



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ A61K 39/002; C12N 15/00; A61K 39/012 (13) B



1-0052475

(21) 1-2015-03307 (22) 14/02/2014
(86) PCT/US2014/016359 14/02/2014 (87) WO 2014/127185 21/08/2014
(30) 61/764,681 14/02/2013 US
(45) 27/10/2025 451 (43) 25/03/2016 336A
(73) 1. THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS (US)
2404 North University Avenue, Little Rock, AR 72207, United States of America
2. THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM (US)
3369 TAMU, College Station, Texas 77843-3369, United States of America
(72) BARTA, John, R. (CA); BERGHMAN, Luc (US); BIELKE, Lisa (US); HARGIS,
Billy (US); SHIVARAMAIAH, Srichaitanya (IN); FAULKNER, Olivia, B. (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) VẬT TRUYỀN VACCIN CHỨA TRÌNH TỰ POLYNUCLEOTIT DÙNG ĐỂ
TĂNG CƯỜNG ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH VỚI KÝ SINH TRÙNG APICOMPLEXA
VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA VẬT TRUYỀN VACCIN NÀY

(21) 1-2015-03307

(57) Sáng chế đề cập đến vật truyền vaccin và phương pháp sử dụng vật truyền vaccin này để tăng cường đáp ứng miễn dịch với ký sinh trùng Apicomplexa và giảm tỷ lệ bệnh hoặc tỷ lệ chết liên quan đến sự lây nhiễm tiếp theo. Các vật truyền vaccin này bao gồm polynucleotit mã hóa polypeptit Rhomboit và bao gồm tùy ý polypeptit miễn dịch-kích thích theo cách thích hợp biểu hiện trên bề mặt của vật truyền vaccin.

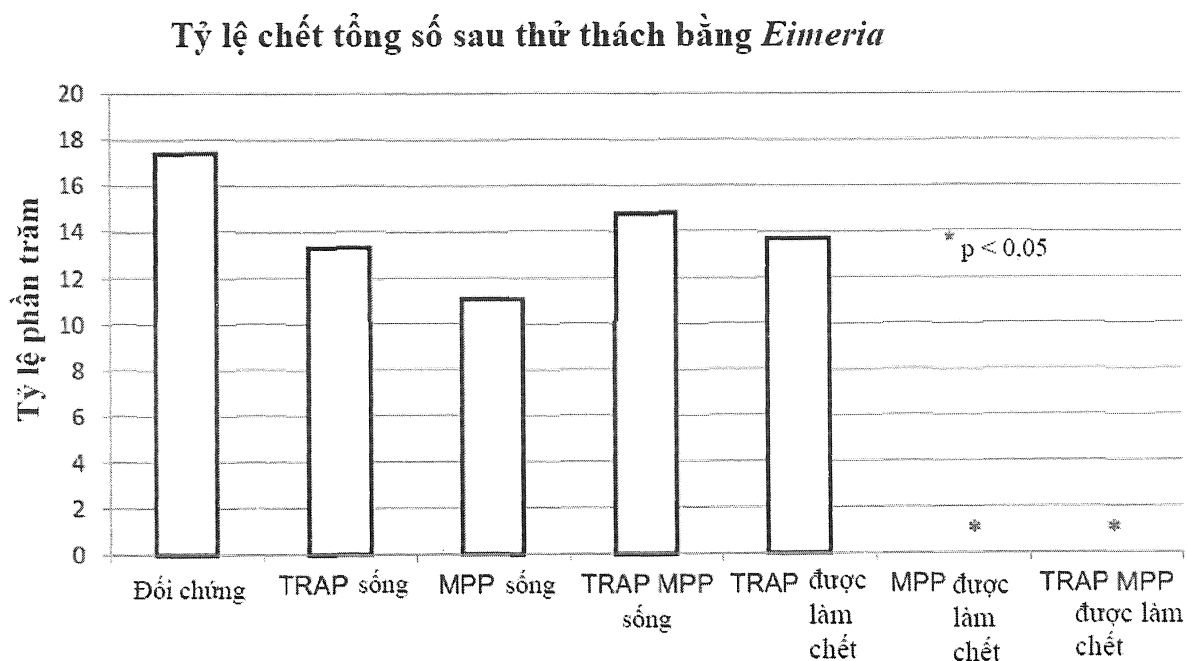


Fig. 5

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh cầu trùng, là bệnh lây nhiễm ở gia cầm, lợn, và gia súc gây ra bởi các ký sinh trùng động vật nguyên sinh Apicomplexa (*Eimeria* spp. và các ký sinh trùng liên quan) xuất hiện các vấn đề trên toàn cầu. Bệnh cầu trùng nằm trong số mười bệnh lây nhiễm hàng đầu ở gia cầm xét theo tác động về mặt kinh tế của nó đối với ngành công nghiệp gia cầm với sự tổn thất sản lượng ước tính lên đến 2 tỷ đôla Mỹ mỗi năm. Các ký sinh trùng Apicomplexa khác cũng gây bệnh, bao gồm *Plasmodium*, *Cryptosporidium* và *Toxoplasma*, là tác nhân gây bệnh sốt rét, bệnh nhiễm ký sinh trùng *Cryptosporidium* và bệnh nhiễm ký sinh trùng *Toxoplasma*, một cách tương ứng.

Các dấu hiệu điển hình của bệnh cầu trùng bao gồm mất cảm giác thèm ăn nhanh chóng, giảm trọng lượng, tiêu chảy và chết trong thời gian ngắn. Sự bùng phát bệnh trong đàn xuất hiện khi tiếp xúc với lượng mầm bệnh cao và trong phần lớn các trường hợp, bệnh cầu trùng làm cho gia cầm có khả năng bị nhiễm khuẩn thứ phát. Các phương pháp truyền thống để kiểm soát bệnh bao gồm sử dụng thuốc kháng sinh và chất hóa trị liệu. Tuy nhiên, việc sử dụng liên tục, sẽ dẫn tới vấn đề về kháng thuốc. Việc sử dụng thuốc kháng sinh cũng làm giảm sự chấp nhận của xã hội đối với thịt gia cầm. Chủng ngừa là một biện pháp hợp lý vì nó có khả năng mang lại sự bảo vệ lâu dài, thường là trong suốt cuộc đời của gà thương mại.

Phần lớn các vaccin kháng *Eimeria* có bán trên thị trường đều dựa trên cơ sở liều thấp có kiểm soát của các ký sinh trùng *Eimeria* có độc lực đầy đủ về cơ bản nhưng miễn cảm với thuốc. Việc chủng ngừa bằng các vaccin dựa trên cơ sở *Eimeria* hiện có gây ra tỷ lệ bệnh đáp ứng với vaccin và tổn thất kinh tế đáng kể trong các đàn được chủng ngừa. Do vậy vaccin kháng *Eimeria* hiệu quả và có độc lực thấp là cần thiết. Vaccin hiệu quả với *Eimeria* dựa trên cơ sở các đích gây miễn dịch bảo toàn cũng có thể hữu dụng làm vaccin kháng các ký sinh trùng Apicomplexa khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất vật truyền vaccin chứa trình tự polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit Rhomboit của Apicomplexa và phương pháp sử dụng vật truyền vaccin này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vật truyền vaccin chứa polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit Rhomboit của Apicomplexa hoặc mảnh gây miễn dịch của chúng và trình tự polypeptit thứ hai mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch. Polypeptit Rhomboit của Apicomplexa và polypeptit kích thích miễn dịch được biểu hiện theo cách thích hợp trên bề mặt của vật truyền vaccin. Polypeptit Rhomboit của Apicomplexa có thể bao gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, mảnh gây miễn dịch của ít nhất một trong số SEQ ID NO: 1-4, 37-38 hoặc tổ hợp của SEQ ID NO: 1-4 và 37-38. Polypeptit kích thích miễn dịch có thể là polypeptit CD154 có khả năng liên kết CD40 hoặc polypeptit HMGB1. Các polypeptit CD154 bao gồm ít hơn 50 axit amin và chứa các axit amin 140-149 của CD154 hoặc thể tương đồng của chúng.

Theo một khía cạnh khác, vật truyền vaccin chứa polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit Rhomboit của Apicomplexa là SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, mảnh gây miễn dịch của ít nhất một trong số SEQ ID NO: 1-4 hoặc 37-38 hoặc tổ hợp của SEQ ID NO: 1-4 hoặc 37-38. Polypeptit Rhomboit của Apicomplexa có thể được biểu hiện trên bề mặt của vật truyền vaccin.

Các vật truyền vaccin theo sáng chế có thể là vật truyền virus, nấm men, vi khuẩn, hoặc liposom. Dược phẩm có thể chứa vật truyền vaccin được nêu trong bản mô tả này và chất mang dược dụng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng lại ký sinh trùng Apicomplexa ở đối tượng bằng cách sử dụng vật truyền vaccin được nêu trong bản mô tả cho đối tượng này. Đáp ứng miễn dịch tăng cường này có thể là đáp ứng kháng thể tăng cường, đáp ứng tế bào T tăng cường hoặc tổ hợp của chúng.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm tỷ lệ bệnh và tỷ lệ chết liên quan đến sự lây nhiễm ký sinh trùng Apicomplexa ở đối tượng bằng cách

sử dụng vật truyền vacxin như được nêu trong bản mô tả này cho đối tượng này. Vật truyền vacxin này có khả năng làm giảm tỷ lệ bệnh và tỷ lệ chết liên quan đến sự lây nhiễm ký sinh trùng Apicomplexa tiếp theo ở đối tượng được cho sử dụng vật truyền vacxin so với đối chứng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ minh họa thể hiện độ tương đồng của trình tự MPP giữa một số các ký sinh trùng Apicomplexa. Trình tự MPP liên ứng có độ tương tự cao trong các trình tự axit amin ở các Apicomplexa. Các vị trí không đồng nhất được ký hiệu bằng chữ X trong trình tự liên ứng mà được thể hiện trên dòng đầu của Fig. này và là SEQ ID NO: 38. Các trình tự *Toxoplasma gondii* (bốn dòng đầu tiên dưới trình tự liên ứng) có độ đồng nhất là 100% với trình tự MPP là SEQ ID NO: 2 từ *Eimeria maxima*. Hai trình tự dưới cùng là thể tương đồng từ *Neospora caninum* (SEQ ID NO: 3) và *Eimeria tenella* (SEQ ID NO: 4), một cách tương ứng.

Fig. 2 là sơ đồ minh họa cấu trúc vật truyền vacxin được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Fig. 3 là biểu đồ dạng cột thể hiện trọng lượng cơ thể (gam) của gà sau tám ngày nhiễm *Eimeria maxima* sau khi được tiêm chủng bằng vật truyền vacxin được chỉ định mà biểu hiện các trình tự được chỉ định. Sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa các nhóm điều trị được ký hiệu bằng các chữ cái khác nhau.

Fig. 4 là biểu đồ dạng cột thể hiện trọng lượng cơ thể (gam) của gà còn sống sau 29 ngày gây nhiễm thử thách bằng *Eimeria maxima* sau khi được tiêm chủng bằng vật truyền vacxin được chỉ định mà biểu hiện các trình tự được chỉ định. Sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa các nhóm điều trị được thể hiện bằng các giá trị p thực tế và dấu hoa thị (*).

Fig. 5 là biểu đồ dạng cột thể hiện tỷ lệ chết tính theo phần trăm khi đối mặt với sự gây nhiễm thử thách có độc lực bằng *Eimeria maxima* tại thời điểm tám ngày sau khi gây nhiễm thử thách bằng *Eimeria maxima* sau khi được tiêm chủng bằng vật truyền vacxin được chỉ định mà biểu hiện các trình tự được chỉ định. Sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) được ký hiệu bằng dấu hoa thị (*).

Mô tả chi tiết sáng chế

Vaccin kháng bệnh cầu trùng thông thường thường dựa trên cơ sở các ký sinh trùng sống/được làm yếu được cung cấp trong số được kiểm soát. Tuy nhiên, nguy hiểm của sự lây nhiễm không được loại trừ vì các ký sinh trùng có thể sống được và có khả năng gây bệnh. Thêm vào đó, phí tổn gây ra các loại vaccin này cực cao vì nó bao gồm việc chấp nhận các ký sinh trùng qua gia cầm sống, thu thập chúng ở các khoảng thời gian đều đặn và đảm bảo mạch đi qua mát không ngắt quãng từ quá trình sản xuất để sử dụng ở trại ương giống hoặc trên nông trại. Với chủng ngừa là phương pháp kiểm soát khủng hoảng, ứng dụng của các vaccin tái tổ hợp có thể tăng cường tính hữu hiệu toàn diện của các vaccin dựa trên cơ sở bệnh cầu trùng mà hạ phí tổn sản xuất.

Loài *Eimeria* miễn dịch cao và có khả năng kích thích các đáp ứng miễn dịch ở vật chủ cứng cáp. Tính đặc hiệu rộng của kháng nguyên mà là một phần của sinh vật nhân chuẩn này được chuyên môn hóa chức năng cao và là các đích gây theo cách thích hợp để phát triển vaccin tái tổ hợp. Thoa trùng và tiểu thể hoa cúc là các giai đoạn chuyển động nhất của ký sinh trùng và là nguyên nhân của sự bắt đầu và sự chống đỡ sự lây nhiễm hoạt động. Sự xâm nhập của các giai đoạn này vào tế bào biểu mô ruột là quy trình cần thiết để ký sinh trùng tiếp tục chu kỳ sống của nó trong các tế bào chủ. Hệ cơ quan tế bào chuyên môn hóa cao được đặt vào vị trí ở đầu trước (đỉnh) của ký sinh trùng bao gồm việc vận chuyển nhiều protein là cần thiết cho sự di chuyển của các giai đoạn chuyển động này từ lumen ruột vào lớp biểu mô. Phức hệ ở đỉnh này gồm nhiều cơ quan tế bào tiết bao gồm số lượng lớn các microneme vận chuyển môi trường của các protein đến bề mặt zoite Apicomplexa chuyển động để hỗ trợ chức năng nhu động cần thiết.

