72) Inventor(es): WALTER BOTTJE; BILLY HARGIS; LUC BERGHMAN; YOUNG MIN KWON; KIMBERLY COLE; MANDY COX; SHERRYLL LAYTON; SAID EL-ASHRAM; JOHN BARTA; GUILLERMO TELLEZ.

(86) Pedido PCT: PCT US2008082254 de 03/11/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/059298 de 07/05/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 03/05/2010

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE REFORÇAR REAÇÕES IMUNES CONTRA EIMERIA A presente invenção refere-se a vacinas compreendendo polipeptídeos TRAP e vetores de *Salmonella enteritidis* compreendendo polipeptídeos TRAP. As vacinas também podem incluir um polipeptídeo de CD154 capaz de ligar a CD40. Também são proporcionados métodos de reforçar uma reação imune contra parasitas Apicomplexanos e métodos de reduzir morbidez associada com infecção com parasitas Apicomplexanos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VACINAS PARA REFORÇAR REAÇÕES IMUNES CONTRA EIMERIA"**.

REFERÊNCIA CRUZADA COM REQUERIMENTOS RELACIONADOS

- Este requerimento reivindica prioridade para o Requerimento
- 5 Provisório de Patente dos Estados Unidos Nº de Série 60/984.612, arquivado em 1º de novembro de 2007, o qual é incorporado aqui, a este requerimento de patente, por meio de referência em sua totalidade.

DECLARAÇÃO REFERENTE A PESQUISA PATROCINADA FEDERALMENTE

- 10 Nenhuma.

INTRODUÇÃO

- Coccidiose, uma doença infecciosa de aves domésticas, suíno, e gado vacum causada pelo parasita protozoário Apicomplexano *Eimeria*, apresenta problemas mundialmente. A coccidiose está entre as dez
- 15 principais doenças infecciosas de aves domésticas em termos de seu impacto econômico sobre a indústria de aves domésticas. Outros membros da família Apicomplexano também causa doença, incluindo *Plasmodium*, *Cryptosporidium* e *Toxoplasma* os quais são os agentes causadores de malária, criptosporidiose e toxoplasmose, respectivamente. As vacinas
- 20 atualmente disponíveis contra *Eimeria* se baseiam em baixa dosagem controlada de parasitas *Eimeria* essencialmente totalmente virulentos porém sensíveis a fármacos. Vacinação com vacinas à base de *Eimeria* atuais produz substancial morbidez em reação à vacina e perdas econômicas em rebanhos vacinados. Portanto é necessária uma vacina de
- 25 baixa virulência eficaz contra *Eimeria*. Uma vacina eficaz para *Eimeria* também pode se comprovar útil como uma vacina contra outros parasitas Apicomplexanos.

Sumário

- É descrita uma vacina compreendendo uma primeira sequência
- 30 de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo *TRAP* ou um fragmento imunogênico do mesmo. O polipeptídeo *TRAP* pode compreender SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, ou SEQ ID Nº: 3, ou um fragmento imunogênico das

mesmas. As vacinas opcionalmente incluem adicionalmente uma segunda sequência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo de CD154 capaz de ligar CD40. Os polipeptídeos de CD154 incluem menos de 50 aminoácidos e compreendem aminoácidos 140-149, ou um homólogo dos mesmos.

5 Vacinas de acordo com a presente invenção podem ser compreendidas dentro de um vetor, tal como um vírus, bactéria, ou lipossoma. Em um aspecto, é proporcionada uma vacina compreendendo uma *Salmonella enteritidis* compreendendo uma primeira sequência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo TRAP.

10 Em ainda outro aspecto, a invenção inclui métodos de reforçar a reação imune contra um parasita Apicomplexano em um indivíduo por administração de uma vacina de acordo com a presente invenção.

 Em ainda um aspecto adicional, a invenção inclui métodos de reduzir morbidez associada com infecção com um parasita Apicomplexano em um indivíduo por administração de uma vacina de acordo com a presente invenção.

Breve Descrição Dos Desenhos

A Figura 1 representa o esquema para making mutações sítio-dirigidas em *Salmonella enteritidis*.

20 A Figura 2 representa o esquema de modelo do método de PCR de extensão de sobreposição usado para gerar as inserções TRAP e TRAP-CD154 no loop 9 do polinucleotídeo *lamB*.

 A Figura 3 é um gráfico de barras mostrando a percentagem de mortalidade em cinco dias pós-infecção com *Eimeria maxima* depois de inoculação com um vetor de *Salmonella* expressando a sequência TRAP de *Eimeria* indicada.

Descrição Detalhada

30 Tecnologias de DNA recombinante possibilitam manipulação relativamente fácil de muitas espécies bacterianas e virais. Algumas bactérias e vírus são moderadamente patogênicos ou não-patogênicos, mas têm a capacidade de gerar uma forte reação imune. Estas bactérias e vírus produzem vacinas atraentes para provocar uma reação imune a antígenos. Vaci-

nas bacterianas ou virais podem simular uma infecção natural e produzir imunidade mucosa robusta e duradoura. Vacinas são frequentemente relativamente econômicas de produzir e administrar. Além disso, os vetores referidos podem frequentemente carregar mais de um antígeno e podem proporcionar proteção contra múltiplos agentes infecciosos.

Em um aspecto, uma vacina compreendendo uma primeira sequência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo TRAP ou um fragmento imunogênico do mesmo é proporcionada. O polipeptídeo TRAP pode compreender SEQ ID N°: 11 ou um fragmento imunogênico da SEQ ID N°: 11. Uma vacina inclui qualquer composição compreendendo um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo antigênico que é capaz de provocar uma reação imune para o polipeptídeo. Em outro aspecto, é revelado o uso de vetores, tais como vetores bacterianos, para vacinação e produção de reações imunes contra *Eimeria* ou outros parasitas Apicomplexanos tais como *Plasmodium* (o agente causador de malária), *Toxoplasma* e *Cryptosporidium*. Cepas de *Salmonella* produzem vetores adequados porque genes bacterianos podem ser mutados ou atenuados para criar bactérias com patogenicidade baixa a ausente para o indivíduo infectado ou imunizado, ao mesmo tempo que mantendo a imunogenicidade.

Foi demonstrado que um antígeno de *Eimeria maxima* em estágio assexuado, de elevada massa molecular (EmTFP250) é um alvo para anticorpos maternos produzidos por galinhas reprodutoras infectadas com este parasita protozoário. A análise da sequência de aminoácidos do antígeno revelou um novo membro da família TRAP (proteína anônima relacionada com trombospondina), contendo 16 repetições de trombospondina tipo-1 e 31 domínios de ligação de cálcio similares a fator de crescimento epidermal. EmTFP250 ou TRAP também contém duas regiões hidrofílicas de complexo inferior, ricas em resíduos ácido glutâmico e glicina, e um domínio transmembrana/cauda citosólica associados com motilidade de deslizamento de parasita que é altamente conservada dentro de proteínas do micronema apicomplexano. Vários epítopos potenciais foram selecionados e são identificados em SEQ ID N°: 1-3 e 11. Devido à natureza conservada deste antígeno,

a expressão destes epítomos por um vetor pode induzir imunidade protetora contra múltiplos parasitas Apicomplexanos.

Salmonella pode proporcionar um vetor útil porque pode sobreviver ao trato gastrointestinal do hospedeiro e dar origem a uma reação imune da mucosa. Vacinas orais usando um vetor de *Salmonella* produzem uma robusta reação imune da mucosa e são relativamente fáceis de administrar tanto a animais quanto a humanos. No entanto, muitas das cepas de vacina de *Salmonella* atuais não são tão eficazes para gerar uma forte reação imune protetora comparadas com seus complementos mais virulentos. Cepas virulentas proporcionam uma forte reação imune mas também podem causar importante morbidez para o indivíduo vacinado. Uma cepa de *Salmonella* que pode ser usada para vacinação mucosa eficaz, por exemplo, oral, proporcionaria um vetor que pode ser usado para vacinar prontamente um indivíduo contra um ou mais agentes patogênicos, tais como parasitas Apicomplexanos.

