



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2005 003 429 T2 2008.10.02**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 666 489 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2005 003 429.3**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **05 257 384.7**

(96) Europäischer Anmeldetag: **30.11.2005**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.06.2006**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **21.11.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.10.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/455 (2006.01)**

A61K 39/012 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A61K 33/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

2004348669 01.12.2004 JP

(73) Patentinhaber:

Zeon Corp., Tokio, JP

(74) Vertreter:

**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, HU

(72) Erfinder:

Sato, Takanori, Tokyo 100-8323, JP

(54) Bezeichnung: **Kodierende DNS für ein Eimeria Apical Membran Antigen 1 und dessen Verwendungen**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung betrifft das Gebiet der Vogelkokzidiose und bezieht sich auf ein DNA-Molekül, das ein antigenes Protein des Antigens 1 der apikalen Membran von *Eimeria* codiert, und seine Verwendung.

[0002] Kokzidiose ist eine Darmstörung von Geflügel und verursacht eine Vielzahl von Problemen für den infizierten Wirt. Diese Probleme reichen von schlechten Futterumwandlungsverhältnissen bei leichten Infektionen bis zu akuten Todesfällen bei schwereren Infektionen.

[0003] Kokzidiose wird durch Protozoen verursacht, die zur Gattung *Eimeria* gehören. Die Vertreter dieser Gattung im Geflügel sind *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. mitis* und *E. praecox*. Einige Forscher stellen auch *E. mivati* und *E. hagani* zu der Gattung. Alle diese Spezies haben ähnliche Lebenszyklen, weisen aber eine unterschiedliche Gewebespezifität und Pathogenität auf. Ein Masthähnchen wird durch *E. acervulina* oder *E. maxima* erheblich geschädigt, da sie in großen Teilen des Dünndarms parasitieren, wo die Nahrungsverdauung eine Hauptrolle spielt.

[0004] Kokzidiose kann durch die Verabreichung von Anti-Kokzidiose-Mitteln bekämpft werden. Es treten jedoch häufig wirkstoffresistente Stämme auf, und die Kosten der Entwicklung von neuen Wirkstoffen sind ziemlich hoch. Außerdem hinterlassen mehrere dieser Erreger Rückstände im Fleisch, was zu Problemen für den Verbraucher führen könnte.

[0005] Es wurde versucht, die Krankheit zu verhindern, indem man Hühner mit lebenden abgeschwächten Stämmen von *Eimeria* oder inaktivierten Parasiten impfte. Diese lebenden abgeschwächten Stämme, wie frühreife Linien, werden erhalten, indem man Hühner mit Oocysten einer wilden *Eimeria*-Spezies impft und den allerersten Parasiten einsammelt, der aufgrund der Infektion ausgeschieden wird (J. Parasitol. 1975, 61: 1083–1090). Solche abgeschwächten Lebendimpfstoffe produzieren jedoch weniger Parasiten und haben bei geimpften Hühnern einen merklichen Krankheitseffekt. Andererseits ist die Schutzwirkung unter Verwendung des letzteren (inaktivierter Impfstoff) bei weitem nicht vollständig. Weiterhin ist ein Nachteil dieser Impfstoffe, dass sie nur kostspielig herzustellen sind, da bei einer Produktion dieser Impfstoffe im großen Maßstab viele lebende Hühner benötigt werden.

[0006] Eine alternative Lösung bestünde darin, die schützenden Antigene von *Eimeria*-Parasiten gentechnisch herzustellen. Einmal entwickelt, könnten diese Immunogene in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Kultursystem billig in unbegrenzter Menge hergestellt und zum Impfen von Hühnern gegen Kokzidiose verwendet werden.

2. Stand der Technik

[0007] Mehrere schützende Antigen-Gene von *Eimeria* wurden beschrieben. Zum Beispiel beschrieben Jenkins et al. ein Screeningverfahren unter Verwendung eines Kaninchenserums gegen die Membranfraktion von *E. acervulina* und einen Teil der cDNA, die ein 250-kDa-Protein in der Parasitenoberfläche codiert (Exp. Parasitol. 1988; 66: 96–107, US-Patent 5,122,471). Einige *Eimeria*-Antigen-Gene wurden einem Screening unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen *Eimeria*-Parasiten anstelle von Antiseren unterzogen (US-Patente 5,028,694, 5,279,960, 5,814,320, 5,449,768). Diese Antigene konnten Hühnern, die mit einem rekombinanten Protein oder einem das Antigen exprimierenden rekombinanten Virus immunisiert wurden, jedoch nur einen partiellen Schutz vor einer *Eimeria*-Infektion verleihen (US-Patente 5,387,414, 5,403,581, 5,602,033, 6,001,363).