Trong số một số protein liên quan đến microneme đã được mô tả đầy đủ, protein kết dính liên quan thrombospondin (thrombospondin-related adhesive protein - TRAP) được sử dụng như kháng nguyên tái tổ hợp thành công trong các hệ thống *Salmonella* tái tổ hợp và *Bacillus* làm vật truyền là vaccin ứng cử. Xem đơn Mỹ số 2011/0111015, được tổ hợp trong bản mô tả bằng cách viện dẫn toàn bộ. Nhiều protein microneme có phương thức hoạt động tương tự trong đó chúng được giải phóng từ phức hệ microneme ở đầu trước của thoa trùng khi chúng tiếp cận tế bào chủ và hoạt động như liên kết giữa ký sinh trùng và bất cứ nền nào mà chúng ở trên. Sau đó protein microneme được di

chuyển qua bề mặt của ký sinh trùng sau, bằng cách ấy dịch chuyển ký sinh trùng gần hơn với tế bào chủ. Dạng nhu động trượt này là dạng thông thường ở tất cả các ký sinh trùng Apicomplexa. Khi protein microneme được di chuyển đến đầu sau của ký sinh trùng, nó cần được tách và được giải phóng từ bề mặt của ký sinh trùng để hoàn tất một cách thành công quy trình xâm nhập. Chức năng này được thực hiện bằng họ proteaza biểu hiện cấu tạo trong hoặc trên màng tế bào của ký sinh trùng. Quy trình phân bào xuất hiện trong tế bào và là yêu cầu tuyệt đối để truyền sự lây nhiễm.

Một biện pháp mới với kiểu vaccin tái tổ hợp bao gồm việc nhắm đích proteaza này và can thiệp vào quy trình phân bào/xâm nhập. Họ proteaza được tham gia vào quy trình phân bào được gọi là proteaza Rhomboit và được mô tả cực đầy đủ ở loài *Toxoplasma* với các thể tương đồng của *Eimeria* và Apicomplexa khác. Proteaza Rhomboit (ROM4 và ROM5, MPP) can dự vào trung tâm phân bào của các protein microneme và chia sẻ độ tương đồng cao giữa các ký sinh trùng Apicomplexa khác nhau. Giả thuyết của chúng ta dựa trên tiền đề là liệu chúng ta có thể hướng đích miễn dịch proteaza, liên kết kháng thể sẽ can thiệp vào quy trình phân bào và bằng cách ấy làm giảm tính chuyển động của thoa trùng/tiểu thể hoa cúc. Để sự lây nhiễm thành công xuất hiện, sự phát triển ký sinh trùng trong tế bào là cần thiết và một biện pháp của chúng ta có thể rút ngắn việc xâm nhập tế bào vì vậy, can thiệp vào sự tạo thành chu kỳ sống. Một ưu điểm của việc nhắm đích MPP là tính bảo tồn của protein này qua nhiều loài Apicomplexa làm cho nó thành đích theo cách thích hợp không chỉ với *Eimeria*, mà còn với Apicomplexa khác.

Các vùng kháng nguyên được dự đoán của MPP (ROM5) được sắp xếp và kiểm tra độ tương đồng giữa sáu Apicomplexa khác nhau (Fig.1). Bẩy trình tự được so sánh là các trình tự như sau: *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), và MPP chèn từ *Eimeria maxima* của SEQ ID NO: 2. Các ký sinh trùng Apicomplexa theo cách thích hợp bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: loài *Eimeria*, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở *Eimeria tenella*, *Eimeria* tối đa, và *Eimeria brunetti*; loài *Toxoplasma gondii*; *Neospora caninum*; *Cryptosporidium*; và loài *Plasmodium*, bao

gồm nhưng không bị giới hạn ở *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium bệnh sốt rét*, *Plasmodium knowlesi*, và *Plasmodium vivax*.

Công nghệ AND tái tổ hợp cho phép vận dụng nhiều loài nấm men, vi khuẩn và virus tương đối dễ dàng. Một số vi sinh vật gây bệnh nhẹ hoặc không gây bệnh, nhưng có khả năng sinh ra đáp ứng miễn dịch vững chắc. Các vi sinh vật này thu hút các vật truyền vaccin để gọi ra đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên tái tổ hợp biểu hiện trong vật truyền. Vaccin được định hướng bằng các vi sinh vật có thể giả sự lây nhiễm tự nhiên, giúp gây ra miễn dịch ở niêm mạc vững chắc và có tính bền kéo dài, và có thể tương đối rẻ để gây ra và sử dụng. Ngoài ra, các vật truyền này có thể thường mang nhiều hơn một kháng nguyên và có tiềm năng để cung cấp sự bảo vệ kháng lại các tác nhân đa nhiễm.

Theo một khía cạnh, vật truyền vaccin chứa trình tự polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit Rhomboit của Apicomplexa là SEQ ID NO: 1-4, 37-38, mảnh gây miễn dịch của chúng hoặc tổ hợp của chúng được đề xuất. Theo phương án khác, vật truyền vaccin có thể bao gồm polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit Rhomboit của Apicomplexa và polynucleotit thứ hai mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch được đề xuất. Polypeptit Rhomboit và polypeptit kích thích miễn dịch tùy ý được biểu hiện trên bề mặt của vật truyền vaccin. Polypeptit Rhomboit này có thể chứa protein có độ dài đầy đủ (SEQ ID NO: 39) hoặc mảnh gây miễn dịch như các đoạn được đề cập trong SEQ ID NO: 1-4 và 37-38. Ví dụ, polypeptit Rhomboit có thể chứa, có thể bao gồm về cơ bản là hoặc có thể bao gồm là SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 hoặc mảnh gây miễn dịch của SEQ ID NO bất kỳ trong số này. Tổ hợp của các đoạn này cũng có thể được sử dụng trong vật truyền vaccin. Vật truyền vaccin có thể bao gồm SEQ ID NO: 1-4 hoặc 37-38. Vật truyền vaccin đơn có thể bao gồm nhiều bản sao của đoạn đơn cũng được.

Mảnh gây miễn dịch của polypeptit Rhomboit có thể là trình tự dài ít nhất 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18 hoặc 20 axit amin và có phần trăm độ đồng nhất là ít nhất 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các đoạn của SEQ ID NO: 1-4 hoặc 37-38 được đề cập trong bản mô tả. Không bị giới hạn bởi lý thuyết, các vật truyền vaccin được đề cập trong bản mô tả được cho là làm giảm tỷ lệ bệnh và tỷ lệ chết liên quan đến sự lây nhiễm *Eimeria* bằng cách kích thích đáp ứng kháng thể có khả năng

phong bế sự xâm nhập của các ký sinh trùng vào các tế bào. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực nhận ra là các epitop của các tế bào B về bản chất thường ưa nước và dữ liệu này có thể được sử dụng để tạo các mảnh gây miễn dịch với các polypeptit của SEQ ID NO: 1-4 và 37-38 được đề cập trong bản mô tả. Biểu đồ độ ưa nước của SEQ ID NO: 2 biểu lộ ba vùng ưa nước của peptit và ba epitop tế bào B tiềm năng bao gồm axit amin 1-11, 18-27 và 31-43 của SEQ ID NO: 2. Các đoạn axit amin này tương ứng với các axit amin 7-16 của SEQ ID NO: 3 và 37 và axit amin 12-21 của SEQ ID NO: 4. Như được thể hiện bằng hai trình tự liên ứng của SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 38, axit amin tương ứng với 18-27 của SEQ ID NO: 2 được bảo toàn cao qua các loài và các giống của các ký sinh trùng Apicomplexa. Đáp ứng miễn dịch với epitop bảo toàn cao này có thể cho phép để lai các loài hoặc thậm chí lai các giống miễn dịch từ vaccin đơn.

Vaccin bao gồm chế phẩm bất kỳ chứa polynucleotit mã hóa polypeptit kháng nguyên có khả năng gợi ra đáp ứng miễn dịch với polypeptit. Vật truyền vaccin là chế phẩm có thể được thiết kế để mang kháng nguyên hoặc các polypeptit kích thích miễn dịch và cũng có thể chứa tá dược hoặc được sử dụng cùng tá dược để còn tăng đáp ứng miễn dịch với ký sinh trùng và cung cấp sự bảo vệ tốt hơn từ tỷ lệ bệnh và tỷ lệ chết liên quan đến sự lây nhiễm tiếp theo. Việc sử dụng vật truyền, như vật truyền vi khuẩn, cho việc tiêm vaccin và việc gây ra đáp ứng miễn dịch kháng *Eimeria* hoặc các ký sinh trùng Apicomplexa khác như *Plasmodium* (tác nhân gây bệnh sốt rét), *Toxoplasma* và *Cryptosporidium* được công bố. Đáp ứng miễn dịch sau khi sử dụng vật truyền vaccin cần không hẳn là bảo vệ hoàn toàn, mà có thể giảm bớt tỷ lệ bệnh hoặc tỷ lệ phần trăm tỷ lệ chết (tức là khả năng tử vong) liên quan đến sự lây nhiễm tiếp theo.

Các polynucleotit mã hóa các polypeptit kháng nguyên Rhomboit là SEQ ID NO: 1-4, 37-38 hoặc các đoạn của chúng và các kháng nguyên khác từ số sinh vật gây bệnh bất kỳ có thể được chèn vào vật truyền và biểu hiện trong vật truyền. Biểu hiện của các polynucleotit này bằng vật truyền sẽ cho phép việc gây ra các polypeptit kháng nguyên tuân theo sự miễn dịch của đối tượng. Các polynucleotit có thể được chèn vào nhiễm sắc thể của vật truyền hoặc được mã hóa trên các plasmit hoặc ADN ngoài nhiễm sắc thể khác. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thấy rõ là nhiều hệ phương pháp hiện hành đạt được biểu hiện của các polynucleotit trong vật truyền như *Salmonella*

hoặc *Bacillus*. Các polynucleotit có thể có kết nối sử dụng với chất hoạt hóa (ví dụ, chất hoạt hóa cơ bản, chất hoạt hóa có thể suy ra, v.v.) bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Một cách thích hợp, các polynucleotit mã hóa các kháng nguyên Rhomboit được chèn vào vật truyền, ví dụ, vật truyền vi khuẩn, như polynucleotit biểu hiện.

Các polynucleotit mã hóa các kháng nguyên Rhomboit có thể được chèn trong cấu trúc của polynucleotit mã hóa protein xuyên màng. Polynucleotit mã hóa kháng nguyên Rhomboit được chèn vào trình tự polynucleotit vật truyền để cho phép biểu hiện của kháng nguyên Rhomboit trên bề mặt vật truyền. Ví dụ, polynucleotit mã hóa kháng nguyên Rhomboit có thể được chèn trong cấu trúc vào polynucleotit vật truyền ở vùng mã hóa vùng vòng ngoài của protein xuyên màng sao cho trình tự polynucleotit vật truyền ở lại trong cấu trúc. Theo một phương án, polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit Rhomboit có thể được chèn vào vòng 9 của gen *lamB* của *Salmonella*.

Theo phương án khác, polynucleotit thứ nhất được chèn vào hoặc ở đầu lộ bề mặt của protein bám dính vào thành tế bào, nhưng không là protein xuyên màng. Protein có thể là protein được tiết ra mà được thả neo hoặc bám dính vào thành tế bào qua neo protein hoặc lipid. Theo ví dụ thực hiện sáng chế, polypeptit MPP (SEQ ID NO: 2) được chèn ở đầu 3' của protein liên kết fibronectin (FbpB) là *Bacillus subtilis*. Theo cách khác, polynucleotit thứ nhất mã hóa kháng nguyên Rhomboit có thể được chèn vào polynucleotit mã hóa polypeptit được tiết ra.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thấy rõ là polynucleotit mã hóa kháng nguyên Rhomboit có thể được chèn trong nhiều polynucleotit vật truyền để cung cấp biểu hiện và sự trình bày của kháng nguyên Rhomboit với các tế bào miễn dịch của đối tượng được điều trị vaccin. Polynucleotit mã hóa kháng nguyên Rhomboit có thể được bao gồm trong bản sao đơn hoặc nhiều hơn một bản sao. Nhiều bản sao có thể được chèn trong vị trí đơn hoặc nhiều hơn một vị trí. Theo cách khác, nhiều epitop như tổ hợp của kháng nguyên Rhomboit được đề cập trong bản mô tả là SEQ ID NO: 1-4 và 37-38 hoặc tổ hợp của epitop này với các epitop Apicomplexa khác như TRAP hoặc các epitop từ các tác nhân gây bệnh khác có thể được chèn vào vật truyền ở cùng hoặc nhiều hơn một vị trí.

Theo cách thích hợp là polynucleotit thứ nhất mã hóa một phần polypeptit hình thoi, toàn bộ polypeptit Rhomboit hoặc nhiều hơn một epitop từ polypeptit hình thoi. Sự tổ hợp của các epitop từ nhiều hơn một polypeptit từ ký sinh trùng đơn hoặc tác nhân gây bệnh hoặc sự tổ hợp của các epitop từ các tác nhân gây bệnh liên quan dự phòng rõ ràng. Polynucleotit có thể được chèn vào vật truyền và có thể được chèn như protein dung hợp chứa nhiều epitop đơn. Theo ví dụ thực hiện sáng chế, các SEQ ID NO: 2 và 15 (MPP-HMGB1) hoặc các SEQ ID NO: 2, 40 và 15 (MPP-TRAP-HMGB1) được tổ hợp vào vật truyền *Bacillus*. Theo cách thích hợp là, phần polypeptit Rhomboit được chèn vào vật truyền là đoạn kháng nguyên. Đoạn kháng nguyên là peptit hoặc polypeptit có khả năng gọi ra đáp ứng miễn dịch của tế bào hoặc thể dịch hoặc có khả năng làm giảm tỷ lệ bệnh hoặc tỷ lệ chết liên quan đến sự lây nhiễm tiếp theo với ký sinh trùng.

Polypeptit kháng nguyên hoặc epitop bao gồm polypeptit bất kỳ miễn dịch. Các polypeptit kháng nguyên bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, kháng nguyên liên quan tác nhân gây bệnh, liên quan dị ứng nguyên, liên quan u hoặc liên quan bệnh. Các tác nhân gây bệnh bao gồm các tác nhân gây bệnh virus, ký sinh, nấm và vi khuẩn cũng như các tác nhân gây bệnh protein như prion. Các polypeptit kháng nguyên có thể là các protein có độ dài đầy đủ hoặc các phần của chúng. Đã có từ lâu là sự công nhận hệ thống miễn dịch của nhiều protein dựa trên cơ sở số tương đối nhỏ axit amin, thường gọi là epitop. Các epitop có thể chỉ dài 4-8 axit amin. Vì vậy, các polypeptit kháng nguyên được nêu trong bản mô tả có thể là các protein có độ dài đầy đủ, các epitop dài bốn axit amin hoặc phần bất kỳ giữa các cực điểm này. Trong thực tế polypeptit kháng nguyên có thể bao gồm nhiều hơn một epitop từ tác nhân gây bệnh hoặc protein đơn. Các polypeptit kháng nguyên có thể có độ đồng nhất phần trăm ít nhất 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các SEQ ID NO được đề cập trong bản mô tả. Theo cách thích hợp là, đoạn kháng nguyên của kháng nguyên Rhomboit hoặc polypeptit có thể là bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, 10 hoặc nhiều axit amin, 15 hoặc nhiều axit amin hoặc 20 hoặc nhiều axit amin của trình tự protein có độ dài đầy đủ.