Uma cepa de *Salmonella enteritidis* útil como um vetor, e vários vetores recombinantes produzidos usando esta cepa, are described. Especificamente, uma *Salmonella enteritidis* 13A (SE13A) capaz de expressar um polipeptídeo TRAP exógeno é proporcionada. Além disso, são revelados uma vacina e métodos de reforçar uma reação imune em um indivíduo por administração de a vacina compreendendo uma sequência de polinucleotídeos TRAP codificando um polipeptídeo TRAP e uma sequência de polinucleotídeos CD154 codificando um polipeptídeo de CD154 ou um homólogo do mesmo que é capaz de ligar a CD40. As vacinas podem ser usadas para reforçar uma reação imune contra *Eimeria* ou outro parasita Apicomplexano, tal como *Plasmodium*, *Toxoplasma* ou *Cryptosporidium*, ou podem ser usadas para reduzir a morbidez associada com uma infecção causada por um parasita Apicomplexano.

Um isolado selvagem de *Salmonella*, *Salmonella enteritidis* 13A (SE13A) (depositado junto à American Type Culture Collection (ATCC) em 13 de setembro de 2006, número de depósito PTA-7871), foi selecionado com base em sua capacidade incomum para causar colonização da mucosa

e translocação sub-mucosa em frangos, permitindo robusta apresentação de antígenos associados ou epítomos em frangos comerciais. De modo importante, este isolado de *Salmonella* selvagem não causa doença clinicamente detectável ou perda de performance em frangos comerciais, indicando pouco potencial de causar doença da *Salmonella* selvagem em animais vertebrados.

O isolado SE13A pode ser adicionalmente atenuado inativando no mínimo um gene necessário para replicação sustentada das bactérias fora de condições de laboratório ou de fabricação. Cepas de *Salmonella* atenuadas ou variantes que podem ser usadas como vetores são descritas abaixo. SE13A foi usado para gerar cepas de *Salmonella* atenuadas para desenvolver vacinas e gerar reações imunes reforçadas. SE13A é invasivo, não-patogênico para aves domésticas e não causa morbidez mensurável. Estas características resultam em uma reação imune reforçada comparados com vetores bacterianos não-invasivos. A atenuação de SE13A por mutação de genes que limitam a capacidade da bactéria para disseminar pode aumentar a segurança da vacina. Cepas SE13A com mutações em *aroA* ou *htrA* conservam a capacidade para gerar uma reação imune, mas têm replicação limitada no hospedeiro. Destre modo, a atenuação aumenta a segurança do vetor sem comprometer a imunogenicidade.

Podem ser feitas mutações em uma variedade de outros genes de *Salmonella* incluindo, mas não limitados a, *cya*, *crp*, *asd*, *cdt*, *phoP*, *phoQ*, *ompR*, proteínas de membrana externa, *dam*, *htrA* ou outros genes relacionados com stress, *aro*, *pur* e *gua*. Conforme mostrado nos Exemplos, foi visto que mutações em *aroA* e *htrA* atenuam SE13A. Os genes *aro* são enzimas envolvidas no caminho da biossíntese de shikimato ou no caminho da aromatase e mutantes *aro* são auxotróficos para os aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina. *htrA* é um gene de reação de stress que codifica uma protease periplásmica que degrada proteínas aberrantes. Mutantes em *htrA* também são atenuados e apresentam sensibilidade aumentada a peróxido de hidrogênio.

As mutações em *aroA* e *htrA* descritas nos Exemplos são mu-

tações de eliminação, mas as mutações podem ser feitas em uma variedade de modos. Convenientemente, as mutações são mutações não-reversíveis que não podem ser reparadas em uma única etapa. Mutações adequadas incluem eliminações, inversões, inserções e substituições. Um vetor pode

5 incluir mais de uma mutação, por exemplo, um vetor pode conter mutações tanto em *aroA* quanto em *htrA*. Métodos de produzir similares mutações são de conhecimento geral na técnica.

Polinucleotídeos codificando antígenos de polipeptídeo TRAP e outros antígenos de qualquer número de organismos patogênicos podem ser

10 inseridos no vetor (por exemplo, SE13A) e expressados pelas bactérias. A expressão destes polinucleotídeos pelo vetor permitirá produção de polipeptídeos antigênicos depois de imunização do indivíduo. Os polinucleotídeos podem ser inseridos no cromossomo das bactérias ou codificados sobre plasmídeos ou outro DNA extracromossômico. Os versados na técnica

15 reconhecerão que existem numerosas metodologias para obter expressão de polinucleotídeos em vetores tais como *Salmonella*. Os polinucleotídeos podem ser operavelmente conectados a um promotor (por exemplo, um promotor constitutivo, um promotor indutível, e etc.) por meio de métodos de conhecimento daqueles versados na técnica. Convenientemente, polinucleotídeos codificando antígenos TRAP são inseridos em um polinucleotídeo

20 bacteriano que é expressado. Convenientemente, o polinucleotídeo bacteriano codifica uma proteína transmembrana, e o polinucleotídeo codificando o antígeno TRAP é inserido na sequência de polinucleotídeos bacterianos para permitir expressão do antígeno TRAP sobre a superfície das bactérias.

25 Por exemplo, o polinucleotídeo codificando TRAP pode ser inserido *in frame* (dentro da estrutura) dentro do polinucleotídeo bacteriano em uma região codificando uma região de loop externo de uma proteína transmembrana de tal modo que a sequência de polinucleotídeos bacterianos permanece *in frame*. Vide o Exemplo 1.

30 Alternativamente, o primeiro polinucleotídeo codificando antígeno TRAP pode ser inserido em um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo secretado. Os versados na técnica reconhecerão que o polinuc-

leotídeo codificando o antígeno TRAP pode ser inserido em uma ampla variedade de polinucleotídeos bacterianos para proporcionar expressão e apresentação do antígeno TRAP às células imunes de um indivíduo tratado com a vacina. Nos Exemplos, um primeiro polinucleotídeo codificando o polipeptídeo TRAP foi inserido no loop 9 do gene *lamB* de SE13A. O polinucleotídeo codificando o antígeno TRAP pode ser incluído em uma única cópia ou mais de uma cópia. Também pode ser gerado um vetor bacteriano contendo múltiplas cópias do antígeno TRAP inserido no loop 9 de *lamB*. Alternativamente, múltiplas cópias de um epítipo podem ser inseridas dentro do vetor bacteriano em mais de uma localização.

Convenientemente o primeiro polinucleotídeo codifica uma porção do polipeptídeo TRAP ou todo o polipeptídeo TRAP. O polinucleotídeo pode ser inserido no vetor. Nos Exemplos, três polipeptídeos (SEQ ID N°: 1-3) foram incorporados em SE13A. Convenientemente, a porção do polipeptídeo TRAP inserido no vetor é um fragmento imunogênico. Um fragmento imunogênico é um peptídeo ou polipeptídeo capaz de provocar uma reação imune celular ou humoral. Convenientemente, um fragmento imunogênico de TRAP pode ser 6 ou mais aminoácidos consecutivos, 10 ou mais aminoácidos, 15 ou mais aminoácidos ou 20 ou mais aminoácidos da sequência de proteína de extensão plena.

Outros epítipos adequados para inclusão em uma vacina tendo TRAP compreendido dentro de um vetor incluem, mas não estão limitados a, polinucleotídeos codificando outros polipeptídeos relacionados com *Eimeria*. Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que uma variedade de sequências podem ser usadas em combinação com qualquer outro antígeno e também podem ser usadas em combinação com polipeptídeos codificando peptídeos imuno estimuladores tais como um polipeptídeo de CD154.