[0008] Infection and Immunity, März 1991, Seite 983–989, Vol. 59, Nr. 3, Y. D. Karkhanis et al., offenbart die Reinigung und Charakterisierung eines schützenden Antigens von *Eimeria tenella*. Extrakte wurden aus ultraschallbehandelten sporulierten Oocysten oder aus ultraschallbehandelten Sporozoiten hergestellt, und nach Gelfiltration und Reinigung wurde ein schützendes Antigen mit einer Molmasse von 26 kDa identifiziert. Es wurde gezeigt, dass der Extrakt zum partiellen Schutz von Hühnern vor durch *E. tenella* induzierter Kokzidiose führt, siehe Diskussion Seite 987–989.

[0009] US-A-5,661,015 (Binger et al.) offenbart DNA-Sequenzen, die für *Eimeria*-Oberflächenantigene codie-

ren, rekombinante Vektoren, die die DNA enthalten, transformierte Wirtszellen und Verfahren zur Herstellung der Antigene unter Verwendung der transformierten Mikroorganismen. Ebenfalls mit dabei sind Verfahren zum Schützen von Geflügel vor Kokzidiose unter Verwendung von Eimeria-Oberflächenantigenen, die entweder als gereinigte Proteine oder in Form von DNA, die die Proteine codiert, in einem viralen Vektor verabreicht werden.

[0010] Plasmodium, das Malaria beim Menschen verursacht, ist mit Eimeria nahe verwandt, und beide Parasiten gehören zum Stamm der Apicomplexa. Malaria ist eine der drei bedeutendsten Infektionskrankheiten beim Menschen, und es gibt schätzungsweise 500 Millionen infizierte Menschen, wobei 1–2 Millionen jährlich sterben. Daher konzentrieren sich viele Forschungsgruppen auf die Entwicklung eines Malariainpfostoffs, um die Infektion zu bekämpfen.

[0011] Das Antigen 1 der apikalen Membran von Plasmodium ist zur Zeit eines der vielversprechendsten Antigene für einen Malariainpfostoff (Molecular Microbiology (2004) 52, 159–168, The Journal of Immunology 172 (2004) 6167–6174, und Infect. Immun. 72 (2004) 4464–4470). Das Gen des Antigens 1 der apikalen Membran von Eimeria (AMA-1) wird im spezifischen Organ von Eimeria nur in kleiner Menge exprimiert. Daher war die Reinigung des Antigens schwierig, und die volle Aminosäuresequenz war unbekannt. Da es kein gereinigtes AMA-1 gab, war es schwierig, das AMA-1-Gen durch das allgemeine Screeningverfahren zu erhalten, das heißt, einen Antikörper gegen das Antigen zu erhalten und eine cDNA-Bibliothek mit dem Antikörper zu durchmustern.

[0012] Wie oben beschrieben ist, gibt es keinen befriedigenden Impfstoff gegen Vogelkokzidiose. Außerdem wurde noch kein DNA-Molekül, das Eimeria-AMA-1-Protein codiert, kloniert und ist bezüglich seiner Eignung als Impfstoffantigen bekannt.

Kurzbeschreibung der Erfindung

[0013] Dementsprechend besteht ein Ziel der vorliegenden Erfindung darin, ein Mittel zum Identifizieren und Klonieren von cDNA, die Eimeria-tenella-AMA-1 codiert, bereitzustellen. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein DNA-Molekül, das Eimeria-tenella-AMA-1 codiert, bereitzustellen und seine Verwendung anzugeben. Noch weitere Ziele der vorliegenden Erfindung bestehen darin, Verfahren und Impfstoffe bereitzustellen, die zum Schützen von Hühnern vor Vogelkokzidiose geeignet sind.

[0014] Die vorliegende Erfindung stellt ein DNA-Molekül bereit, das ein antigenes Protein von Eimeria-AMA-1, insbesondere Eimeria-tenella-AMA-1, codiert. Die DNA-Sequenz codiert das Eimeria-tenella-AMA-1-Protein, das aus der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Aminosäuresequenz besteht.