Nhiều bản sao của cùng epitop hoặc nhiều epitop từ cùng protein hoặc protein khác nhau có thể được bao gồm trong vật truyền vaccin. Các epitop trong vật truyền vaccin có thể liên quan và đồng đẳng để cho phép việc nhắm đích của nhiều tác nhân gây bệnh liên quan với vật truyền vaccin đơn. Được hình dung là một số epitop hoặc

kháng nguyên từ cùng tác nhân gây bệnh hoặc bệnh hoặc tác nhân gây bệnh hoặc bệnh khác nhau có thể được cho sử dụng tổ hợp vật truyền vaccin đơn để tạo đáp ứng miễn dịch kháng đa kháng nguyên được tăng cường. Các vật truyền vaccin tái tổ hợp có thể mã hóa kháng nguyên từ nhiều vi sinh vật gây bệnh, kháng nguyên liên quan đến virus hoặc u. Sử dụng các vật truyền vaccin có khả năng biểu hiện đa kháng nguyên có ưu điểm là kích thích miễn dịch kháng hai hoặc nhiều bệnh cùng thời điểm, cung cấp sự bảo vệ rộng hơn kháng nhiều chủng tác nhân gây bệnh đơn hoặc nhiều đáp ứng miễn dịch vững chắc kháng tác nhân gây bệnh đơn.

Theo ví dụ thực hiện sáng chế, kháng nguyên MPP (SEQ ID NO: 2) đồng biểu hiện trong một số vật truyền có polypeptit kháng nguyên thứ hai. Kháng nguyên khối lượng phân tử lớn, giai đoạn vô tính từ *Eimeria maxima* (EmTFP250) được chứng minh là đích để các kháng thể mẹ được gây ra bằng cách gây giống gà mái nhiễm ký sinh trùng động vật nguyên sinh này. Nghiên cứu trình tự axit amin của kháng nguyên tiết lộ thành phần mới của họ TRAP (protein vô danh liên quan thrombospondin (thrombospondin-related anonymous protein)), chứa 16 thrombospondin loại 1 lặp đi lặp lại và 31 miền liên kết canxi giống yếu tố phát triển ngoại bì. Xem U.S. Patent Publication No. 2011/0111015. EmTFP250 hoặc TRAP cũng chứa hai vùng phức hệ thấp, ưa nước giàu gốc axit glutamic và glyxin, và miền xuyên màng/đuôi dịch bào tương liên quan đến nhu động trượt ký sinh trùng bảo toàn cao trong các protein microneme Apicomplexa. Một số epitop tiềm năng được chọn và được nhận biết trong SEQ ID NO: 1-3 và 11 theo U.S. Patent Publication No. 2011/0111015 được sao lại trong bản mô tả là SEQ ID NO: 5-8. SEQ ID NO: 40 sử dụng theo ví dụ thực hiện sáng chế được đề cập trong bản mô tả và được xem như kháng nguyên TRAP cũng được. SEQ ID NO: 40 và SEQ ID NO: 6 khác nhau bởi axit amin đơn. Prolin ở vị trí 6 của SEQ ID NO: 6 được đổi với acginin ở cùng vị trí 6 của SEQ ID NO: 40. Sự thay đổi này được thực hiện để làm epitop dẻo và ưa nước hơn với đích gây là làm nó thành kháng nguyên tốt hơn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể làm các axit amin đơn khác thay đổi để tăng cường tính kháng nguyên trong phạm vi của sáng chế. Do tính bảo tồn của kháng nguyên này, biểu hiện của các epitop này bằng vật truyền có thể đem lại miễn dịch bảo vệ kháng nhiều ký sinh trùng Apicomplexa và việc sử dụng vật truyền vaccin chứa hai polypeptit kháng nguyên riêng biệt có thể đem lại đáp ứng miễn dịch vững chắc hơn.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thấy rõ là các polypeptit kháng nguyên từ các tác nhân gây bệnh khác có thể được sử dụng trong các vật truyền vaccin để tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng nhiều hơn một tác nhân gây bệnh bằng vaccin đơn. Sẽ là có lợi để sử dụng vaccin đơn định hướng kháng nhiều tác nhân gây bệnh. Vaccin có khả năng gợi ra đáp ứng miễn dịch với ký sinh trùng Apicomplexa, như *Eimeria*, khi tổ hợp với Cúm, *Salmonella*, *Campylobacter* hoặc các tác nhân gây bệnh khác được hình dung.

Ví dụ, polypeptit kháng nguyên thứ hai có thể là polypeptit cúm, theo cách thích hợp là polypeptit cúm H5N1 hoặc polypeptit liên quan đến nhiều chủng virus cúm như polypeptit của protein cúm M2. Miền ngoài của protein cúm A virus M2, được biết như M2e, nhô ra từ bề mặt của virus. Phần M2e của protein M2 chứa khoảng 24 axit amin. Polypeptit M2e thay đổi ít từ một chủng đến chủng tiếp theo trong cúm. Thực tế là, chỉ một số biến dị xuất hiện tự nhiên ở M2e được tách ra khỏi người bị nhiễm kể từ dịch cúm năm 1918. Ngoài ra, các virus cúm được tách ra khỏi vật chủ gia cầm và lợn có các trình tự khác nhau, vẫn chưa dự trữ, M2e. Đối với các ý kiến về trình tự polypeptit M2e được tách ra khỏi vật chủ người, gia cầm và lợn xem Liu et al., *Microbes and Infection* 7:171-177 (2005) and Reid et al., *J. Virol.* 76:10717-10723 (2002) mỗi ý kiến được tổ hợp trong bản mô tả bằng việc viện dẫn toàn bộ. Theo cách thích hợp là toàn bộ polypeptit M2e có thể được chèn vào vật truyền vaccin hoặc chỉ một phần có thể được sử dụng. Tám polypeptit axit amin (LM2 có trình tự axit amin: EVETPIRN, SEQ ID NO: 9 hoặc biến thể của nó M2eA có trình tự axit amin EVETPTRN, SEQ ID NO: 10) được tổ hợp vào vật truyền vaccin và được chứng minh để gây ra đáp ứng kháng thể sau khi sử dụng với gà con. Xem U.S. Publication No. 2011/0027309 được tổ hợp trong bản mô tả bằng việc viện dẫn toàn bộ.

Các epitop theo cách thích hợp khác để đưa vào vật truyền vaccin cúm A bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các polypeptit của ngưng kết tố hồng cầu (HA) hoặc protein hạt nhân (nuclear protein - NP) của cúm A. Ví dụ, các peptit của SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 hoặc SEQ ID NO: 14 có thể được bao gồm trong vật truyền vaccin. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thấy rõ là trình tự bất kỳ có thể được sử dụng tổ hợp với epitop bất kỳ khác bao gồm các epitop có nguồn gốc từ các tác nhân gây bệnh hoặc kháng nguyên khác.

Phân tử kích thích miễn dịch được bao gồm như một phần của vật truyền vaccin có thể hoạt hóa tiềm năng các phần của hệ thống miễn dịch có tính quyết định với sự bảo vệ lâu dài hoặc cung cấp tá được hiệu quả. Các polypeptit kích thích miễn dịch có thể là các polypeptit có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch nguyên thể hoặc thích ứng. Các polypeptit kích thích miễn dịch không tự nhiên liên quan đến vật truyền vaccin và là các polypeptit liên quan tự nhiên đến hệ thống miễn dịch xương sống, như ở đối tượng mà vaccin sẽ được áp dụng. Hai polypeptit kích thích miễn dịch được mô tả trong bản mô tả, cụ thể là các polypeptit CD154 và nhóm chuyển động nhanh Box 1 (High Mobility Group Box 1 - HMGB1), nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thấy rõ là các polypeptit kích thích miễn dịch khác có thể được sử dụng hoặc theo cách khác có thể được sử dụng tổ hợp với các chất được mô tả trong bản mô tả.

Các polynucleotit bổ sung mã hóa các polypeptit bao gồm kích hoạt hệ thống miễn dịch cũng có thể được bao gồm trong vật truyền vaccin. Các polynucleotit có thể mã hóa hệ thống miễn dịch phân tử đã biết cho các tác dụng kích thích của chúng, như interleukin, yếu tố hoại tử u, inteferon, bổ thể, hoặc polynucleotit khác bao gồm sự điều chỉnh miễn dịch. Vaccin cũng có thể bao gồm các polynucleotit mã hóa các peptit đã biết để kích thích đáp ứng miễn dịch, như các polypeptit CD154 hoặc HMGB1 được mô tả trong bản mô tả.

HMGB1 được tiết ra bởi các đại thực bào được hoạt hóa và các tế bào bị tổn thương, và hoạt động như chất trung gian cytokin gây viêm, ảnh hưởng đáp ứng miễn dịch tự nhiên. Các phần của trình tự HMGB1 được bao gồm trong các vật truyền vaccin được mô tả theo ví dụ thực hiện sáng chế. Protein HMGB1 (nhóm chuyển động nhanh Box-1 - High Mobility Group Box 1) được nhận biết đầu tiên là protein liên kết ADN có tính quyết định với cơ cấu và độ ổn định ADN. Protein hạt nhân biểu hiện ở khắp nơi liên kết ADN không với trình tự đặc hiệu. Protein được bảo toàn cao và được tìm thấy trong cây đến động vật có vú. Các trình tự axit amin HMGB1 ở cá ngựa vằn, gà và người được đề cập trong SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 22, một cách tương ứng. Trình tự khắp động vật có vú được bảo toàn cao với độ đồng nhất axit amin 98% và các thay đổi axit amin được duy trì. Vì vậy protein HMGB1 từ một loài có thể có khả năng thế cho protein từ loài khác về mặt chức năng. Protein HMGB1 có độ dài đầy đủ hoặc một phần của chúng có thể được sử dụng làm polypeptit HMGB1 trong các vật

truyền vaccin được mô tả trong bản mô tả. HMGB1 có hai ADN các vùng liên kết được gọi là hộp A như được thể hiện trong SEQ ID NO: 16 và 17 và hộp B như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18 và 19. Xem Andersson and Tracey, *Annu. Rev. Immunol.* 2011, 29:139-162, được tổ hợp trong bản mô tả bằng việc viện dẫn toàn bộ.

HMGB1 là chất trung gian gây viêm và phục vụ như tín hiệu thiệt hại hạt nhân, như từ các tế bào hoại tử. HMGB1 cũng có thể được xuất chủ động bởi các tế bào của bạch cầu đơn nhân to/đại thực bào hơi lệch trong quy trình yêu cầu sự axetyl hóa protein, sự di chuyển qua hạt nhân và sự tiết. HMGB1 ngoài tế bào hoạt động như chất trung gian gây viêm mạnh bằng việc báo hiệu qua thụ thể cho các sản phẩm cuối glycated có ưu thế (Receptor for Advanced Glycated End-products - RAGE) và qua các thành phần của họ thụ thể giống Toll (Toll-like Receptor - TLR), cụ thể là TLR4. Hoạt tính liên kết RAGE được nhận biết và yêu cầu polypeptit của SEQ ID NO: 20. Liên kết TLR4 yêu cầu cystein ở vị trí 106 của SEQ ID NO: 15, được tìm thấy trong vùng hộp B của HMGB1.

Hoạt động gây viêm của HMGB1 không yêu cầu protein có độ dài đầy đủ và các đoạn chức năng được nhận biết. Hộp B đã thể hiện là đủ để làm trung gian các tác dụng trước viêm của HMGB1 và vì vậy SEQ ID NO: 18 và 19 là các polypeptit HMGB1 hoặc các đoạn chức năng của chúng trong ngữ cảnh của sáng chế. Ngoài ra, vị trí liên kết RAGE và hoạt tính cytokin trước viêm được ánh xạ với SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 21, một cách tương ứng. Vì vậy, các polypeptit này là các đoạn chức năng của các polypeptit HMGB1 trong ngữ cảnh của sáng chế.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có khả năng xác định các polypeptit HMGB1 và các đoạn của chúng có khả năng kích thích hoạt tính cytokin trước viêm, sử dụng phương pháp như phương pháp trong International Publication No. WO02/092004, được tổ hợp trong bản mô tả bằng việc viện dẫn toàn bộ. Theo cách thích hợp là, polypeptit HMGB1 bao gồm miền liên kết RAGE ở axit amin 150-183 của SEQ ID NO:15 (SEQ ID NO: 20 hoặc thể tương đồng của chúng) và miền hoạt tính cytokin trước viêm giữa các axit amin 89-109 của SEQ ID NO: 15 (SEQ ID NO: 21 hoặc thể tương đồng của chúng). Cụ thể, các polypeptit HMGB1 và các đoạn chức năng hoặc các thể tương đồng của chúng bao gồm các polypeptit đồng nhất với, hoặc đồng nhất ít nhất 99%, đồng nhất ít nhất 98%, đồng nhất ít nhất 97%, đồng nhất ít nhất 96%, đồng nhất ít

nhất 95%, đồng nhất ít nhất 90%, đồng nhất ít nhất 85%, hoặc đồng nhất ít nhất 80% với các polypeptit HMGB1 của các SEQ ID NO: 15 hoặc 16-23.

Như được mô tả chi tiết dưới đây, vật truyền vacxin có thể bao gồm polypeptit CD154 có khả năng liên kết CD40 trong đối tượng và kích thích đối tượng đáp ứng với vật truyền và kháng nguyên liên quan của nó. Sự dính dáng của tế bào tua (dendritic cells - DCs) là cần thiết cho sự bắt đầu của đáp ứng miễn dịch mạnh vì chúng có khả năng khác thường để hoạt hóa các tế bào T nguyên thể, gây ra sự mở rộng tế bào T và phân hóa thành các tế bào tác động. Đó là vai trò của DC, là tế bào có mặt kháng nguyên (antigen đưaing cell - APC) được tìm thấy trong hầu như tất cả các mô của cơ thể, để bắt các kháng nguyên, vận chuyển chúng đến liên quan đến mô limphô, và sau đó đưa chúng đến các tế bào T nguyên thể. Sau khi kích hoạt bởi các DC, các tế bào T phát triển, phân hóa thành các tế bào tác động, rời khỏi cơ quan miễn dịch thứ cấp, và đi vào các mô ngoại vi. Các tế bào T gây độc tế bào được hoạt hóa (CTLs) có thể phá hủy các tế bào nhiễm virus, các tế bào ở u hoặc ngay cả các APC nhiễm các ký sinh trùng trong tế bào (ví dụ, *Salmonella*) và đã thể hiện là có tính quyết định trong sự bảo vệ kháng sự lây nhiễm virus. CD40 là thành phần của họ thụ thể TNF của phân tử và được biểu hiện trên nhiều loại tế bào, bao gồm tế bào có mặt kháng nguyên chuyên nghiệp – antigen-presenting cell (APC), như tế bào DC và B. Sự tương tác của CD40 với phối tử của nó CD154 cực quan trọng và kích thích miễn dịch cả của thể dịch và của tế bào. Sự kích thích của DCs thông qua CD40, biểu hiện trên bề mặt của DCs, có thể được mô phỏng bởi các kháng thể kháng CD40. Tuy nhiên, trong cơ thể, điều này xuất hiện bởi sự tương tác với phối tử tự nhiên cho CD40 (tức là CD154) biểu hiện trên bề mặt của các tế bào T được hoạt hóa. Thú vị là, các vùng liên kết CD40 của CD154 được nhận biết. Vùng liên kết CD40 của CD154 có thể biểu hiện trên bề mặt của vật truyền, như vật truyền *Salmonella* hoặc *Bacillus*, và dẫn đến đáp ứng miễn dịch được tăng cường kháng trình tự peptit đồng thời được biểu thị như được thể hiện theo ví dụ thực hiện sáng chế được đề cập trong bản mô tả và trong U.S. Patent Publication No. 2011/0027309, được tổ hợp trong bản mô tả bằng việc viện dẫn toàn bộ. Polypeptit CD154 có thể là một phần của protein CD154 có độ dài đầy đủ hoặc toàn bộ protein CD154. Theo cách thích hợp là, polypeptit CD154 có khả năng liên kết CD40.