Conforme descrito em mais detalhes abaixo, uma vacina incluindo um vetor pode incluir um polipeptídeo de CD154 que é capaz de ligar CD40 no indivíduo e estimular o indivíduo a responder ao vetor e seu antígeno associado. O envolvimento de células dendríticas (DCs) é essencial para a iniciação de uma poderosa reação imune uma vez que elas pos-

suem a capacidade única de ativar células T naíve (N.T.: não estimuladas previamente), provocando expansão de células T e diferenciação em células efectoras. É o papel das células dendríticas, a qual é uma célula apresentando antígeno (APC) encontrada em virtualmente todos os tecidos do corpo, capturar antígenos, transportar os mesmos para tecido linfóide associado, e em seguida apresentar os mesmos a células T naíve. Na ativação por células dendríticas, células T expandem, diferenciam em células efectoras, deixam os órgãos imunes secundários, e penetram nos tecidos periféricos. Células T citotóxicas ativadas (CTLs) têm a capacidade de destruir células infectadas por vírus, células tumorais ou ainda APCs infectadas com parasitas intracelulares (por exemplo, *Salmonella*) e foi demonstrado que são cruciais na proteção contra viral infecção. CD40 é um membro da família de moléculas receptoras de TNF e é expressado em uma variedade de tipos celulares, incluindo células apresentando antígenos profissionais (APCs), tais como células dendríticas e células B. A interação de CD40 com seu ligante CD154 é extremamente importante e estimuladora tanto para imunidade humoral quanto celular. A estimulação de células dendríticas através de CD40, expressado sobre a superfície de células dendríticas, pode ser simulada por anticorpos anti-CD40. No entanto, no corpo, isto ocorre por interação com o ligante natural para CD40 (isto é, CD154) expressado sobre a superfície de células T ativadas. De modo interessante, foram identificadas as regiões de ligação CD40 de CD154. A região de ligação CD40 de CD154 pode ser expressada sobre a superfície de um vetor, tal como um vetor de *Salmonella*, e resulta em uma reação imune reforçada contra uma sequência de peptídeo co-apresentada.

Conforme descrito acima, polinucleotídeos codificando polipeptídeos de CD154 podem ser inseridos no cromossomo do vetor ou mantidos extracromossomicamente. Um polipeptídeo de CD154 pode ser uma porção da proteína de extensão total CD154 ou toda a proteína CD154. Convenientemente, o polipeptídeo de CD154 é capaz de ligar CD40. Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que estes polinucleotídeos podem ser inseridos *in frame* em uma variedade de polinucleotídeos e expressados

em diferentes partes do vetor ou podem ser secretados. O polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de CD154 capaz de reforçar a reação imune a TRAP também pode codificar o antígeno TRAP. O polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de CD154 pode ser encadeado ao polinucleotídeo codificando o antígeno TRAP, de tal modo que no vetor, o polipeptídeo de CD154 e o antígeno TRAP estão presentes sobre o mesmo polipeptídeo. Nos Exemplos, um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de CD154 que é capaz de ligar a CD40 também codifica o antígeno TRAP. Vide as SEQ ID NOS: 1, 2, 3 e 11 na listagem de sequências anexada. Nos Exemplos, os polinucleotídeos (SEQ ID Nº: 13-15) codificando o antígeno TRAP e o polinucleotídeo codificando o polipeptídeo de CD154 são ambos inseridos no loop 9 do gene *lamB*. Os versados na técnica reconhecerão que bacterianos polinucleotídeos codificando outras proteínas transmembranas e outros loops do gene *lamB* também podem ser usados.

Conforme discutido acima, um polinucleotídeo CD154 codificando um polipeptídeo de CD154 que é capaz de reforçar a reação imune ao antígeno pode ser incluído na vacina. Convenientemente, o polipeptídeo de CD154 tem menos de 50 aminoácidos de extensão, mais convenientemente menos de 40, menos de 30 ou menos de 20 aminoácidos de extensão. O polipeptídeo pode ter entre 10 e 15 aminoácidos, entre 10 e 20 aminoácidos ou entre 10 e 25 aminoácidos de extensão. A sequência CD154 e a região de ligação CD40 não são altamente conservadas entre as várias espécies. As sequências CD154 de frango e humana são proporcionadas nas SEQ ID Nº: 10 e SEQ ID Nº: 4, respectivamente.

As regiões de ligação CD40 de CD154 foram determinadas para uma série de espécies, incluindo humana, frango, pato, camundongo e gado vacum e são apresentadas nas SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7, SEQ ID Nº: 8, e SEQ ID Nº: 9, respectivamente. Embora haja variabilidade nas sequências na região de ligação entre espécies, o polipeptídeo de CD154 humano foi capaz de reforçar a reação imune em frangos. Portanto, pode-se praticar a invenção usando polipeptídeos de CD154 espécie específicos ou um polipeptídeo CD 154 heterólogo.

Nos Exemplos, foram geradas várias bactérias recombinantes SE13A. Em cada uma das cepas SE13A contendo ambos os polinucleotídeos TRAP e CD154, o polipeptídeo TRAP e o polipeptídeo de CD154 foram codificados sobre o mesmo polinucleotídeo e estavam *in frame* um com o outro e com o polinucleotídeo *lamB* de *Salmonella* no qual foram inseridos. Em modalidades alternativas, o polipeptídeo de CD154 e o polipeptídeo TRAP podem ser codificados por polinucleotídeos distintos. SE13A *aroA htrA TRAP* contém uma eliminação em *aroA* e *htrA* e codifica tanto o TRAP epítipo (SEQ ID N°: 1-3) quanto opcionalmente o polipeptídeo de CD154 (SEQ ID N°: 4) inserido no loop 9 de *lamB*.

Também são proporcionadas composições compreendendo uma cepa de *Salmonella* atenuada e um veículo farmacêuticamente aceitável. Um veículo farmacêuticamente aceitável é qualquer veículo adequado para administração *in vivo*. Exemplos de veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados para uso na composição incluem, mas não estão limitados a, água, soluções tamponadas, soluções de glicose ou fluidos de culturas bacterianas. Componentes adicionais das composições podem incluir convenientemente, por exemplo, excipientes tais como estabilizantes, conservantes, diluentes, emulsificantes e lubrificantes. Exemplos de veículos ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis incluem estabilizantes tais como carboidratos (por exemplo, sorbitol, manitol, amido, sacarose, glucose, dextran), proteínas tais como albumina ou caseína, agentes contendo proteína tais como soro bovino ou leite desnatado e tampões (por exemplo, tampão de fosfato). Especialmente quanto os estabilizantes referidos são adicionados às composições, a composição é adequada para secagem por congelamento ou secagem por pulverização.

Também são proporcionados métodos de reforçar reações imunes em um indivíduo por administração de uma vacina contendo um polipeptídeo TRAP e um polipeptídeo de CD154 capaz de ligar a CD40 e ativar CD40. A vacina compreendendo o polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de CD154 capaz de ligar a CD40 é administrada a um indivíduo em uma quantidade eficaz para reforçar a reação imune do indivíduo à vacina.

Convenientemente, a vacina contém um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo incluindo aminoácidos 140-149 do polipeptídeo de CD154 humano (SEQ ID N°: 4) ou um homólogo do mesmo. Portanto, pode ser usado um homólogo de aminoácido 140-149 derivado de uma espécie para estimular uma reação imune em uma espécie distinta.

Vários polipeptídeos adequados são identificados aqui, neste requerimento de patente. Convenientemente, o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo de CD154 da mesma espécie que o indivíduo. Convenientemente, um polinucleotídeo codificando o polipeptídeo de SEQ ID N°: 5 é usado em indivíduos humanos, um polinucleotídeo codificando o polipeptídeo de SEQ ID N°: 6 é usado em frangos, um polinucleotídeo codificando o polipeptídeo de SEQ ID N°: 7 é usado em patos, um polinucleotídeo codificando o polipeptídeo de SEQ ID N°: 8 é usado em camundongos, e um polinucleotídeo codificando o polipeptídeo de SEQ ID N°: 9 é usado em vacas. Nos Exemplos, o polipeptídeo de CD154 humano (SEQ ID N°: 5) foi usado em uma vacina de frango e foi demonstrado que reforça a reação imune a um antígeno estranho. Portanto outras combinações heterólogas de polipeptídeos de CD154 e indivíduos podem ser úteis nos métodos da invenção. O polipeptídeo de CD154 pode ser usado para reforçar a reação imune no indivíduo a qualquer antígeno estranho ou polipeptídeo antigênico presente na vacina em adição ao polipeptídeo TRAP. Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que o polipeptídeo de CD154 pode ser usado para reforçar a reação imune a mais de um polipeptídeo antigênico presente em uma vacina.