[0015] Außerdem stellt die vorliegende Erfindung ein DNA-Molekül bereit, das ein antigenes Protein von Eimeria-tenella-AMA-1 codiert, wobei das antigene Protein eine Aminosäuresequenz umfasst, die durch Insertion, Deletion und/oder Substitution von einer oder mehreren Aminosäuren in der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Sequenz modifiziert ist, oder wobei das antigene Protein mehr als 90% Identität mit der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Aminosäuresequenz aufweist.

[0016] Außerdem stellt die vorliegende Erfindung ein DNA-Molekül bereit, das ein antigenes Protein von Eimeria-tenella-AMA-1 codiert, wobei das DNA-Molekül unter hochstringenten Bedingungen mit dem Bereich des offenen Leserasters in der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten DNA hybridisiert.

[0017] Ein DNA-Vektor, der das oben beschriebene DNA-Molekül enthält, ist hier ebenfalls offenbart und kann als DNA-Impfstoff für Vogelkokzidiose verwendet werden.

[0018] Die vorliegende Erfindung stellt ein antigenes Protein von Eimeria-tenella-AMA-1 und ein Verfahren zu seiner Herstellung bereit.

[0019] Das Protein eignet sich auch zum Schützen von Hühnern vor Vogelkokzidiose.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Antigenes Protein des Antigens 1 der apikalen Membran von Eimeria

[0020] Das Antigen 1 der apikalen Membran (AMA-1) von Eimeria gemäß der vorliegenden Erfindung ist von dem Vogelparasiten Eimeria abgeleitet und umfasst insbesondere die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2.

[0021] Das antigene Protein von Eimeria-AMA-1 ist jedoch nicht nur auf AMA-1 beschränkt, sondern umfasst auch das Protein, das die Aminosäuresequenz umfasst, die durch Substitution, Deletion, Addition und/oder Insertion von einer oder mehreren Aminosäuren in SEQ ID Nr. 2 modifiziert ist, solange es bei Hühnern die gleichen Antikörper induzieren kann wie bei Hühnern, die mit Eimeria-AMA-1 immunisiert sind. Ein Beispiel für das antigene Protein ist eines mit demselben Epitop wie Eimeria-tenella-AMA-1, das die in SEQ ID Nr. 2 gezeigte Aminosäuresequenz umfasst, und ein Beispiel ist das in Beispiel 3 beschriebene rekombinante Protein, das die 57. bis 276. Aminosäure von SEQ ID Nr. 2 enthält.

[0022] Die Zahl der obigen modifizierten Aminosäuren beträgt vorzugsweise weniger als 10%, besonders bevorzugt weniger als 5% der Gesamtheit von SEQ ID Nr. 2 und am meisten bevorzugt weniger als 10 Aminosäuren.

[0023] Das antigene Protein von Eimeria-tenella-AMA-1 gemäß der vorliegenden Erfindung ist auch in dem DNA-Molekül codiert, das unter hochstringenten Bedingungen mit dem DNA-Molekül des offenen Leserasters in SEQ ID Nr. 1 hybridisiert. In diesem Fall sind "hochstringente Bedingungen" äquivalent zu "0,2 × SSC und 68°C".

[0024] Antigene Proteine von Eimeria-tenella-AMA-1 gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen außerdem das Protein, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die mehr als 90% Identität mit der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Aminosäuresequenz aufweist. Vorzugsweise beträgt die Identität wenigstens mehr als 95%.

DNA-Molekül, das ein antigenes Protein von Eimeria-AMA-1 codiert

[0025] Das DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung codiert ein antigenes Protein des oben genannten AMA-1 des Vogelparasiten Eimeria tenella. Ein spezifisches Beispiel für eine DNA der vorliegenden Erfindung ist eine, die das Eimeria-tenella-AMA-1 codiert, das die in SEQ ID Nr. 2 gezeigte Aminosäuresequenz umfasst. Insbesondere ist ein DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung eines, das die in SEQ ID Nr. 1 gezeigte Nucleotidsequenz aufweist.