Như thảo luận ở trên, polynucleotit CD154 mã hóa polypeptit CD154 có khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên có thể được bao gồm trong vacxin. Theo cách thích hợp là, polypeptit CD154 dài ít hơn 50 axit amin, chiều dài theo cách thích hợp hơn là ít hơn 40, ít hơn 30 hoặc ít hơn 20 axit amin. Chiều dài polypeptit có thể là giữa 10 và 15 axit amin, giữa 10 và 20 axit amin hoặc giữa 10 và 25 axit amin. Trình tự CD154 và vùng liên kết CD40 không được bảo toàn cao giữa các loài khác nhau. Trình tự CD154 của gà và người được đề cập trong SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25, một cách tương ứng.

Các vùng liên kết CD40 của CD154 được xác định cho số loài, bao gồm người, gà, vịt, chuột và gia súc và được thể hiện trong SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, và SEQ ID NO: 30, một cách tương ứng. Mặc dù có biến trong trình tự ở vùng liên kết CD40 giữa các loài, polypeptit CD154 ở người có thể tăng cường đáp ứng miễn dịch ở gà con. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể thực hiện sáng chế sử dụng các loài polypeptit CD154 đặc hiệu hoặc polypeptit CD154 khác loại. Vì vậy các polypeptit CD154 của SEQ ID NO: 24-30 có thể được bao gồm trong vật truyền vacxin hoặc polypeptit ít nhất 99, 98, 97, 96, 95, 93, 90 hoặc 85% đồng nhất với trình tự của SEQ ID NO: 24-30 có thể được bao gồm trong vật truyền vacxin.

Polypeptit từ CD154 kích thích đáp ứng miễn dịch ít nhất một phần bởi liên kết với thụ thể của nó, CD40. Polypeptit đồng đẳng với polypeptit CD154 được biểu hiện trên các tế bào miễn dịch của đối tượng và có khả năng liên kết với thụ thể CD40 trên các đại thực bào và các tế bào có mặt kháng nguyên khác. Liên kết của phức hệ phối tử - thụ thể kích thích đại thực bào (và các tế bào hơi lệch đại thực bào như các tế bào tua) để tăng cường sự có mặt của thực bào và kháng nguyên mà tăng các chất tiết cytokin đã biết để hoạt hóa các tế bào miễn dịch tại địa phương khác (như tế bào lympho B). Như vậy, phân tử liên quan đến peptit CD154 được ưu tiên hướng đích để đáp ứng miễn dịch và phát triển quá trình tạo ra kháng thể.

Các polypeptit kháng nguyên và polypeptit kích thích miễn dịch được cung cấp thông qua vật truyền vacxin. Các vật truyền vacxin có thể là các vật truyền gốc vi khuẩn, nấm men, virus hoặc liposom. Các vật truyền vacxin tiềm năng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, *Bacillus* (*Bacillus subtilis*), *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*), *Shigella*,

Escherichia (E. coli), *Yersinia*, *Bordetella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Vibrio (Vibrio cholerae)*, *Listeria*, nấm men như *Saccharomyces*, hoặc *Pichia*, adenovirut, poxvirut, herpesvirut, alphavirut, và virut liên quan đến adeno. Các vật truyền vaccin vi khuẩn, nấm men hoặc virut sống vẫn có thể gây rủi ro cho cá thể suy giảm miễn dịch và đòi hỏi giám sát pháp lý bổ sung. Vì vậy mong muốn sử dụng vật truyền được làm chết hoặc không được hoạt hóa hoặc đủ điều kiện như sinh vật nhìn chung công nhận là an toàn (Generally Recognized As Safe - GRAS) bằng sử dụng thực phẩm và thuốc (Food and Drug Administration - FDA). Vấn đề sinh ra đáp ứng miễn dịch vững chắc sử dụng các vật truyền này. Phương pháp bất hoạt hoặc làm chết các vật truyền vaccin vi khuẩn, nấm men hoặc virut đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở phương pháp như làm bất hoạt fomalin, làm bất hoạt dựa trên cơ sở thuốc kháng sinh, điều trị nhiệt và điều trị etanol. Bằng cách bao gồm polypeptit kích thích miễn dịch như polypeptit HMGB1 (nhóm chuyển động nhanh hộp 1 - high mobility group box 1) trên bề mặt của vật truyền vaccin chúng ta có thể tạo đáp ứng miễn dịch vững chắc kháng ký sinh trùng Apicomplexa sử dụng vật truyền *Bacillus* spp. Thực tế là, ví dụ thực hiện sáng chế chứng tỏ rằng vật truyền này có thể được bất hoạt sao cho nó không thể lập lại và vẫn kích thích đáp ứng miễn dịch vững chắc sau khi sử dụng. Các vật truyền vaccin có thể là vi khuẩn kiểu dại, nấm men hoặc virut không gây bệnh. Theo cách khác vật truyền có thể được làm yếu sao cho vật truyền có khả năng hạn chế để lập lại trong vật chủ hoặc không có khả năng phát triển mà không có môi trường bổ sung cho hơn một vài thế hệ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thấy rõ là có nhiều cách để làm giảm tính độc vật truyền và có nghĩa là làm như vậy.

Ít nhất một phần polypeptit kháng nguyên và ít nhất một phần polypeptit kích thích miễn dịch có mặt hoặc biểu hiện trên bề mặt của vật truyền vaccin. Có mặt trên bề mặt vật truyền vaccin bao gồm các polypeptit được chứa trong cuộn bên ngoài của protein xuyên màng, tương tác với, ví dụ, liên kết ngang cộng hóa trị hoặc hóa học với, protein xuyên màng, lipid màng hoặc màng thả neo hydrat cacbon hoặc polypeptit. Polypeptit có thể được chứa trong protein xuyên màng bằng cách có các axit amin chứa polypeptit liên kết qua liên kết peptit với đầu tận N, đầu tận C hoặc bất kỳ chỗ nào trong protein xuyên màng (nghĩa là được chèn giữa hai axit amin của protein xuyên màng hoặc ở vị trí của một hoặc nhiều axit amin của protein xuyên màng (nghĩa là xóa-chèn)).

Theo cách thích hợp là, các polypeptit có thể được chèn vào cuộn bên ngoài của protein xuyên màng. Các protein xuyên màng theo cách thích hợp là *srtA*, *cotB* và *lamB*, nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thấy rõ nhiều protein xuyên màng theo cách thích hợp khả dụng. Các polypeptit có thể được liên kết với màng hoặc thành tế bào thả neo protein hoặc lipid sao cho polypeptit kháng nguyên và polypeptit kích thích miễn dịch được biểu hiện trên bề mặt của vật truyền vaccin.

Như được mô tả ở trên, các polynucleotit mã hóa các polypeptit kháng nguyên hoặc kích thích miễn dịch có thể được chèn vào nhiễm sắc thể của vật truyền hoặc duy trì ngoài nhiễm sắc thể (ví dụ, trên plasmid, BAC hoặc YAC). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thấy rõ là các polynucleotit có thể được chèn trong cấu trúc của nhiều polynucleotit và biểu hiện trong các phần khác nhau của vật truyền hoặc có thể được tiết ra. Polynucleotit mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch có khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch với polypeptit kháng nguyên cũng có thể mã hóa polypeptit kháng nguyên. Polynucleotit mã hóa polypeptit kháng nguyên có thể được liên kết với polynucleotit mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch, sao cho trong vật truyền, hai polypeptit là các phần của cùng polypeptit, như trong protein dung hợp. Theo ví dụ thực hiện sáng chế, polynucleotit mã hóa polypeptit kháng nguyên cũng mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch. Theo một phương án, hai polynucleotit mã hóa các polypeptit đều được chèn trong cấu trúc ở cuộn 9 của gen *lamB* của *Salmonella enteritidis* hoặc vật truyền vaccin khác. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thấy rõ là các polynucleotit ở vi khuẩn mã hóa các protein xuyên màng khác và các cuộn khác của gen *lamB* cũng có thể được sử dụng.

Theo cách khác, polynucleotit mã hóa polypeptit kháng nguyên và/hoặc polypeptit kích thích miễn dịch có thể được chèn vào polypeptit tiết ra mà được biểu lộ hoặc được có mặt trên bề mặt của vật truyền vaccin qua sự liên kết với protein, lipid hoặc hydrat cacbon trên bề mặt của vật truyền vaccin. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thấy rõ là polynucleotit mã hóa polypeptit kháng nguyên và/hoặc polypeptit kích thích miễn dịch có thể được chèn trong nhiều polynucleotit vật truyền vaccin để đưa ra biểu hiện và sự có mặt của polypeptit kháng nguyên và/hoặc polypeptit kích thích miễn dịch với các tế bào miễn dịch của đối tượng được điều trị vật truyền vaccin bằng biểu hiện trên bề mặt vật truyền vaccin. Vùng mã hóa của polypeptit

Rhomboit của Apicomplexa và polypeptit kích thích miễn dịch có thể được dung hợp với đầu tận C của protein liên kết fibronectin *Staphylococcus aureus* chứa môtip phân loại cho sortase từ *Listeria*. Điều này cho phép các protein tiết ra được thả neo trên thành tế bào của vi khuẩn gram dương như *Bacillus*. Xem Nguyen and Schumann, J Biotechnol (2006) 122: 473-482, được tổ hợp trong bản mô tả bằng việc viện dẫn toàn bộ. Hệ thống này được sử dụng theo ví dụ thực hiện sáng chế để cho phép biểu hiện của polypeptit Rhomboit liên kết với HMGB1 trên bề mặt *Bacillus*. Các phương pháp khác tương tự cũng có thể được sử dụng.

Theo cách khác, các polypeptit có thể được liên kết cộng hóa trị hoặc hóa học với các protein, lipid hoặc hydrat cacbon trong màng, thành tế bào, hoặc vỏ protein nếu vật truyền virus được sử dụng qua các phương pháp khả dụng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ, các liên kết disulfua hoặc biotin – liên kết ngang avidin có thể được sử dụng để đưa các polypeptit kháng nguyên và kích thích miễn dịch trên bề mặt của vật truyền vaccin. Theo cách thích hợp là, polypeptit kháng nguyên và polypeptit kích thích miễn dịch là một phần của protein dung hợp. Hai polypeptit có thể được liên kết trực tiếp qua liên kết peptit hoặc có thể được tách bằng cầu nối, vùng đệm, hoặc đoạn protein thứ ba thành cái mà chúng được chèn trong cấu trúc. Theo ví dụ thực hiện sáng chế, vùng đệm axit amin được sử dụng giữa các polypeptit. Vùng đệm có thể giữa 2 và 20 axit amin, theo cách thích hợp là giữa 4 và 10 axit amin, theo cách thích hợp là giữa 6 và 8 axit amin. Theo cách thích hợp là axit amin trong vùng đệm có mạch nhánh nhỏ và không được nạp điện, như glyxin, alanin hoặc serin. Theo ví dụ thực hiện sáng chế, vùng đệm bao gồm hai gốc glyxin, hai gốc serin và acginin và hơn hai gốc serin được sử dụng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thấy rõ các vùng đệm khác có thể được sử dụng.

Theo ví dụ thực hiện sáng chế, các vật truyền vaccin có các polypeptit kháng nguyên (các polypeptit MPP và/hoặc TRAP) và polypeptit kích thích miễn dịch (hoặc là CD154 hoặc HMGB1 hoặc cả hai) được mã hóa trên cùng polynucleotit và trong cấu trúc với nhau. Theo các phương án thay thế, polypeptit kích thích miễn dịch và polypeptit kháng nguyên có thể được mã hóa bằng các polynucleotit riêng biệt. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thấy rõ là nhiều phương pháp có thể được sử dụng để thu nhận biểu hiện của polypeptit kháng nguyên và polypeptit HMGB1 trên bề

mặt của vật truyền vaccin. Các phương pháp này đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Chế phẩm chứa vật truyền vaccin và chất mang được dụng cũng được đề cập. Chất mang được dụng là chất mang bất kỳ theo cách thích hợp để sử dụng *in vivo*. Theo cách thích hợp là, chất mang được dụng chấp nhận được để vận chuyển qua đường miệng, mũi hoặc niêm mạc. Chất mang được dụng có thể bao gồm nước, các dung dịch đệm, dung dịch glucoza hoặc dung dịch cấy vi khuẩn. Các thành phần bổ sung của chế phẩm có thể theo cách thích hợp bao gồm các tá dược như chất ổn định, chất bảo quản, chất pha loãng, chất nhũ tương hóa và chất bôi trơn. Các ví dụ về chất mang được dụng hoặc chất pha loãng bao gồm chất ổn định như hiđrat cacbon (ví dụ, socbitol, mannitol, tinh bột, sucroza, glucoza, dextran), các protein như anbumin hoặc casein, các tác nhân chứa protein như huyết thanh bò hoặc sữa không kem và các dung dịch đệm (ví dụ, dung dịch đệm phosphat). Đặc biệt là khi chất ổn định này được thêm vào chế phẩm, chế phẩm theo cách thích hợp để làm khô bằng đông lạnh hoặc làm khô bằng phun. Vật truyền vaccin trong chế phẩm có thể không có khả năng sao chép, theo cách thích hợp là vật truyền vaccin được bất hoạt hoặc giết trước khi thêm vào chế phẩm.

Phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng bằng việc sử dụng vật truyền vaccin cũng được đề cập. Vật truyền vaccin có thể chứa polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit Rhomboit Aplicomplexan và polynucleotit thứ hai mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch. Polypeptit kích thích miễn dịch theo cách thích hợp là polypeptit liên quan tự nhiên đến hệ thống miễn dịch xương sống và bao gồm việc kích thích đáp ứng miễn dịch. Polypeptit kích thích miễn dịch có thể kích thích đáp ứng miễn dịch tự nhiên hoặc thích ứng ở đối tượng. Theo cách thích hợp là polypeptit HMGB1 hoặc polypeptit CD154 như được mô tả chi tiết ở trên có thể được sử dụng làm polypeptit kích thích miễn dịch. Theo các phương pháp được đề cập trong bản mô tả, vật truyền vaccin chứa polypeptit Rhomboit của Aplicomplexa và polypeptit kích thích miễn dịch được cho sử dụng vào đối tượng một lượng hiệu quả để tăng cường hoặc tạo ảnh hưởng của đáp ứng miễn dịch ở đối tượng với vật truyền vaccin và cụ thể là với polypeptit kháng nguyên Rhomboit và theo cách thích hợp là với ký sinh trùng Aplicomplexa. Đáp ứng miễn dịch tăng cường có thể bao gồm đáp ứng kháng thể hoặc tế bào T. Đáp ứng miễn dịch theo cách thích hợp là đáp ứng miễn dịch bảo vệ, nhưng đáp ứng miễn dịch

có thể không bảo vệ hoàn toàn, nhưng có thể là có khả năng làm giảm tỷ lệ bệnh hoặc tỷ lệ chết liên quan đến sự lây nhiễm. Các polypeptit kích thích miễn dịch có thể được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng với kháng nguyên lạ bất kỳ hoặc polypeptit kháng nguyên có trong vật truyền vaccin ngoài polypeptit hình thoi. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ thấy rõ là polypeptit kích thích miễn dịch có thể được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch với hơn một polypeptit kháng nguyên có trong vật truyền vaccin. Việc tăng cường đáp ứng miễn dịch bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kích thích tác dụng điều trị bệnh hoặc phòng ngừa được làm trung gian bởi hệ thống miễn dịch của đối tượng. Rõ ràng, việc tăng cường đáp ứng miễn dịch có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, quá trình tạo ra các kháng thể được tăng cường, chuyển mạch lớp được tăng cường của các chuỗi nặng kháng thể, sự trưởng thành của các tế bào có mặt kháng nguyên, sự kích thích của các tế bào T trợ phụ, sự kích thích của các tế bào T tiêu tế bào hoặc sự cảm ứng của bộ nhớ tế bào T và B.

Theo cách thích hợp là, vật truyền vaccin chứa polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm các axit amin 150-183 và 89-109 của polypeptit HMGB1 (SEQ ID NO: 15) hoặc thể tương đồng của chúng. Theo ví dụ thực hiện sáng chế, polypeptit axit amin 190 của HMGB1 được sử dụng. Theo cách thích hợp là, polynucleotit mã hóa polypeptit HMGB1 từ các loài giống nhau làm đối tượng. Tổ hợp khác loại của các polypeptit HMGB1 và đối tượng (ví dụ polypeptit HMGB1 ở người để sử dụng trong vaccin gà) có thể là có ích theo các phương pháp của sáng chế vì HMGB1 được bảo toàn cao qua số loài lớn. Polypeptit HMGB1 có thể được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch với hơn một polypeptit kháng nguyên có trong vật truyền vaccin. Polypeptit từ HMGB1 kích thích đáp ứng miễn dịch ít nhất một phần bằng cách hoạt hóa các tế bào tua và các đại thực bào và vì vậy kích thích quá trình tạo ra các cytokin như IL-1, IL-6, IFN- γ và TNF- α . Theo ví dụ thực hiện sáng chế, polypeptit của HMGB1 được biểu hiện trên bề mặt vật truyền vaccin.

Vật truyền vaccin có thể theo cách thích hợp là chứa polypeptit CD154 có khả năng liên kết với CD40 và hoạt hóa CD40. Vaccin chứa polynucleotit mã hóa polypeptit CD154 có khả năng liên kết với CD40 được cho sử dụng cho đối tượng một lượng hiệu quả để tăng cường hoặc cải thiện đáp ứng miễn dịch của đối tượng với vaccin. Theo cách thích hợp là, vaccin chứa polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm các axit amin

140-149 của polypeptit CD154 ở người (SEQ ID NO: 25) hoặc thể tương đồng của chúng. Như chú ý ở trên, thể tương đồng của axit amin 140-149 có nguồn gốc từ một loài có thể được sử dụng để kích thích đáp ứng miễn dịch ở loài riêng biệt. Theo cách thích hợp là, polynucleotit mã hóa polypeptit CD154 từ loài giống nhau làm đối tượng. Theo cách thích hợp là, polynucleotit mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 26 được sử dụng ở các đối tượng là người, polynucleotit mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 27 được sử dụng ở gà con, polynucleotit mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 28 được sử dụng ở vịt, polynucleotit mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 29 được sử dụng ở chuột, và polynucleotit mã hóa polypeptit của SEQ ID NO: 30 được sử dụng ở bò. Polypeptit CD154 ở người (SEQ ID NO: 26) được sử dụng trong vacxin ở gà và được chứng minh để tăng cường đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên lạ. Vì vậy tổ hợp khác loại khác của các polypeptit CD154 và các đối tượng có thể là có ích theo phương pháp của sáng chế.

Ngoài ra, các phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng ký sinh trùng Apicomplexa và phương pháp làm giảm tỷ lệ bệnh liên quan đến sự lây nhiễm tiếp theo với ký sinh trùng Apicomplexa được đề cập. Vấn đề, phương pháp bao gồm việc dùng cho đối tượng lượng hiệu quả vật truyền vacxin chứa trình tự polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit Rhomboit Apicomplexa. Vật truyền vacxin cũng có thể bao gồm polynucleotit thứ hai mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch với lượng hiệu quả. Các polypeptit Rhomboit có thể bao gồm SEQ ID NO: 1-4, 37, 38 hoặc các tổ hợp hoặc các đoạn của chúng. Sự chèn các polypeptit Rhomboit vào vật truyền có thể được thực hiện bằng nhiều cách đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở hệ thống đột biến định hướng vị trí scarless được mô tả trong BMC Biotechnol. 2007 Sept, 17: 7(1): 59, Scarless and Site-directed Mutagenesis in *Salmonella* Enteritidis chromosome, được tổ hợp trong bản mô tả bằng việc viện dẫn toàn bộ và phương pháp sử dụng trong bản mô tả như được mô tả trong Nguyen and Schumann J Biotechnol 2006 122: 473-482, được tổ hợp trong bản mô tả bằng việc viện dẫn toàn bộ. Vật truyền cũng có thể được thiết kế để biểu hiện các polypeptit Rhomboit tổ hợp với các polypeptit kháng nguyên khác từ các ký sinh trùng Apicomplexa như TRAP hoặc từ các tác nhân gây bệnh khác bao gồm các virus như cúm M2e hoặc vi khuẩn như *Salmonella* hoặc *E. coli*. Cụ thể, polypeptit của CD154 có khả năng liên kết

CD40 hoặc HMGB1 có thể được biểu hiện bằng vật truyền để tăng cường đáp ứng miễn dịch của đối tượng với polypeptit hình thoi.

Chế phẩm chứa các polypeptit kháng nguyên cũng có thể được sử dụng để giảm bớt tỷ lệ bệnh liên quan đến sự lây nhiễm tiếp theo bởi ký sinh trùng Apicomplexa. Chế phẩm này có thể ngăn ngừa ký sinh trùng khỏi gây bệnh hoặc có thể giới hạn hoặc giảm liên quan bất kỳ đến tỷ lệ bệnh ở đối tượng áp dụng các chế phẩm hoặc vật truyền vaccin được mô tả trong bản mô tả. Chế phẩm và vật truyền vaccin được nêu trong bản mô tả có thể giảm cường độ của bệnh tiếp theo bằng cách hạ độ dài bệnh, giảm trọng lượng, cường độ triệu chứng bệnh, hạ tỷ lệ bệnh hoặc tỷ lệ chết liên quan đến bệnh hoặc làm giảm khả năng co lại bệnh. Chế phẩm cũng có thể giảm độ mở rộng ký sinh trùng bằng cách kìm hãm sự truyền. Tỷ lệ bệnh hoặc tỷ lệ chết liên quan đến bệnh sau khi sử dụng các vật truyền vaccin được nêu trong bản mô tả có thể được giảm tới 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% hoặc thậm chí 100% khi so sánh với các đối tượng tương tự không được cung cấp vật truyền vaccin.

Để sử dụng với động vật hoặc người, chế phẩm có thể được cho sử dụng bằng nhiều cách bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đường mũi, niêm mạc, bằng cách phun, trong da, đường tiêm, tiêm dưới da, màng bụng, tiêm tĩnh mạch, trong sọ, đường miệng, bằng khí hoặc trong cơ. Sử dụng thuốc nhỏ mắt, nuôi qua ống đường miệng hoặc thêm vào nước uống hoặc thực phẩm thêm vào một cách thích hợp. Với gia cầm, chế phẩm có thể được cho sử dụng *in ovo*.

Một số phương án của sáng chế đề cập phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Các đối tượng theo cách thích hợp có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, xương sống, theo cách thích hợp là động vật có vú, theo cách thích hợp là người, và gia cầm, theo cách thích hợp là gia cầm như gà hoặc gà tây. Các động vật khác như bò, mèo, chó hoặc lợn cũng có thể được sử dụng. Theo cách thích hợp là, đối tượng không phải người và có thể là động vật nông nghiệp.

Liều vaccin hữu hiệu để được cho sử dụng sẽ khác nhau tùy theo độ tuổi, trọng lượng và loài của đối tượng, hình thức và lộ trình sử dụng và loại tác nhân gây bệnh kháng mà đáp ứng miễn dịch được tìm thấy. Chế phẩm có thể được cho sử dụng với liều bất kỳ đủ để gọi lên đáp ứng miễn dịch. Hình dung là các liều phạm vi từ 10^3 đến 10^{10} bản sao vật truyền (tức là các đơn vị hình thành cụm hoặc các đơn vị hình thành mảng

bám), từ 10^4 đến 10^9 bản sao vật truyền, hoặc từ 10^5 đến 10^7 bản sao vật truyền là thích hợp.

Chế phẩm có thể được cho sử dụng chỉ một lần hoặc có thể được cho sử dụng hai hoặc nhiều lần để tăng đáp ứng miễn dịch. Ví dụ, chế phẩm có thể được cho sử dụng hai hoặc nhiều lần riêng biệt trong một tuần, hai tuần, ba tuần, 1 tháng, 2 tháng, 3 tháng, 6 tháng, 1 năm hoặc hơn. Vật truyền vaccin có thể chứa các vi sinh vật có thể sống được trước khi sử dụng, nhưng theo một số phương án vật truyền có thể được làm chết trước khi sử dụng. Theo một số phương án, vật truyền có thể có khả năng lập lại ở đối tượng, mà theo các phương án khác vật truyền có thể không có khả năng lập lại ở đối tượng. Phương pháp bất hoạt các vi sinh vật được sử dụng làm vật truyền là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ vật truyền vaccin vi khuẩn có thể được bất hoạt bằng cách sử dụng fomalin, etanol, tiếp xúc nhiệt, hoặc thuốc kháng sinh. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể sử dụng phương pháp khác cũng được.

Hình dung là một số epitop hoặc kháng nguyên từ các tác nhân gây bệnh giống hoặc khác nhau có thể được cho sử dụng tổ hợp vaccin đơn để tạo đáp ứng miễn dịch được tăng cường kháng đa kháng nguyên. Các vaccin tái tổ hợp có thể mã hóa kháng nguyên từ nhiều vi sinh vật gây bệnh, virus hoặc u liên quan đến kháng nguyên. Sử dụng vaccin có khả năng biểu hiện đa kháng nguyên có ưu điểm là kích thích miễn dịch kháng hai bệnh hoặc hơn cùng thời điểm. Ví dụ, vi khuẩn được làm yếu sống cung cấp vật truyền theo cách thích hợp để gợi ra đáp ứng miễn dịch kháng đa kháng nguyên từ tác nhân gây bệnh đơn, ví dụ, TRAP (SEQ ID NO: 6) và MPP từ *Eimeria* (SEQ ID NO: 2); hoặc kháng đa kháng nguyên từ các tác nhân gây bệnh khác nhau, ví dụ, *Eimeria* và cúm hoặc *Salmonella*.

Các vật truyền vaccin có thể được cấu tạo sử dụng polynucleotit ngoại sinh mã hóa kháng nguyên có thể được chèn vào vật truyền vaccin ở vị trí không cần thiết bất kỳ hoặc theo cách khác có thể được tiến hành trên plasmid hoặc tá được ngoài nhiễm sắc thể khác (ví dụ BAC hoặc YAC) sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Một vị trí theo cách thích hợp để chèn các polynucleotit là trong các phần bên ngoài của các protein xuyên màng hoặc cùng với trình tự hướng đích polynucleotit ngoại sinh cho con đường tiết và/hoặc cho phép gắn với thành tế bào. Một ví dụ về protein xuyên màng theo cách

thích hợp để chèn các polynucleotit là gen *lamB*. Một phương pháp gắn lên thành tế bào theo cách thích hợp được đề xuất trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế

Các polynucleotit ngoại sinh bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các polynucleotit mã hóa kháng nguyên được chọn từ các vi sinh vật hoặc virus gây bệnh và bao gồm các polynucleotit biểu hiện theo cách sao cho tạo hiệu quả đáp ứng miễn dịch. Các polynucleotit này có thể là có nguồn gốc từ virus gây bệnh như cúm (ví dụ, M2e, ngưng kết tổ hồng cầu, hoặc neuraminidaza), các virus ecpet (ví dụ, các gen mã hóa cấu trúc các protein của virus ecpet), retrovirus (ví dụ, protein vỏ bọc gp160), adenovirus, paramyxovirus, coronavirus và tương tự. Các polynucleotit ngoại sinh cũng có thể thu được từ vi khuẩn gây bệnh, ví dụ, các gen mã hóa các protein vi khuẩn như độc tố, các protein màng ngoài hoặc các protein bảo toàn cao khác. Hơn nữa, các polynucleotit ngoại sinh từ các ký sinh trùng, như các ký sinh trùng Apicomplexa khác là các ứng cử hấp dẫn để sử dụng trong vật truyền vaccin.