O polipeptídeo de CD154 estimula uma reação imune no mínimo em parte por ligação a seu receptor, CD40. Os Exemplos usaram um polipeptídeo homólogo ao polipeptídeo de CD154 o qual é expressado sobre células imunes do indivíduo e o qual é capaz de ligar ao receptor de CD40 sobre macrófagos e outras células apresentando antígeno. A ligação deste complexo ligante-receptor estimula macrófago (e células da linhagem de macrófagos tais como células dendríticas) reforçando fagocitose e apresentação de antígeno ao mesmo tempo que aumentando secreções de citocinas

conhecidas por ativar outras células imunes locais (tais como linfócitos B). Deste modo, moléculas associadas com o peptídeo CD154 são preferencialmente dirigidas para reação imune e produção de anticorpos expandida.

Vetores potenciais para uso nos métodos incluem, mas não estão limitados a, *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*), *Shigella*, *Escherichia* (*E. coli*), *Yersinia*, *Bordetella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Vibrio* (*Vibrio cholerae*), *Listeria*, adenovírus, poxvírus, herpesvírus, alfavírus, e vírus adeno-associado.

Além disso, são revelados métodos de reforçar uma reação imune contra um parasita Apicomplexano e métodos de reduzir morbidez associada com infecção subsequente com um parasita Apicomplexano. Em resumo, os métodos compreendem administrar a um indivíduo uma vacina compreendendo uma primeira sequência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo TRAP em uma quantidade eficaz. Os polipeptídeos TRAP podem incluir SEQ ID N°: 1-3 e 11. A inserção dos polipeptídeos TRAP no vetor pode ser realizada em uma variedade de modo de conhecimento daqueles versados na técnica, incluindo mas não limitados ao sistema de mutações sítio-dirigidas sem cicatriz descrito em BMC Biotechnol. 2007 Sept, 17: 7(1): 59, "Scarless and Site-directed Mutagenesis in *Salmonella enteritidis* chromosome", o qual é incorporado aqui, a este requerimento de patente, por meio de referência em sua totalidade. O vetor também pode ser produzido para expressar os polipeptídeos TRAP em combinação com outros polipeptídeos capazes de reforçar a reação imune conforme discutido acima, tal como na SEQ ID N°: 4 e SEQ ID N°: 10. Em particular, um polipeptídeo de CD154 capaz de ligar CD40 pode ser expressado pelo vetor para reforçar a reação imune do indivíduo ao polipeptídeo TRAP. Opcionalmente, o vetor é uma bactéria, tal como *Salmonella enteritidis*.

A dosagem útil da vacina a ser administrada variará dependendo da idade, peso e espécie do indivíduo, do modo e via de administração e do tipo de patógeno contra o qual se busca uma reação imune. A composição pode ser administrada em qualquer dose suficiente para provocar uma reação imune. Para vacinas bacterianas, é previsto que são adequadas dos-

es variando de 10^3 a 10^{10} bactérias, de 10^4 a 10^9 bactérias, ou de 10^5 a 10^7 bactérias. A composição pode ser administrada somente uma vez ou pode ser administrada duas ou mais vezes para aumentar a reação imune. Por exemplo, a composição pode ser administrada duas ou mais vezes separadas por uma semana, duas semanas, ou por três ou mais semanas. As bactérias são convenientemente viáveis antes da administração, mas em algumas modalidades as bactérias podem ser mortas antes da administração. Em algumas modalidades, as bactérias podem ser capazes de replicar no indivíduo, ao passo que em outras as bactérias podem não ser capazes de replicar no indivíduo.

Para administração a animais ou humanos, as composições podem ser administradas por uma variedade de meios incluindo, mas não limitados a, por via intranasal, por via mucosa, por pulverização, por via intradérmica, por via parenteral, por via subcutânea, por via oral, por aerosol ou por via intramuscular. São adicionalmente adequadas administração de gotas oculares ou adição à água potável ou alimento. Para frangos, as composições podem ser administradas in ovo.

Algumas modalidades da invenção proporcionam métodos de reforçar reações imunes em um indivíduo. Indivíduos adequados podem incluir, mas não estão limitados a, vertebrados, convenientemente mamíferos, convenientemente um humano, e aves, convenientemente aves domésticas tais como frangos. Também podem ser usados outros modelos animais de infecção. O reforço de uma reação imune inclui, mas não está limitado a, induzir um efeito terapêutico ou profilático que é mediado pelo sistema imune do indivíduo. Especificamente, o reforço de uma reação imune pode incluir, mas não está limitado a, reforço da produção de anticorpos, reforço da troca de classes de cadeias pesadas de anticorpos, maturação de células apresentando antígeno, estimulação de células T auxiliares, estimulação de células T citolíticas ou indução de memória de células T e B.

É previsto que vários epítomos ou antígenos do mesmo ou de diferentes patógenos podem ser administrados em combinação em uma única vacina para gerar uma reação imune reforçada contra múltiplos antígenos.

Vacinas recombinantes podem codificar antígenos de múltiplos micro-organismos patogênicos, vírus ou antígenos associados a tumor. A administração de vacina capaz de expressar múltiplos antígenos tem a vantagem de induzir imunidade contra duas ou mais doenças ao mesmo tempo. Por exemplo, bactérias vivas atenuadas, tais como *Salmonella enteritidis* 13A, proporcionam um vetor adequado para provocar uma reação imune contra múltiplos antígenos.

Vacinas bacterianas podem ser construídas usando polinucleotídeos exógenos codificando antígenos os quais podem ser inseridos no genoma bacteriano em qualquer sítio não -essencial ou alternativamente podem ser carregados sobre um plasmídeo usando métodos de conhecimento geral na técnica. Um sítio adequado para inserção de polinucleotídeos é dentro de porções externas de proteínas transmembranas ou acoplado a sequências que têm por alvo o polinucleotídeo exógeno para caminhos secretores. Um exemplo de uma proteína transmembrana adequada para inserção de polinucleotídeos é o gene *lamB*. Nos Exemplos, polinucleotídeos TRAP e CD154 foram inseridos no loop 9 da sequência *lamB*.

Polinucleotídeos exógenos incluem, mas não estão limitados a, polinucleotídeos codificando antígenos selecionados entre micro-organismos ou vírus patogênicos e incluem polinucleotídeos que são expressados em um modo tal que é gerada uma reação imune eficaz. Os polinucleotídeos referidos podem ser derivados de vírus patogênicos tais como influenza (por exemplo, M2e, hemaglutinina, ou neuraminidase), herpesvírus (por exemplo, os genes codificando as proteínas estruturais de herpesvírus), retrovírus (por exemplo, a proteína de envelope gp160), adenovírus, paramixovírus, coronavírus e similares. Polinucleotídeos exógenos também podem ser obtidos de bactérias patogênicas, por exemplo, genes codificando proteínas bacterianas tais como toxinas, e proteínas da membrana externa. Além disso, polinucleotídeos exógenos de parasitas, tais como outros parasitas Apicomplexanos são candidatos atraentes para uso de uma vacina de vetor.

Polinucleotídeos codificando polipeptídeos envolvidos em disparar o sistema imune também podem ser incluídos em um vetor, tal como

uma vacina de *Salmonella* viva atenuada. Os polinucleotídeos podem codificar moléculas do sistema imune conhecidas por seus efeitos estimulatórios, tais como uma interleuquina, Fator de Necrose Tumoral, um interferon, ou outro polinucleotídeo envolvido em imuno-regulação. A vacina também pode
5 incluir polinucleotídeos codificando peptídeos conhecidos para estimular uma reação imune, tal como o polipeptídeo de CD154 descrito aqui, neste requerimento de patente.