[0026] Die DNA der vorliegenden Erfindung ist jedoch nicht nur auf diejenige mit der Sequenz von SEQ ID Nr. 1 beschränkt, sondern umfasst auch eine DNA, die ein Protein codiert, das die Aminosäuresequenz umfasst, die durch Substitution, Deletion, Addition und/oder Insertion von einer oder mehreren Aminosäuren in SEQ ID Nr. 2 modifiziert ist, solange das Protein bei Hühnern die gleichen Antikörper induzieren kann wie bei Hühnern, die mit Eimeria-tenella-AMA-1 immunisiert sind.

[0027] Die Zahl der obigen modifizierten Aminosäuren beträgt vorzugsweise weniger als 10%, besonders bevorzugt weniger als 5% der Gesamtheit von SEQ ID Nr. 2 und am meisten bevorzugt weniger als 10 Aminosäuren.

[0028] Die DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung, die ein antigenes Protein von Eimeria-tenella-AMA-1 codieren, umfassen auch ein DNA-Molekül, das unter hochstringenten Bedingungen mit dem DNA-Molekül des offenen Leserasters in SEQ ID Nr. 1 hybridisiert. In diesem Fall sind "hochstringente Bedingungen" äquivalent zu "0,2 × SSC und 68°C".

[0029] Außerdem umfassen die DNA-Moleküle der vorliegenden Erfindung, die ein antigenes Protein von Eimeria-tenella-AMA-1 codieren, auch ein DNA-Molekül, das ein Protein mit einer Aminosäuresequenz codiert, die mehr als 90% (besonders bevorzugt mehr als 95%) Identität mit der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Aminosäuresequenz aufweist. In diesem Fall wird die Identität mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) berechnet.

[0030] Eines der Verfahren, um das obige DNA-Molekül zu erhalten, das unter hochstringenten Bedingungen mit dem DNA-Molekül des offenen Leserasters in SEQ ID Nr. 1 hybridisiert oder das ein Protein mit einer Aminosäuresequenz codiert, die mehr als 90% Identität mit der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Aminosäuresequenz aufweist, ist die Modifikation des DNA-Moleküls von SEQ ID Nr. 1. Um das DNA-Molekül zu modifizieren, sind in der Technik die ortsspezifische Mutation mit Hilfe von Primern und/oder die statistische Mutation bekannt: siehe z. B. Sambrook et al., Kapitel 13 von Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 2001.

Vektor und dessen Konstruktion

[0031] Ein DNA-Vektor der vorliegenden Erfindung ist der Vektor, der das oben beschriebene DNA-Molekül enthält. Um einen DNA-Vektor der vorliegenden Erfindung zu erhalten, kann eine DNA mit einer künstlichen Nucleotidsequenz mit dem DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung verbunden werden. Ein Beispiel für die DNA für die Verbindung ist ein Linker, der in der Gentechnik üblicherweise verwendet wird. Bei dem Linker handelt es sich um wenigstens ein oder zwei weitere Nucleotide, die nicht natürlicherweise mit dem DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung verbunden sind und in Abhängigkeit von der Stelle des Vektors, in die die DNA eingefügt werden soll, in geeigneter Weise gestaltet werden.

[0032] Der DNA-Vektor, in den das DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung integriert wird, kann ausgewählt werden aus einem Plasmid, wie pBR322, pBR325, pUC7, pUC8, pUC18, pUC19, pBluescript oder pGEM, einem Cosmid, wie pHc79, oder einem Phagen, wie λ - oder M13-Phage. Der Vektor wird mit einem oder mehreren geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, und das DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung oder eine andere notwendige DNA, wie ein Linker, wird nach dem Standardverfahren darin eingefügt.

[0033] Ein DNA-Vektor zum Aufbau des Expressionsvektors für ein antigenes Protein von *Eimeria-tenella*-AMA-1 unterliegt keiner Einschränkung und kann aus den oben genannten Vektoren ausgewählt werden. Ein DNA-Vektor, um das Zielprotein als Fusionsprotein mit einem Tag zu exprimieren, mittels dessen das Zielprotein affinitätsgereinigt werden könnte, ist besonders gut geeignet. Als Beispiele für einen solchen Vektor sind pGEX-Vektor (AMERSHAM BIOSCIENCES Corp.) oder pQE-Vektor (QIAGEN Inc.) kommerziell erhältlich. Ein Beispiel dafür ist pGEX-6p-3, der in Beispiel 3 beschrieben ist.