Sáng chế không bị giới hạn chế ở các chi tiết cụ thể trong bản mô tả, bố trí của các thành phần, hoặc các bước của phương pháp đặt ra trong bản mô tả. Chế phẩm và phương pháp bộc lộ trong bản mô tả có khả năng được tạo ra, thực hiện, sử dụng, tiến hành và/hoặc tạo ra theo các cách khác nhau sẽ thấy rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực trong công bố sau đây. Cách diễn đạt và thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả chỉ theo mục đích của phần mô tả và không làm hạn chế phạm vi bảo hộ của sáng chế. Các chỉ số thứ tự, như thứ nhất, thứ hai, và thứ ba, như được sử dụng trong phần mô tả và bộ yêu cầu bảo hộ để chỉ các cơ cấu hoặc các bước của phương pháp khác nhau, không nhằm ám chỉ cơ cấu hoặc các bước đặc hiệu bất kỳ, hoặc thứ tự cụ thể hoặc cấu hình bất kỳ với các cơ cấu hoặc các bước này. Tất cả phương pháp được nêu trong bản mô tả có thể được thực hiện với thứ tự theo cách thích hợp bất kỳ trừ khi được hiểu khác trong bản mô tả hoặc được chỉ rõ ràng bởi ngữ cảnh. Sử dụng bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ chuẩn (ví dụ, "như là") được đề cập trong bản mô tả, được dự định chỉ để tạo thuận lợi cho việc tiết lộ và không bao hàm giới hạn bất kỳ với phạm vi bảo hộ của công bố trừ khi được bảo hộ khác. Không có ngôn ngữ trong bản mô tả, và không có cơ cấu được thể hiện trong các hình vẽ, nên được hiểu như chỉ ra rằng yếu tố không bảo hộ bất kỳ cần thiết để thực hiện đối tượng bộc lộ. Sử dụng trong bản mô tả các thuật ngữ "bao gồm," "chứa," hoặc "có," và biến thể của chúng, có nghĩa là để bao gồm những

yếu tố nêu sau và tương đương của chúng, cũng như các yếu tố bổ sung. Các phương án nêu là “bao gồm,” “chứa,” hoặc “có” một số yếu tố cũng được dự phòng là “bao gồm về cơ bản là” và “bao gồm là” những yếu tố nhất định. Các thuật ngữ số ít có thể nghĩa là một hoặc hơn một trừ khi rõ ràng được khoanh định.

Sự nêu phạm vi của các giá trị trong bản mô tả là chỉ đơn thuần nhằm mục đích dùng như là phương pháp viết tắt chỉ riêng lẻ cho từng giá trị riêng nằm trong dãy, trừ khi được ký hiệu khác trong bản mô tả, và từng giá trị riêng được tổ hợp vào bản mô tả như thể nó được nêu riêng trong đây. Ví dụ, nếu một khoảng nồng độ được quy định là 1% đến 50%, nó được dự định là các giá trị như 2% đến 40%, 10% đến 30%, hoặc 1% đến 3%, v.v., biểu hiện được liệt kê trong bản mô tả này. Chỉ là các ví dụ về điều rõ ràng được dự định, và tất cả tổ hợp giá trị bằng số có thể giữa và bao gồm giá trị thấp nhất và giá trị cao nhất được liệt kê được coi là biểu hiện nêu trong công bố này. Sử dụng từ “khoảng” để mô tả lượng được nêu cụ thể hoặc phạm vi của các lượng có nghĩa để cho biết rằng giá trị rất gần với lượng được nêu được bao gồm trong lượng đó, như giá trị có thể hoặc tự nhiên sẽ được hạch toán do dung sai sản xuất, lỗi dụng cụ và con người trong hình thành phép đo, và tương tự. Tất cả phần trăm chỉ các lượng là trọng lượng trừ khi được ký hiệu khác.

Các ví dụ sau đây chỉ có tính chất minh họa và không nhằm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế hoặc của các yêu cầu bảo hộ kèm theo. Tất cả các tài liệu tham khảo, bao gồm patent, công bố bằng sáng chế và tài liệu không phải sáng chế, được nêu trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của chúng. Xung đột bất kỳ giữa các trình bày trong các tham chiếu và trình bày trong bản mô tả cần được giải quyết ưu tiên trình bày có trong bản mô tả.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Cấu trúc của các vật truyền vacxin

Nhiều tổ hợp của vacxin được cấu tạo cho mục đích thử nghiệm tính hữu hiệu và xác định ảnh hưởng của từng vacxin với thách thức bảo vệ kháng *Eimeria maxima*. Bản hình mẫu thể hiện cấu trúc được sử dụng theo ví dụ thực hiện sáng chế được thể hiện dưới dạng Fig. 2. Các trình tự TRAP MPP HMGB1, và MPP HMGB1 được tổng hợp và được chèn vào plasmit pNDH10 cho biểu hiện bề mặt tế bào. Từng trình tự được tổng hợp với vị trí hạn chế BamHI ở đầu 5' và vị trí hạn chế AatII ở đầu 3' trực tiếp gần kề

với protein liên kết fibronectin B (fibronectin binding protein B - *fbpB*). Biểu hiện của trình tự vacxin và *fbpB* được điều chỉnh bằng operon *xyl* được chèn trước vào plasmit pNDH10 [1]. *fbpB* bao gồm môtip phân loại được công nhận bởi sortase A neo *fbpB* với bề mặt tế bào của sortase A biểu hiện vi khuẩn [1]. Vì vậy, trình tự vacxin được đặt ngược dòng và trong cấu trúc với trình tự *fbpB* sao cho khi *fbpB* được thả neo với sortase A trên thành tế bào trình tự vật truyền vacxin sẽ được biểu hiện trên bề mặt của vi khuẩn. Plasmit pNDH10 chứa trình tự vacxin, *fbpB*, và operon *xyl* được biến thành *Bacillus subtilis* 1A857 biểu hiện sortase A [2]. Từng plasmit được biến thành 1A857 bằng cách bổ sung 0,6 µg thêm/plasmit vào 1A857 tùy ý cấy axit etylen glycol tetraaxetic (Ethylene glycol tetraacetic acid - EGTA) 0,1 M. Sau khi biến nạp, 1A857 biểu hiện pNDH10 được chọn trên môi trường LB chứa 5 µg/mL cloramphenicol để chỉ chọn các tế bào tiến hành kháng thuốc kháng sinh mang lại bằng plasmit thông qua trình tự *cat* mã hóa cloramphenicol acetyl chuyển vị. *Bacillus subtilis* 1A857 biến nạp với các plasmit MPP HMGB1 (SEQ ID NO: 33), hoặc TRAP MPP HMGB1 (SEQ ID NO: 31) pNDH10 xác nhận bằng chiết xuất plasmit tiếp theo là bằng PCR. Từng cấu trúc 1A857/pNDH10/thêm sinh trưởng và đem lại 0,6% xylose trong canh LB + 0,1% glucoza có 5 µg/mL cloramphenicol trong 9 giờ ở 37°C trong khi rung. Biểu hiện protein MPP-HMGB1 (SEQ ID NO: 34) và TRAP-MPP-HMGB1 (SEQ ID NO: 32) được xác nhận bằng vết mực Western và kính hiển vi huỳnh quang gián tiếp với các kháng thể kháng HMGB1 ở thô.

Ví dụ 2. Tỷ lệ bệnh và tỷ lệ chết của gà giảm sau sự lây nhiễm *Eimeria*

Các vacxin được định hướng MPP HMGB1 và TRAP MPP HMGB1 được thử khả năng cung cấp sự bảo vệ kháng thách thức *Eimeria maxima* khi được dùng qua nước uống tổ hợp với tá được chitosan biến đổi. Gà broiler được tiêm vacxin ở 4 và 14 ngày tuổi với vacxin tương ứng trong nước uống có tỷ lệ pha loãng là 1:128 (5×10^5 cfu/gà) trong 24 giờ. Ở 21 ngày tuổi, tất cả các nhóm được cân và thách thức với 4×10^4 noãn nang đã hình thành bào tử của *E. maxima* bằng cách nuôi qua ống đường miệng. Ở 28 ngày tuổi, trọng lượng cơ thể (body weight - BW) và tăng trọng lượng cơ thể của những con sống sót (body weight gain - BWG) được ghi nhận trong thời kỳ thách thức. Thêm vào đó, tỷ lệ chết được ghi chép để xác định tính hữu hiệu của ứng cử vacxin. Tám ngày sau thách thức BW cao hơn đáng kể ở gà được tiêm vacxin có TRAP-MPP-HMGB1 và

MPP-HMGB1 khi so sánh với gà không được tiêm vaccin (Fig.3). BWG cao hơn đáng kể ở tất cả các nhóm được tiêm vaccin 8 ngày sau thách thức khi so sánh với đối chứng (Fig.4). Tỷ lệ chết cũng thấp hơn đáng kể ở các nhóm được tiêm vaccin TRAP-MPP-HMGB1 và MPP-HMGB1 với nhóm không được tiêm vaccin (Fig.5).

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

Yêu cầu bảo hộ

1. Vật truyền vaccin chứa trình tự polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit Rhomboit của Apicomplexa được biểu hiện tùy ý trên bề mặt của vật truyền vaccin này, trong đó polypeptit Rhomboit này gồm polypeptit có độ đồng nhất trình tự cao hơn 90% với polypeptit được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, mảnh gây miễn dịch của SEQ ID NO: 1, mảnh gây miễn dịch của SEQ ID NO: 2, mảnh gây miễn dịch của SEQ ID NO: 3, mảnh gây miễn dịch của SEQ ID NO: 4, mảnh gây miễn dịch của SEQ ID NO: 37, mảnh gây miễn dịch của SEQ ID NO: 38 và tổ hợp của chúng.
2. Vật truyền vaccin theo điểm 1, trong đó vật truyền vaccin này còn bao gồm trình tự polynucleotit thứ hai mã hóa polypeptit kích thích miễn dịch, trong đó polypeptit kích thích miễn dịch này được biểu hiện trên bề mặt của vật truyền vaccin.
3. Vật truyền vaccin theo điểm 2, trong đó polypeptit kích thích miễn dịch là polypeptit HMGB1.
4. Vật truyền vaccin theo điểm 3, trong đó polypeptit HMGB1 là polypeptit được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 15-23, mảnh của ít nhất một trong các SEQ ID NO: 15-23, polypeptit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% với các SEQ ID NO: 15-23 và tổ hợp của chúng.
5. Vật truyền vaccin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó polypeptit kích thích miễn dịch là polypeptit CD154 có khả năng liên kết CD40, polypeptit CD154 này có ít hơn 50 axit amin và chứa các axit amin 140-149 của polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 và thể tương đồng của chúng, hoặc là polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 và polypeptit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90% với ít nhất một trong số các SEQ ID NO: 26-30.
6. Vật truyền vaccin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó vật truyền này chứa nhiều hơn một bản sao của polynucleotit thứ nhất và/hoặc nhiều hơn một bản sao của trình tự polynucleotit thứ hai.

7. Vật truyền vaccin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 6, trong đó trình tự polynucleotit thứ nhất được liên kết trong cùng khung đọc với trình tự polynucleotit thứ hai.
8. Vật truyền vaccin theo điểm 7, trong đó polynucleotit thứ nhất và polynucleotit thứ hai được liên kết thông qua trình tự nucleotit đệm.
9. Vật truyền vaccin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó vật truyền vaccin này được chọn từ nhóm bao gồm virus, vi khuẩn, nấm men và liposom.
10. Vật truyền vaccin theo điểm 9, trong đó vật truyền vaccin này là *Bacillus* spp.
11. Vật truyền vaccin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó vật truyền vaccin này còn bao gồm polynucleotit thứ ba mã hóa polypeptit TRAP.
12. Vật truyền vaccin theo điểm 11, trong đó polypeptit TRAP được chọn từ nhóm bao gồm các polypeptit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% với SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 40, mảnh gây miễn dịch của SEQ ID NO: 5, mảnh gây miễn dịch của SEQ ID NO: 6, mảnh gây miễn dịch của SEQ ID NO: 7 và mảnh gây miễn dịch của SEQ ID NO: 40.
13. Vật truyền vaccin theo điểm 2, trong đó polynucleotit thứ nhất và polynucleotit thứ hai mã hóa polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 và polypeptit có độ đồng nhất trình tự là 95% với SEQ ID NO: 32 hoặc SEQ ID NO: 34.
14. Dược phẩm chứa vật truyền vaccin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 và chất mang dược dụng.
15. Vật truyền vaccin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó vật truyền vaccin này được làm chết hoặc không có khả năng sao chép ở đối tượng.
16. Vật truyền vaccin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó vật truyền vaccin này đặc hiệu đối với ký sinh trùng Apicomplexa được chọn từ nhóm gồm *Eimeria*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Neospora* và *Cryptosporidium*.
17. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó vật truyền vaccin này được làm chết hoặc không có khả năng sao chép ở đối tượng.

18. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó vật truyền vacxin này đặc hiệu đối với ký sinh trùng Apicomplexa được chọn từ nhóm bao gồm *Eimeria*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Neospora* và *Cryptosporidium*.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

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

<120> VẬT TRUYỀN VACCIN CHỨA TRÌNH TỰ POLYNUCLEOTIT DÙNG ĐỂ TĂNG CƯỜNG
ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH VỚI KÝ SINH TRÙNG APICOMPLEXA VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA VẬT
TRUYỀN VACCIN NÀY

<130> 5658-00201

<150> US 61/764,681

<151> 2013-02-14

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp: epitop tối thiểu composit

<220>

<221> đặc tính_mới

<222> (2)..(2)

<223> Xaa là Arg hoặc Met

<220>

<221> đặc tính_mới

<222> (3)..(4)

<223> Xaa là Val hoặc Ile

<220>

<221> đặc tính_mới

<222> (5)..(5)

<223> Xaa là Ser hoặc Arg

<220>

<221> đặc tính_mới

<222> (6)..(6)

<223> Xaa là Phe hoặc Tyr

<220>

<221> đặc tính_mới

<222> (13)..(13)

<223> Xaa là His hoặc Tyr

<400> 1

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

<210> 2

<211> 43

<212> PRT

<213> Eimeria maxima

<220>

<221> đặc tính mới

<222> (1)..(43)

<223> Eimeria maxima MPP

<400> 2

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

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

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

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Neospora canium

<400> 3

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

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

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Eimeria tenella

<400> 4

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

Glu Tyr Asn Leu Gly
20

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

<220>
<221> đặc tính_mới
<222> (1)..(10)
<223> Eimeria maxima TRAP-1

<400> 5

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

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

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

<400> 6

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

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

Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala
35 40

<210> 7
<211> 40
<212> PRT

<213> Eimeria maxima

<220>

<221> đặc tính_mới

<222> (1)..(40)

<223> Eimeria maxima TRAP-03

<400> 7

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

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

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gln Glu
35 40

<210> 8

<211> 70

<212> PRT

<213> Eimeria maxima

<220>

<221> đặc tính_mới

<222> (1)..(70)

<223> Eimeria maxima TRAP

<400> 8

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

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

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

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

Gly Ala Gly Ala Gln Glu
65 70

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Cúm gia cầm

<220>
<221> đặc tính_mới
<222> (1)..(8)
<223> Virut cúm gia cầm m2e

<400> 9

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Cúm gia cầm

<220>
<221> đặc tính_mới
<222> (1)..(8)
<223> Virut cúm gia cầm m2e

<400> 10

Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn
1 5

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Cúm gia cầm

<220>
<221> đặc tính_mới
<222> (1)..(12)
<223> Virut cúm gia cầm HA5 UA

<400> 11

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

<210> 12
<211> 19

<212> PRT
 <213> Cúm gia cầm

<220>
 <221> đặc tính_mới
 <222> (1)..(19)
 <223> Virut cúm gia cầm HA5 LB

<400> 12

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

Glu Glu Leu

<210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Cúm gia cầm

<220>
 <221> đặc tính_mới
 <222> (1)..(16)
 <223> Virut cúm gia cầm NP 54-69

<400> 13

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

<210> 14
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Cúm gia cầm

<220>
 <221> đặc tính_mới
 <222> (1)..(14)
 <223> Virut cúm gia cầm NP 147-160

<400> 14

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

<210> 15

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

<220>
 <221> đặc tính mới
 <222> (1)..(190)
 <223> Axit amin HMGB1 ở gà

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp: HMGB1 box a1

<400> 16

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

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

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

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

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

Pro Lys Gly Glu Thr
 85

<210> 17
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp: HMGB1 box a2

<400> 17

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

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

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

Pro Pro Lys Gly Glu Thr
50

<210> 18
<211> 73
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: HMGB1 box b1

<400> 18

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

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

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

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

Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr
65 70

<210> 19
<211> 69
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: HMGB1 box b2

<400> 19

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

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

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

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

Lys Asp Ile Ala Ala
65

<210> 20
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: Miền liên kết HMGB1 RAGE

<400> 20

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

Cys Ser Glu Phe Arg
20

<210> 21
<211> 33
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: hoạt tính cytokine gây viêm HMGB1

<400> 21

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

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

Lys

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

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

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala

```

145                      150                      155                      160

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

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

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

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
    210                      215

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

<220>
<221>  đặc tính_mới
<222>  (1)..(205)
<223>  Cá ngựa vằn HMGB1

<400>  23

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

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

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

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

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

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
 <221> đặc tính_mới
 <222> (1)..(272)
 <223> CD154 ở gà

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Val Asn Val Asn Pro Gly Asn Thr Tyr Phe Gly Met Phe Lys Leu

260

265

270

<210> 25
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> đặc tính mới
 <222> (1)..(261)
 <223> CD154 ở người

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Leu Lys Leu
 260

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

<220>
 <221> đặc tính mới
 <222> (1)..(11)
 <223> Peptit CD154 ở người

<400> 26

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

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

<220>

<221> đặc tính_mới
<222> (1)..(11)
<223> Peptit CD154 ở gà

<400> 27

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

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

<220>
<221> đặc tính_mới
<222> (1)..(10)
<223> Peptit CD154 ở vịt

<400> 28

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

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

<220>
<221> đặc tính_mới
<222> (1)..(10)
<223> Peptit CD154 ở chuột

<400> 29

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

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

<220>
<221> đặc tính_mới
<222> (1)..(10)
<223> Peptit CD154 ở bò

<400> 30

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

<210> 31

<211> 918

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp: trình tự nucleotit TRAP MPP HMGB1

<400> 31

ggatccatgg gcggtagcag cagaagcagc gcagcacctg aaacgagagc agtccagccg
60

aaacctgaag aaggccatga aagacctgaa cctgaagaag aagaagagaa aaaagaagaa
120

ggcggcggtt ttcttacagc agcagtcgcg ggcggatcaa gcagatcttc cccttctcat
180

gatgcgcctg aaagcgaacg gacgcctcgg gttatctcct ttggttacgg tgcgtgcgaa
240

cataatctgg gcgtctctct ttttagacgc gaagaaacga aaaaagatcc gcgtggacgg
300

ggcggatcaa gcagatcttc catgggtaaa ggcgacccga aaaaacctcg gggcaaaatg
360

tcaagctacg catttttcgt ccaaactatgc agagaagaac ataagaaaaa acatcctgat
420

gctagcgtaa acttttcaga atttagcaaa aaatgttctg aacgttggaa aacgatgtct
480

tccaaagaaa agggtaaatt tgaagatatg gctaaagccg acaaattgcg gtacgaaaaa
540

gaaatgaaaa actacgtacc gcctaaagga gaaacaaaga aaaaatttaa agatccgaac
600

gcccctaaaa gaccgccttc tgcatttttc ctgttttgct ccgaatttcg cccgaaaatt
660

aaaggagaac atcctgggtc gagcatcggc gacgttgcca aaaaacttgg agaaatgtgg
720

aataacacgg cagcggatga caaacagccg tatgagaaaa aagctgccaa attgaaagaa
780

aaatacgaaa aagatatcgc agcgtaccgc gcaaaaggaa aagtggacgc gggtaaaaaa
840

gttggtggcta aagcggaaaa atcaaagaag aaaaaggaag aagaagaaga cggcggctca
900

tctcggtcct ccgacgtc
918

<210> 32
<211> 306
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: peptit TRAP MPP HMGB1

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn

130 135 140
 Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser
 145 150 155 160
 Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Leu
 165 170 175
 Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Glu Thr
 180 185 190
 Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala
 195 200 205
 Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His
 210 215 220
 Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp
 225 230 235 240
 Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala
 245 250 255
 Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys
 260 265 270
 Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser
 275 280 285
 Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser
 290 295 300
 Asp Val
 305

<210> 33
 <211> 777
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp: nucleotit MPP HMGB1

<400> 33
 ggatccatgg gcggttagcag cagaagcagc ccttctcatg atgcgcctga aagcgaacgg
 60
 acgcctcggg ttatctcctt tggttacggg gcgtgcgaac ataatctggg cgtctctctt
 120
 tttagacgcg aagaaacgaa aaaagatccg cgtggacggg gcggatcaag cagatcttcc
 180
 atgggtaaag gcgacccgaa aaaacctcgg ggcaaaatgt caagctacgc atttttcgtc
 240
 caaacatgca gagaagaaca taagaaaaaa catcctgatg ctagcgtaaa cttttcagaa
 300
 tttagcaaaa aatgttctga acgttggaac acgatgtctt ccaaagaaaa gggtaaattt
 360
 gaagatatgg ctaaagccga caaattgcgg tacgaaaaag aaatgaaaaa ctacgtaccg
 420
 cctaaaggag aaacaaagaa aaaatttaaa gatccgaacg cccctaaaag accgccttct
 480
 gcatttttcc tgttttgctc cgaatttcgc ccgaaaatta aaggagaaca tcttggtctg
 540
 agcatcggcg acgttgcgaa aaaacttgga gaaatgtgga ataacacggc agcggatgac
 600
 aaacagccgt atgagaaaaa agctgccaaa ttgaaagaaa aatacgaaaa agatatcgca
 660
 gcgtaccgcg caaaaggaaa agtggacgcg ggtaaaaaag ttgtggctaa agcggaaaaa
 720
 tcaaagaaga aaaaggaaga agaagaagac ggcgggtcat ctcggtcctc cgacgtc
 777

<210> 34
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp: peptit MPP HMGB1

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Val

<210> 35
 <211> 768
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp: trình tự nucleotit TRAP HMGB1

<400> 35
 ggatccatgg gcggtagcag cagaagcagc gcagcacctg aaacgagagc agtccagccg
 60

aaacctgaag aaggccatga aagacctgaa cctgaagaag aagaagagaa aaaagaagaa
 120

ggcggcggtt ttcttacagc agcagtcgcg ggcggatcaa gcagatcttc catgggtaaa
 180

ggcgacccga aaaaacctcg gggcaaatg tcaagctacg catttttcgt ccaaaccatgc
 240

agagaagaac ataagaaaa acatcctgat gctagcgtaa acttttcaga atttagcaaa
 300

aatgtttctg aacgttggaa aacgatgtct tccaaagaaa agggtaaatt tgaagatatg
 360

gctaaagccg acaaattgcg gtacgaaaaa gaaatgaaaa actacgtacc gcctaaagga
 420

gaaacaaaga aaaaatttaa agatccgaac gccctaaaa gaccgccttc tgcatttttc
 480

ctgttttgct ccgaatttcg cccgaaaatt aaaggagaac atcctggtct gagcatcggc
 540

gacgttgcca aaaaacttgg agaaatgtgg aataacacgg cagcggatga caaacagccg
 600

tatgagaaaa aagctgcca attgaaagaa aaatacgaaa aagatatcgc agcgtaccgc
 660

gcaaaaggaa aagtggacgc gggtaaaaaa gttgtggcta aagcggaaaa atcaaagaag
720

aaaaaggaag aagaagaaga cggcggctca tctcggctct ccgacgtc
768

<210> 36
<211> 256
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp: peptit TRAP HMGB1

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe

```

145                      150                      155                      160

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

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

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

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

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

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

```

```

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

```

```

<220>
<221> đặc tính mới
<222> (1)..(32)
<223> Toxoplasma gondii RH

```

```

<400> 37

```

```

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

```

```

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

```

```

<210> 38
<211> 43
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>

```

<223> Tổng hợp: Trình tự liên ứng

<220>

<221> đặc tính_mới

<222> (11)..(11)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> đặc tính_mới

<222> (13)..(17)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> đặc tính_mới

<222> (24)..(24)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> đặc tính_mới

<222> (28)..(28)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> đặc tính_mới

<222> (31)..(32)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<220>

<221> đặc tính_mới

<222> (35)..(39)

<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ

<400> 38

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

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

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

<210> 39

<211> 841

<212> PRT

<213> Toxoplasma gondii

<220>

<221> đặc tính mới

<222> (1)..(841)

<223> Toxoplasma gondii ROM5

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Gln Gly Val Asp Asn Asn Ala His Leu Gly Gly Leu Ile Gly Gly
 580 585 590

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ala Gln Gln Thr Arg Ala Gly Gln
835 840

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

<220>
<221> đặc tính mới
<222> (1)..(40)
<223> Eimeria maxima TRAP-02A

<400> 40

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

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

Gly	Phe	Pro	Thr	Ala	Ala	Val	Ala
	35					40	

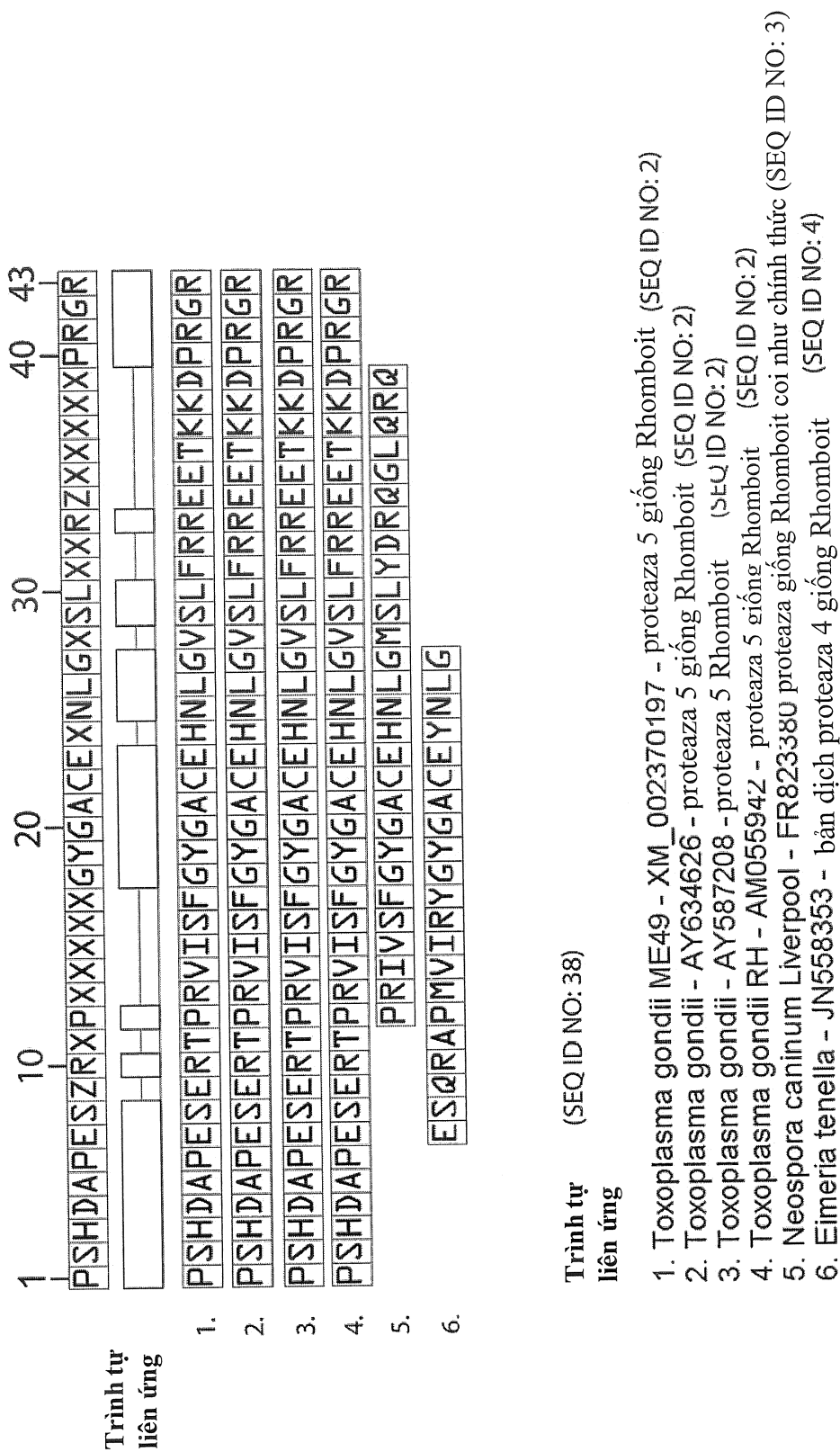


Fig. 1

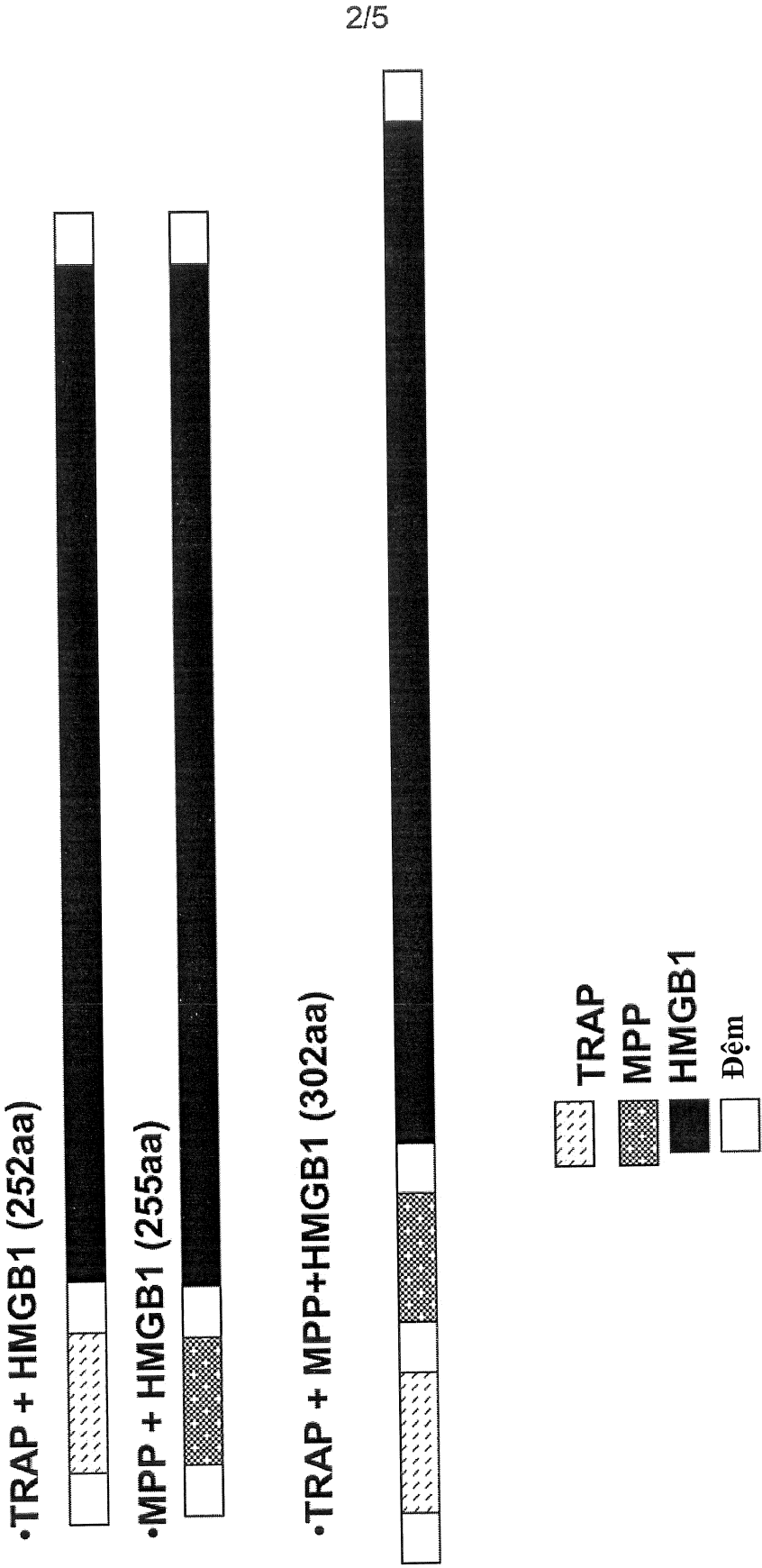


Fig. 2

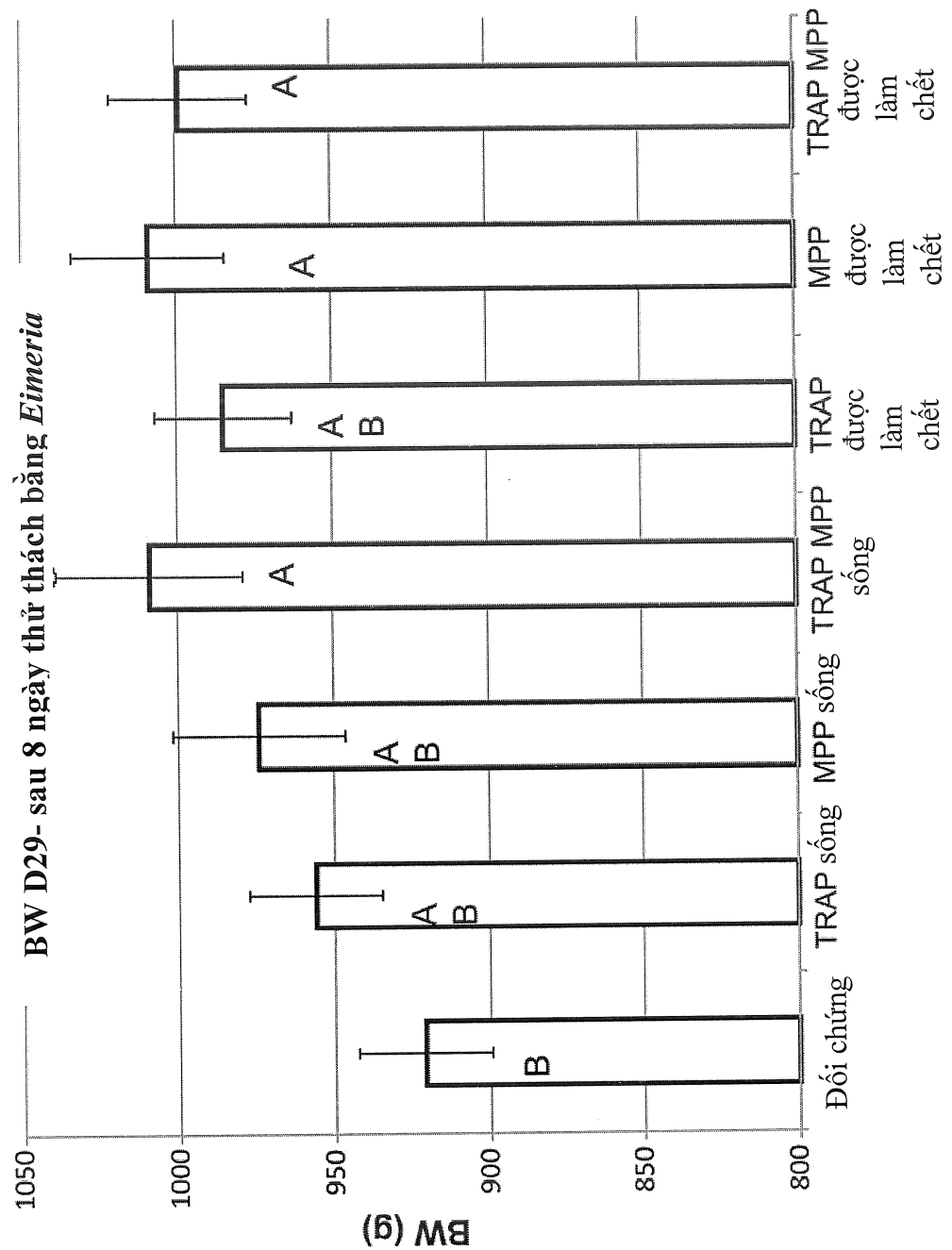


Fig. 3

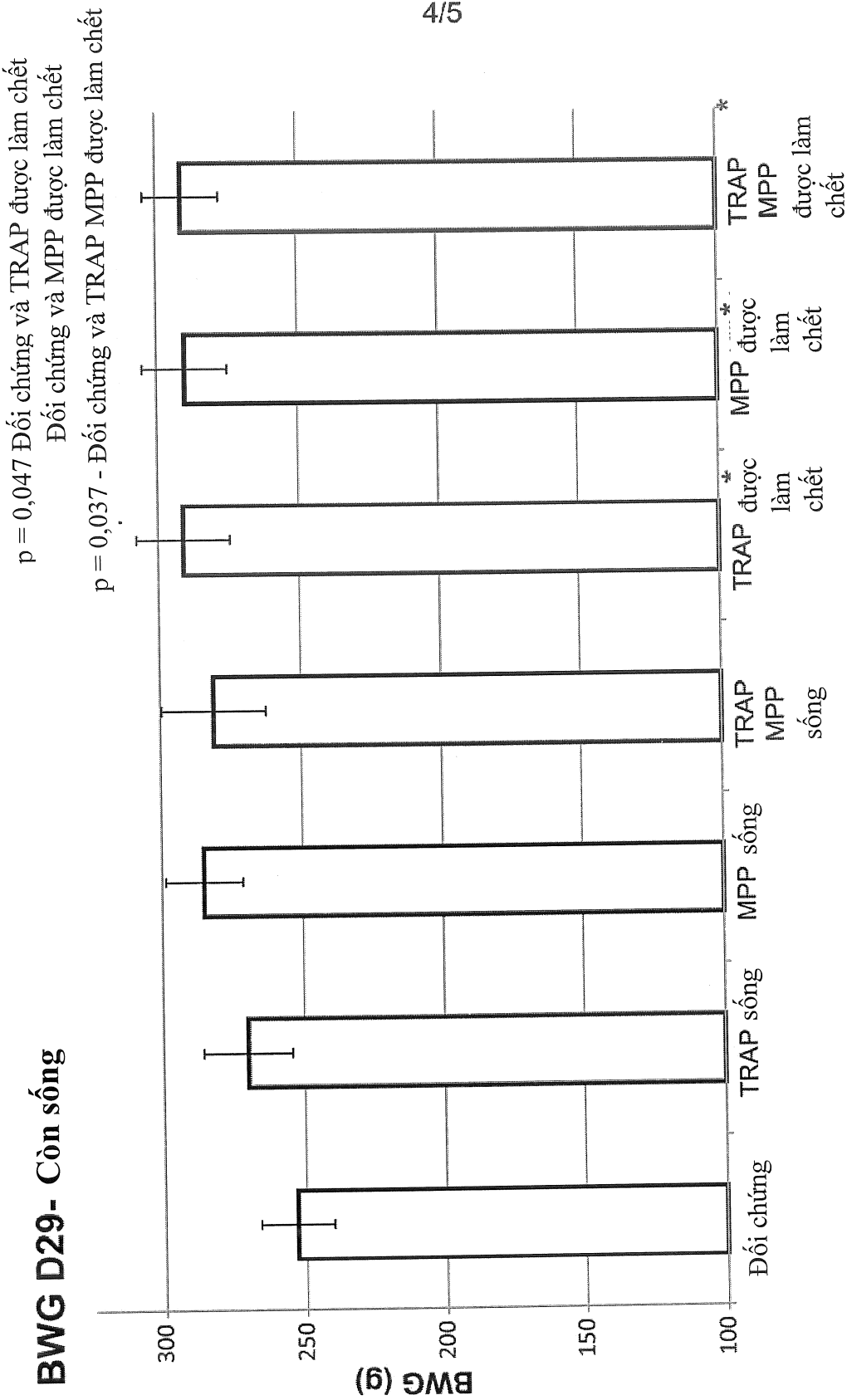


Fig. 4

5/5

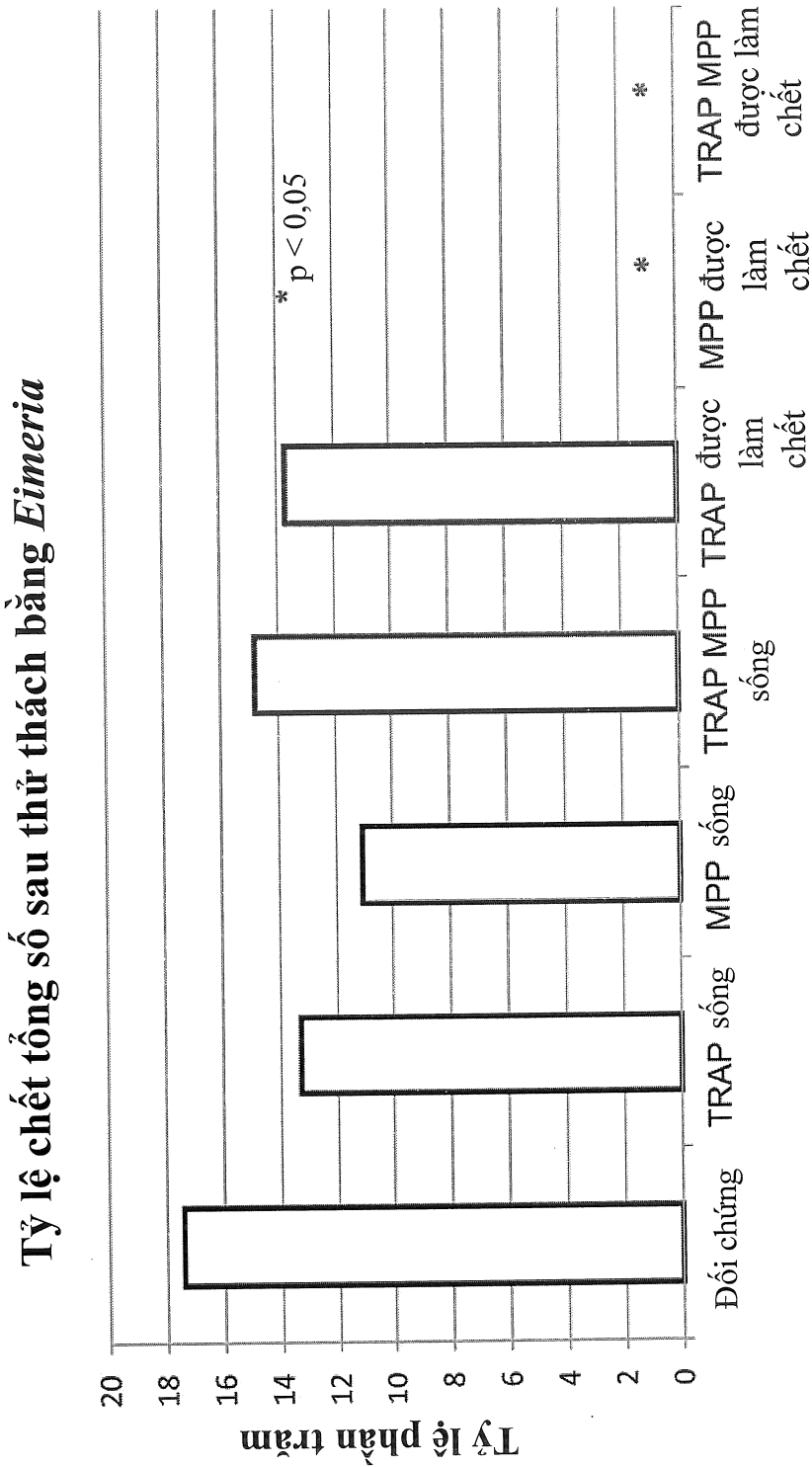


Fig. 5