Os exemplos que se seguem são pretendidos somente para serem ilustrativos e não são pretendidos como limitações sobre o âmbito da
10 invenção ou das reivindicações anexadas.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Construção de insertos TRAP e TRAP/CD154.

Cepas e Condições de Cultura

Todos os plasmídeos foram primeiro mantidos em células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a menos que descrito de modo
15 diverso. *Salmonella enteritidis* 13A foi usada para introdução de mutações. *Salmonella enteritidis* cepa 13A foi um isolado de campo disponível de USDA/APHIS/NVSL e depositado junto à ATCC como número de depósito PTA-7871. Bactérias carregando plasmídeo pKD46 foram cultivadas a 30°C. Out-
20 ras bactérias foram cultivadas a 37°C. Cura de plasmídeo foi conduzida a 37°C.

Meio Luria-Bertani (LB) foi usado para crescimento de células de rotina, e meio SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi usado para expressão fenotípica depois de eletroporação. Quando apropriado, os se-
25 guintes antibióticos foram adicionados ao meio: ampicilina (Amp) a 100µg/ml, canamicina (Km) a 50µg/ml, e cloranfenicol (Cm) a 25µg/ml.

Plasmídeos

Plasmídeos pKD46, pKD13, e pBC-I-SceI foram descritos previamente (Datsenko e Wanner, PNAS 2000, 97:6640-6645 e Kang et al., J
30 Bacteriol 2004, 186: 4921-4930, dos quais ambos são incorporados aqui, a este requerimento de patente, por meio de referência em suas totalidades). O plasmídeo pKD46 codifica enzimas Red recombinase as quais mediam

recombinação homóloga de DNA linear entrante com DNA cromossômico. Este plasmídeo também contém o gene de resistência a Ampicilina e é sensível a temperatura de modo que requer 30°C para manutenção na célula. O plasmídeo pKD13 serviu como um modelo para amplificação do gene de resistência a canamicina (Km^r) usado em PCR de sobreposição. O plasmídeo pBC-I-SceI, o qual é mantido na célula a 37°C, produz a enzima I-SceI, a qual cliva a sequência de reconhecimento rara seguinte de 18 pares de bases: 5'-TAGGGATAACAGGGTAAT-3' (SEQ ID N°: 16). O plasmídeo pBC-I-SceI também contém o gene de resistência a cloranfenicol (Cm^r).

10 PCR

Todos os iniciadores usados para PCR são listados na Tabela 1. Tipicamente, PCR foi realizado usando aproximadamente 0,1 µg de plasmídeo genômico purificado ou DNA gerado por PCR (Qiagen, Valencia, CA, EUA), 1x tampão de *Pfu* polimerase clonado, 5U *Pfu* polimerase (Stratagene La Jolla, CA, EUA), 1 mM de dNTPs (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ), e 1,2 µM de cada iniciador em um volume total de 50 µL. O mecanismo ciclador térmico de DNA (*DNA engine thermal cycler* Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foi usado com as seguintes condições de amplificação: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C seg por 30 seg, 58°C por 60 seg, 72°C por 90 seg por 1 kb; e 72°C por 10 minutes por extensão final. Cada produto de PCR foi purificado por gel (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e ou elutriado em 25 µL de tampão EB para preparação de modelos usados em PCR de extensão de sobreposição ou em 50 µL de tampão EB, etanol precipitado e suspenso em 5 µL de ddH₂O para eletroporação em *S. enteritidis*.

Tabela 1. Sequências de iniciadores

Iniciador	Região ampli- cada	Sequência de iniciadores
lam-up-f	loop 9 up	5'TGTACAAGTGGACGCCAATC 3' (SEQ ID N°: 17)
lam-up-r		5'GTTATCGCCGTCTTTGATATAGCC 3' (SEQ ID N°: 18)
lam-dn-f	loop 9 dn	5'ATTTCCTCGTTATGCCGCAGC 3' (SEQ ID N°: 19)
lam-dn-r		5'GTTAAACAGAGGGCGACGAG 3' (SEQ ID N°: 20)
Km-f	gene I-SceI/Km ^r	5'GCTATATCAAAGACGGCGATAACTAACTATAA CGGTCCTAAGGTAGC-
Km-r		GAATTTCCGGGGATCCGTCTGA 3' (SEQ ID N°: 21) 5'GCTGCGGCATAACGGGAAATTGTAGGCTGGA GCTGCTTCG 3' (SEQ ID N°: 22)
Kan4f	gene Km ^r inter- no: sequencia- mento	5'CAAAAGCGCTCTGAAGTTCC 3' (SEQ ID N°: 23)
Kan4r		5'GCGTGAGGGGATCTTGAAGT 3' (SEQ ID N°: 24)
SEQ1 hCD154 up reversa	SEQ1 hCD154/ loop 9 up	5'GGAGGACGCAACCGCCGCGGTCTCGAAAACC ACCACCGGAGGAGGAGT- TATCGCCGTCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID N°: 25)
SEQ1hCD154 down forward	SEQ1hCD154/ loop 9 down	5'CCGCGGCGGTTGCGTCCTCCTCCTGGGCAGA AAAAGGTTATTATAC- CATGTCTTCCTCCTCCATTTCCCGTTATGCCGC AGC3' (SEQ ID N°: 26)
SEQ2 hCD154 up reversa	SEQ2-hCD154/ loop 9 up	5'TTTTCTTCTTCTTCTTCCGGTTCCGGACGTTCA TGACCTTCTTCGGCTTTCCGGCTGAACCGCCGG GGTTTCCGGCGCCGCGGAGGAGGAGT- TATCGCCGTCTTTGATATAGCC3' (SEQ ID N°: 27)

Iniciador	Região ampli- cada	Sequência de iniciadores
SEQ2 hCD154 up reversa	SEQ2-hCD154/ loop 9 down	5'ACCGGAAGAAGAAGAAGAAAAAAGAAGAA GGTGGTGGTTTTCCGACCGCGGCGGTTGCGTC CTCCTCCTGGGCAGAAAAAGGTTATTATAC- CATGTCTTCCTCCTCCATTTC CGTTATGCCGC AGC3' (SEQ ID N°: 28)
SEQ3 Hcd154 up reversa	SEQ3 hCD154/ loop 9 up	5'GCAACACCACCACCAACCGCCGCGATCAGCA GAACACCACCAACAC- CACCCGCAACCGCCGCGGTTCGAAAACCAC- CACCGGAGGAGGAGTTATCGCCGTCTTTGATA- TAGCC3' (SEQ ID N°: 29)
SEQ3 hCD154 up reversa	SEQ3-hCD154/ loop 9 down	5'GGCGGTTGGTGGTGGTGTTCGCGCGTTTACC TCCGGTGGTGGTGGTGGCGGTGCGCAG- GAATCCTCCTCCTGGGCAGAAAAAGGTTATTA- TAC- CATGTCTTCCTCCTCCATTTC CGTTATGCCGC AGC3' (SEQ ID N°: 30)
lam 3f lam 3r	regiões externas de loop 9: se- quenciamento	5'GCCATCTCGCTTGGTGATAA 3' (SEQ ID N°: 31) 5'CGCTGGTATTTGCGGTACA 3' (SEQ ID N°: 32)

Na Tabela 1, nucleotídeos em *itálico* são complementares a qualquer lado do sítio de inserção do loop 9 do gene *lamB*, o qual corresponde ao nucleotídeo 1257 usando *S. typhimurium* como um genoma de referência anotado. Nucleotídeos em fonte em **negrito** representam o sítio de reconhecimento I-SceI no iniciador Km-f.