[0034] Der Transcriptionsregulations-Bereich, wie ein Promotor oder Terminator, muss notwendigerweise in den Expressionsvektor mit aufgenommen werden. Der geeignete Promotor ist je nach Wirtszelle unterschiedlich. Zum Beispiel wird ein lac-, tac- oder T5-Promotor als Promotor verwendet, wenn *E. coli* die Wirtszelle ist. Im Falle von Hefe sind OAX1- oder GAPDH-Promotor, im Falle einer Insektenzelle der Polyhedrin-Promotor oder bei Säugerzellen der cmv- oder β -Actin-Promotor geeignet.

Wirtszelle

[0035] Unter Verwendung des resultierenden Expressionsvektors kann eine Vielzahl von Wirtszellen in geeigneter Weise transformiert werden, um einen Mikroorganismus oder Zellen zu erhalten, die ein antigenes Protein von *Eimeria-tenella*-AMA-1 oder ein rekombinantes Protein, das einen Teil von SEQ ID Nr. 2 und eine Tag-Sequenz umfasst, produzieren können.

[0036] Die hier verwendeten Wirtszellen können anhand ihrer Verträglichkeit mit dem Expressionsvektor, Eignung der Produkte usw. ausgewählt werden, und es kann sich entweder um prokaryontische oder um eukaryontische Zellen handeln. Spezifische Beispiele für die Wirtszellen sind Bakterien, wie die Gattung *Escherichia* (z. B. *E. coli*) oder die Gattung *Salmonella* (z. B. *Salmonella typhimurium*), und niedere eukaryontische Zellen, wie Hefe (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*) oder Pilze (z. B. *Penicillium*).

[0037] Und Beispiele für die Wirtszellen bei höheren eukaryontischen Zellen sind Insektenzellen, Eierstockzellen des chinesischen Streifenhamsters (CHO), CEF-Zellen oder humane Zelllinien (z. B. HeLa).

[0038] Um einige Wirtszellen mit dem obigen Expressionsvektor zu transduzieren, können je nach den Wirtszellen geeignete Verfahren verwendet werden, die dem Fachmann wohlbekannt sind.

Expression eines antigenen Proteins von *Eimeria*-AMA-1

[0039] Die mit einem geeigneten Expressionsvektor transformierten Wirtszellen können unter Inkubationsbedingungen, die dem Fachmann wohlbekannt sind, kultiviert und vermehrt werden.

[0040] Zum Beispiel kann transformierte *E. coli* gut unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 37°C kultiviert werden. Bei der Herstellung eines antigenen Proteins von *Eimeria-tenella*-AMA-1 können die Bedingungen für die Induktion des Proteins gemäß dem verwendeten Promotor ausgewählt werden. Im Falle des *E.-coli*-Lactose-Promotor- und -Operator-Systems als spezielles Beispiel wird dies erreicht, indem man eine geeignete Menge Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid (IPTG) zu einem Kulturmedium gibt.

[0041] Das Verfahren zum Reinigen des antigenen Proteins von *Eimeria*-AMA-1 unterliegt keiner besonderen

Einschränkung, sondern es kann jedes bekannte Verfahren in Kombination mit Techniken, die auf diesem Gebiet wohlbekannt sind, auf die Reinigung angewendet werden. Wenn das antigene Protein von Eimeria-tenella-AMA-1 als Fusionsprotein, das ein Tag enthält, welches bei der Reinigung durch eine Affinitätssäule verwendet werden kann, exprimiert wird, ist die Affinitätssäule ein sehr zweckmäßiges Werkzeug. Zum Beispiel könnte das antigene Protein von Eimeria-tenella-AMA-1, das als Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST) unter Verwendung von pGEX-Vektor exprimiert wird, leicht durch eine Glutathion-Sepharose-4B-Säule (AMERSHAM BIOSCIENCES Corp.) gereinigt werden.

Impfstoffe gegen Kokzidiose

[0042] Zu den Impfstoffen gegen Kokzidiose gemäß der vorliegenden Erfindung gehören DNA-Impfstoffe und Proteinimpfstoffe. Der DNA-Impfstoff der vorliegenden Erfindung kann bei Hühnern, die damit geimpft werden, die Immunität induzieren. Dagegen enthält Proteinimpfstoff das antigene Protein von Eimeria-tenella-AMA-1 der vorliegenden Erfindung, das die Immunität bei Hühnern induzieren kann.