Eletroporação

Transformação de pKD46 em *S. enteritidis* foi a primeira etapa realizada de modo que enzimas Red recombinase possam ser usadas para mediar recombinação de mutações subsequentes. O plasmídeo pKD46 foi harvested from *E. coli* BW25113 (Datsenko e Wanner, PNAS 2000, 97:

6640-6645) usando um kit de preparação de plasmídeo (Qiagen Valencia, CA, EUA). Em seguida 0,5 μ L de pKD46 DNA foi usado para transformação em *S. enteritidis* 13A a qual tinha sido preparada para eletroporação. (Datsenko e Wanner, PNAS 2000, 97: 6640-6645). Em resumo, as células foram

5 inoculadas em 10 a 15 mL de caldo 2X YT e cultivadas a 37°C de um dia ao outro. Em seguida 100 μ L de cultura de um dia ao outro foi reinoculado em 10 mL de caldo fresco 2X YT a 37°C por 3 a 4 horas. Células a serem transformadas com plasmídeo pKD46 foram aquecidas a 50°C por 25 minutos para ajudar a inativar restrição de hospedeiro. As células foram lavadas cinco

10 vezes em água ddH₂O e ressuspensas em 60 μ L de 10% de glicerol. As células foram em seguida pulsadas a 2400 a 2450 kV por 1 a 6 ms, incubadas em SOC por 2 a 3 horas a 30°C e laminadas sobre meio LB com antibióticos apropriados. Transformantes de *S. enteritidis* com pKD46 foram mantidos a 30°C. Quando estes transformantes foram preparados para

15 reações de eletroporação adicionais, todas as etapas foram as mesmas exceto que foi adicionado 15% de arabinose para induzir enzimas Red recombinase uma hora antes da lavagem, e as células não sofreram a etapa de aquecimento a 50°C.

Constructo Loop 9 up- I-SceI/ Km^r- Loop 9 down

20 Introdução de sítio de reconhecimento enzimático I-SceI junto com o gene Km^r no loop 9 do gene *lamB* foi feita combinando o sistema Red recombinase (Datsenko e Wanner, PNAS 2000, 97: 6640-6645, o qual é incorporado aqui, a este requerimento de patente, por meio de referência em sua totalidade) e PCR de sobreposição (Horton et al., BioTechniques 1990,

25 8: 528-535, o qual é incorporado aqui, a este requerimento de patente, por meio de referência em sua totalidade). O sítio de inserção corresponde ao nucleotídeo 1257 do gene *lamB* usando *Salmonella typhimurium* LT2 (*S. typhimurium*) como um genoma de referência anotado. Primeiro, as regiões a montante e a jusante imediatamente flanqueando o sítio de inserção do loop

30 9 (loop 9 up (N.T.: acima) e loop 9 down (N.T.: abaixo), respectivamente) foram amplificadas separadamente. Os iniciadores usados foram lam-up-f e lam-up-r para loop 9 up e lam-dn-f e lam-dn-r para loop 9 down. Em seguida

o gene Km^r do plasmídeo pKD13 foi amplificado usando os iniciadores $Km-f$ e $Km-r$. Aqui, o sítio enzimático I-SceI foi adicionado sinteticamente à extremidade 5' do iniciador $Km-f$ em seguida precedido por uma região complementar ao iniciador loop-up-r. Do mesmo modo, uma região complementar ao iniciador loop-dn-f foi adicionado à extremidade 5' do iniciador $Km-r$. As regiões complementares permitem que todos os 3 produtos de PCR enrijeçam quando usados como modelos em uma reação de PCR. A Figura 2a representa este esquema de modelo. Fragmentos de PCR consistindo na sequência loop 9 up- I-SceI/ Km^r - loop 9 down (PCR-A) foram eletroporados em células de *S. enteritidis*, as quais abrigavam pKD46 e foram induzidos por arabinose, e em seguida laminados sobre lâminas de LB com Km . Para verificar a orientação de sequência correta da mutação, nós realizamos PCR de colônia com pares de iniciadores Kan4F/lam3f e Kan4R/lam3r, onde Kan4F e Kan4R são iniciadores gene Km^r -específicos e lam3f e lam3r são iniciadores localizados fora da região *lamB* loop 9. Estes fragmentos de PCR foram purificados por gel (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e usados para sequenciamento de DNA.

Constructo Loop 9 up - TRAP -CD154 - Loop 9 down

O fragmento de PCR de sobreposição final, PCR-B, continha o antígeno TRAP adicionado em combinação com sequências CD154 flanqueadas por regiões de loop 9 acima e abaixo (Figura 2b). Combinação sequências consistiram de polinucleotídeo TRAP codificando SEQ ID N°: 1-3 e CD154 junto com espaçadores tais como resíduos Serina (Ser).

Para encurtar a quantidade de etapas para construção do fragmento seguinte, a sequência TRAP-CD154 foi sinteticamente adicionada à extremidade 5' do iniciador lam-dn-f e precedida pela região complementar ao iniciador loop-up-r. Os produtos de PCR previamente usados para loop 9 acima podem ser usados junto com o produto de PCR recém construído no qual os TRAP-CD154s foram incorporados na extremidade 5' do loop 9 abaixo para realizar a reação de PCR final. No entanto, para outras sequências de inserto, foi necessária uma etapa de PCR extra, devido às extensões mais longas de sequências de inserto, para amplificar loop 9 up com nuc-

leotídeos adicionados específicos para sequências de inserção conectadas a iniciador loop-up-r. A sequência codificante para Gly (GGT) e Serina (TCC) bem como todos os outros aminoácidos foram escolhidas com base em dados compilados dos códons o mais frequentemente usados em proteínas de *E. coli* e *Salmonella typhimurium*. Vide a Tabela 1 para detalhes adicionais de modelo de iniciador.

Mutação de inserção sítio I-SceI / Km^r

A primeira etapa de mutação envolveu projetar um fragmento de PCR, PCR-A, o qual serviria como o veículo do cassete sítio I-SceI / Km^r a ser inserido no sítio *lamB*. PCR-A consistiu do sítio de reconhecimento enzimático I-SceI adjacente ao gene Km^r com aproximadamente 200 a 300 bp de DNA flanqueante sobre cada extremidade homóloga às regiões a montante e a jusante do sítio de inserção do *lamB* loop 9 (loop 9 up e loop 9 down, respectivamente). O fragmento foi introduzido em células de *S. enteritidis* expressando enzimas Red recombinase e foram selecionadas colônias de Km^r. Depois de triagem de umas poucas colônias por PCR de colônia, clones positivos foram sequenciados para a sequência sítio I-SceI / Km^r inserida desejada, e o mutante identificado foi selecionado e designado como SE164.

Substituição Genômica de I-SceI/ Km^r com TRAP-CD154s

A segunda etapa de mutação requeria construindo um fragmento de PCR, referido como PCR-B e mostrado na Figura 2B, consistindo na sequência de inserção final, os TRAP-CD154s, flanqueados por fragmentos homólogos *lamB*. Amplicons PCR-B não têm marcador de seleção e devem ser contra-selecionados depois de substituição pela mutação prévia sítio I-SceI / Km^r em SE164. Plasmídeo pBC-I-SceI codifica o gene Cm^r e a enzima I-SceI, a qual cortará o genoma no sítio I-SceI de SE164. Portanto, pBC-I-SceI foi eletroporado em SE164 junto com PCR-B. Depois de recombinação de PCR-B para substituir PCR-A, clones positivos foram escolhidos com base na capacidade para crescer sobre cloranfenicol mas não sobre canamicina. Depois de sequenciamento de DNA de mutantes para confirmar recombinação de PCR-B com sucesso, as cepas foram designadas Se-

quência 1, Sequência 2 e Sequência 3. Dez clones aleatórios para cada uma das inserções TRAP-CD154 foram usadas para PCR com lam 3f e lam 3r e em seguida digeridos usando sítios de enzimas de restrição únicos para cada sequência de inserção e 100% de clones testados por digestão foram positivos para a sequência de mutação desejada. Resultados de sequenciamento demonstraram que a inserção de TRAP-CD154 foi exatamente dentro da região do loop 9 sem a adição de nucleotídeos estranhos em cada caso. Os insertos das vacinas TRAP-CD154 são como se segue: TRAP-CD154 (SEQ ID Nº: 33); TRAP-US-CD154 (SEQ ID Nº: 34); TRAP-DS-CD154 (SEQ ID Nº: 35).

Exemplo 2. Atenuação de mutantes / insertos TRAP-CD154.

Foi obtida atenuação de SE13A por mutação por eliminação do gene *aroA* e/ou o gene *htrA*. Mutação do gene *aroA*, um gene chave no caminho do ácido corísmico de bactérias, resulta em uma grave deficiência metabólica a qual afeta sete caminhos bioquímicos separados. Mutação do gene *htrA* reduz a capacidade celular de suportar exposição a temperaturas baixas e elevadas, baixo pH, e agentes oxidativos e prejudiciais ao DNA e reduz a virulência das bactérias.

Para obter mutações por eliminação em SE13A, a sequência genética alvo no genoma bacteriano de *S. enteritidis* foi substituída com a sequência genética resistente a canamicina. Isto foi completado usando PCR de extensão de sobreposição e eletroporação dos produtos de PCR conforme descrito acima. O gene de resistência a canamicina foi direcionado para dentro da região genômica contendo os genes de interesse (*aroA* ou *htrA*) flanqueando o gene de resistência a canamicina com 200 a 300 pares de bases de sequências homólogas aos genes de interesse. Uma vez que foram obtidos mutantes resistentes a canamicina, as mutações de eliminação *aroA* e *htrA* foram confirmadas por sequenciamento de DNA. Cepas de *Salmonella aroA*- e *htrA*- análogas foram depositadas junto à American Type Culture Collection em 13 de setembro de 2006 (Depósito No. PTA-7872 e Depósito No. PTA-7873, respectivamente). As cepas atenuadas foram testadas previamente *in vivo* com respeito ao tempo de clearance. Am-

bas as cepas atenuadas tiveram tempos de clearance mais rápidos do que a cepa selvagem 13A, mas ambas foram capazes de colonizar o fígado, baço, e amígdalas cecais de frangos depois de infecção oral. Foram isoladas cepas atenuadas compreendendo os TRAP-CD154s e carecendo de tanto *aroA* quanto *htrA*.

Exemplo 3. Proteção de pintos contra mortalidade depois de infecção por *Eimeria*

Pintos no dia da eclosão (n = 280) foram vacinados por via oral com cerca de 1×10^8 cfu dos isolados de *Salmonella* compreendendo os três polinucleotídeos distintos codificando os polipeptídeos TRAP de SEQ ID N°: 1 a 3 ou controle de salina. Aos 21 dias de idade, os pintos foram estimulados por via oral com 10^4 oocistos esporulados de *Eimeria maxima*. Os pintos foram monitorados diariamente pós estímulo. Conforme representado na Figura 3, a mortalidade dos pintos no dia 5 pós estímulo foi reduzida comparada com animais não-vacinados independente da cepa de vacina administrada. A mortalidade foi como se segue: TRAP (SEQ ID N°: 1) 7/43 (16,3%); TRAP US (SEQ ID N°: 2) 1/46 (2,2%); TRAP DS (SEQ ID N°: 3) 6/43 (11%); Controle (não vacinados) 10/46 (21,7%). Surpreendentemente, os pintos vacinados com uma *Salmonella* compreendendo polipeptídeo TRAP de SEQ ID N°: 2 demonstraram mortalidade acentuada e significativamente reduzida comparada com pintos controle não-vacinados ($P < 0,001$). Foi realizada necrópsia e indicou que toda a mortalidade estava relacionada com a infecção por *Eimeria maxima*.

Em um experimento de repetições, a mortalidade nas aves vacinadas (6/48) foi significativamente menor do que nos controles (17/50) e o desempenho foi melhor nos frangos vacinados, mas a diferença não foi significativa.

Além disso, foi coletado soro de aves imunizadas e foi realizado um ELISA para TRAP. Uma robusta reação de anticorpos TRAP específica foi gerada nas aves vacinadas com TRAP-US (SEQ ID N°: 2).

Exemplo 4. Morbidez associada com vacinação é limitada

Para avaliar a eficácia de TRAP US-CD154 (SEQ ID N°: 34) co-

mo uma vacina candidata potencial, um estudo similar foi completado para investigar morbidez associada com vacinação. Frangos a serem grelhados foram vacinados por via oral com 1×10^8 cfu/ ave da vacina de *Salmonella* com TRAP US e inserto CD154 (SEQ ID Nº: 34) ou pseudo vacinados com salina. A prova de coccídios foi realizada com oócitos esporulados de *Eimeria maxima* (10^5 oócitos esporulados/ ave) em três semanas pós-vacinação. O ganho de peso corporal e lesões foram avaliados 7 dias pós- estímulo. As aves imunizadas apresentaram uma melhora significativa ($p < 0,01$) na performance. As aves imunizadas tiveram um ganho de peso de cerca de 31% comparadas com controles não vacinados. Deste modo, vacinação com uma vacina à base de *Salmonella* compreendendo um polipeptídeo TRAP e um polipeptídeo de CD154 capaz de ligação de CD40 pode proteger aves contra morbidez e mortalidade associada com infecção por *Eimeria*.

REIVINDICAÇÕES

1. Vacina, caracterizada pelo fato de que compreende um vetor que compreende uma primeira sequência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo da proteína anônima relacionada a trombospondina (TRAP) que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3.

2. Vacina de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente uma segunda sequência de polinucleotídeos codificando um polipeptídeo de CD154 capaz de se ligar a CD40, o polipeptídeo de CD154 tendo menos de 50 aminoácidos e compreendendo aminoácidos 140-149 de SEQ ID NO: 4 ou um homólogo do mesmo.

3. Vacina de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de CD154 compreende SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9.

4. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 3, caracterizada pelo fato de que a vacina compreende mais de uma cópia da primeira sequência de polinucleotídeos, mais de uma cópia da segunda sequência de polinucleotídeos, ou ambas.

5. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizada pelo fato de que a primeira sequência de polinucleotídeos é encadeada *in frame* à segunda sequência de polinucleotídeos.

6. Vacina de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o vetor é selecionado do grupo consistindo em um vírus, uma bactéria, e um lipossoma.

7. Vacina de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o vetor é uma bactéria.

8. Vacina de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a bactéria compreende o polipeptídeo TRAP sobre sua superfície.

9. Vacina de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizada pelo fato de que a bactéria é selecionada dentre o grupo consistindo na espécie *Salmonella*, da espécie *Bacillus*, da espécie *Escherichia*, e da

espécie *Lactobacillus*.

10. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que o primeiro polinucleotídeo é inserido dentro de uma sequência de polinucleotídeos codificando uma porção externa de uma proteína transmembrana.

11. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que é para uso em um método para reforçar a reação imune contra um parasita Apicomplexano em um indivíduo, o método compreendendo administrar ao indivíduo a vacina em uma quantidade eficaz para reforçar a reação imune do indivíduo ao parasita Apicomplexano.

12. Vacina de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que é administrada por um método selecionado do grupo consistindo em oral, intranasal, parenteral, e in ovo.

13. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 12, caracterizada pelo fato de que a reação imune reforçada compreende uma reação de anticorpos reforçada ou uma reação de células T reforçada.

14. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizada pelo fato de que o indivíduo é membro de uma espécie de aves domésticas ou um mamífero.

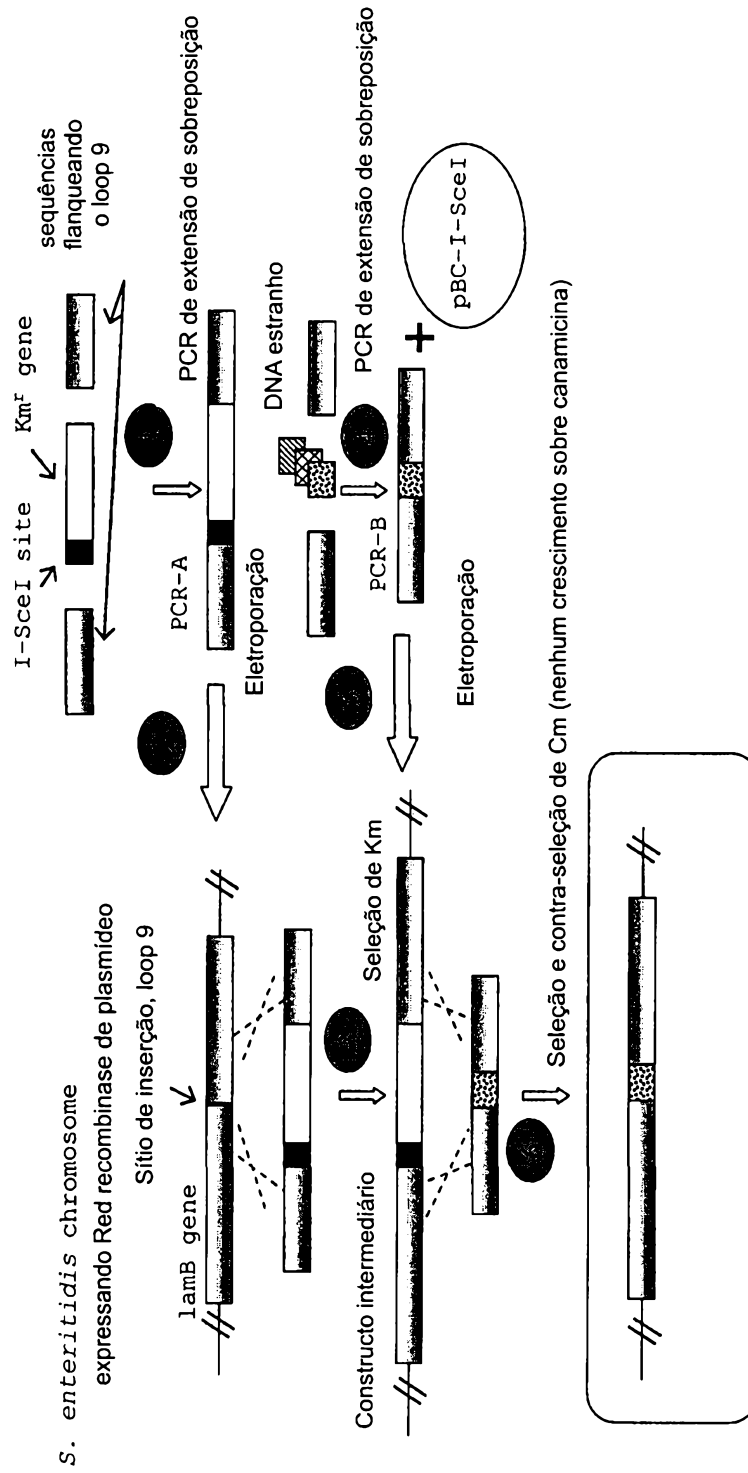
15. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, caracterizada pelo fato de que o vetor compreendendo a vacina é morto antes da administração ao indivíduo.

16. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, caracterizada pelo fato de que o vetor compreendendo a vacina não é capaz de replicação no indivíduo.

17. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 16, caracterizada pelo fato de que o parasita Apicomplexano é selecionado dentre o grupo consistindo em *Eimeria*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, e *Cryptosporidium*.

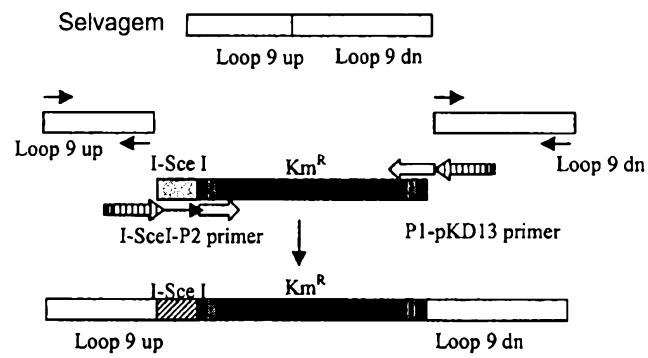
18. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que é para uso em um método de reduzir morbidez associada com infecção com um parasita Apicomplexano em um

indivíduo, o método compreendendo administrar ao indivíduo a vacina em uma quantidade eficaz para reforçar a reação imune do indivíduo ao parasita Apicomplexano.



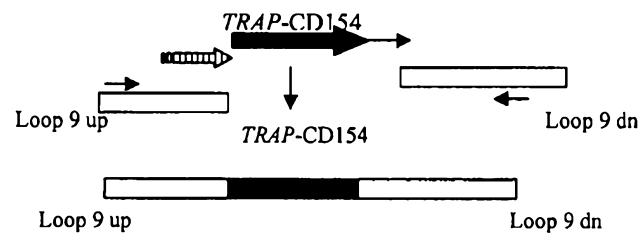
Cromossomo de *S. enteritidis* expressando sequência estranha

FIG. 1



PCR-A

FIG. 2A



PCR-B

FIG. 2B

Mortalidade em 5 dias pós- estímulo de frangos a serem grelhados estimulados aos 21 dias de idade com 104 oocistos esporulados de *E. maxima* / ave.

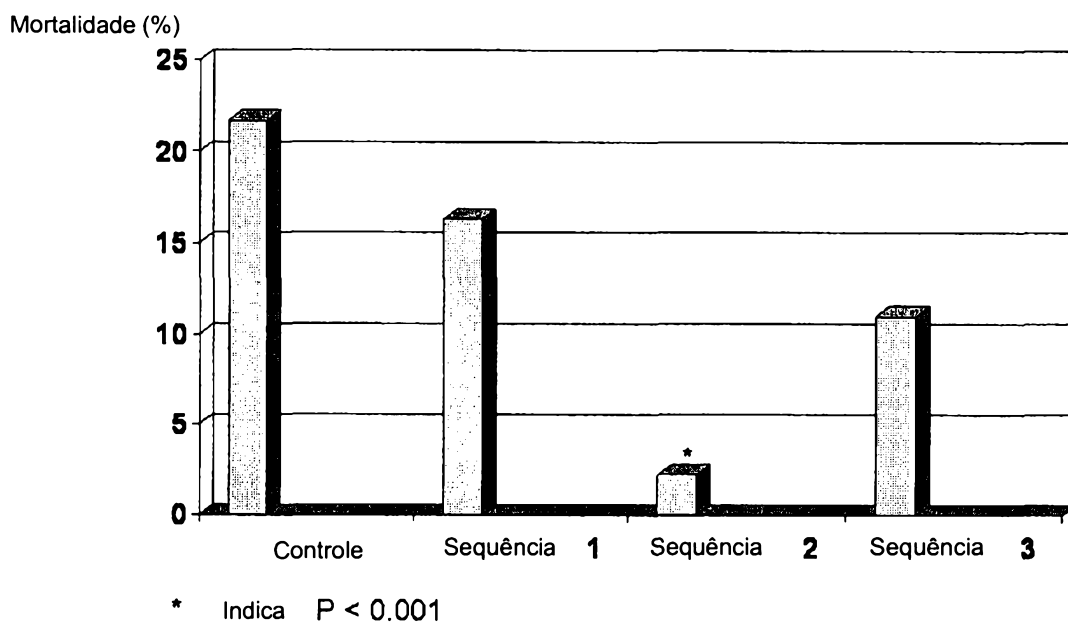


Figura 3: Neste experimento, pintos no dia da eclosão ou foram não vacinados (controle) ou foram vacinados com vetor de *Salmonella* expressando a Sequência 1, 2, ou 3 da proteína TRAP de *Eimeria maxima* conforme descrito no anexo. Todos os pintos foram estimulados com exatamente a mesma dose de *Eimeria maxima* no dia 21. Necrópsia confirmou que toda a mortalidade estava relacionada com infecção por *Eimeria maxima*. A mortalidade foi notavelmente e significativamente reduzida no grupo vacinado com o vetor expressando a sequência 2.