[0043] Der DNA-Impfstoff der vorliegenden Erfindung enthält das DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung, und bei dem Hauptbestandteil kann es sich insbesondere um einen rekombinanten DNA-Vektor, wie ein Plasmid, handeln, in den das DNA-Molekül der vorliegenden Erfindung eingefügt wird. Der rekombinante DNA-Vektor kann der obige Expressionsvektor für ein antigenes Protein von Eimeria-tenella-AMA-1 sein, ist aber nicht darauf beschränkt, solange der DNA-Impfstoff das Gen für das antigene Protein von Eimeria-tenella-AMA-1 in dem immunisierten Huhn exprimieren kann.

[0044] Der DNA-Impfstoff kann neben dem DNA-Molekül, das das antigene Protein von Eimeria-tenella-AMA-1 codiert, noch beliebige weitere Bestandteile enthalten. Als anderer Bestandteil kann CpG-Oligonucleotid, das von einem TLR (toll-like receptor) auf der Zelloberfläche erkannt wird und zellvermittelte Immunität aktivieren kann, oder Stabilisatoradditiv verwendet werden, nachdem es in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) in Lösung gebracht wurde.

[0045] Das Verabreichungsverfahren für den DNA-Impfstoff der vorliegenden Erfindung unterliegt keiner besonderen Einschränkung, und ein allgemeines Verfahren zur intramuskulären, intravenösen oder subkutanen Injektion ist aufgeführt. Der DNA-Impfstoff wird in einer Menge von 50 µl einer Lösung von 0,1 bis 10 mg/ml, besonders bevorzugt 0,5 bis 5 mg/ml, pro Vogel verabreicht.

[0046] Der Proteinimpfstoff der vorliegenden Erfindung besteht hauptsächlich aus dem antigenen Protein von Eimeria-tenella-AMA-1 und kann beliebige Bestandteile, wie Kochsalzlösung, Adjuvans und/oder Konservierungsstoffe enthalten, solange Hühner sicher mit dem DNA-Impfstoff immunisiert werden können.

[0047] Das Verabreichungsverfahren für den Proteinimpfstoff der vorliegenden Erfindung unterliegt keiner besonderen Einschränkung, solange es bei dem Huhn, dem der Impfstoff verabreicht wurde, Immunantworten induzieren kann. Vorzugsweise wird der Proteinimpfstoff mit Adjuvans injiziert, da er dann bei dem Huhn, dem er injiziert wurde, starke Immunantworten induzieren kann. Das Adjuvans kann aus zahlreichen Adjuvantien, die in der Technik wohlbekannt sind, ausgewählt werden, zum Beispiel Öl-Adjuvans oder Aluminiumhydroxid. Die Menge des injizierten Proteinimpfstoffs unterliegt ebenfalls keiner Einschränkung. Zum Beispiel kann Protein, das in PBS suspendiert ist, in einer Menge von mehr als 0,02 ml bei einer Konzentration von mehr als 0,1 mg/ml injiziert werden, und in diesem Fall ist eine Auffrischungsimpfung zu bevorzugen.

Kurzbeschreibung der Zeichnungsfiguren

[0048] [Fig. 1](#): Ergebnisse einer tBLASTn-Recherche in der Eimeria-EST-Datenbank unter Verwendung der N-terminalen Aminosäuresequenz von PfAMA-1.

[0049] [Fig. 2](#): Ergebnisse einer tBLASTn-Recherche in der Eimeria-tenella-Genomdatenbank unter Verwendung der Aminosäuresequenz von TgAMA-1.

[0050] [Fig. 3](#): Abbildungen von mutmaßlichen Exon/Intron-Bereichen von AMA-1 im Eimeria-tenella-Genom.

[0051] [Fig. 4](#): Ergebnisse einer Homologierecherche unter Verwendung der Aminosäuresequenz von Eimeria-tenella-AMA-1.

[0052] [Fig. 5](#): Konstruktion des Plasmids pGEX-EtAMA.

Liste der SEQ-ID-Sequenzen.

SEQ ID Nr. 1: cDNA-Sequenz des Eimeria-tenella-AMA-1-Gens.
 SEQ ID Nr. 2: Aminosäuresequenz des Eimeria-tenella-AMA-1-Proteins.
 SEQ ID Nr. 3: PCR-Primer BG708-F.
 SEQ ID Nr. 4: PCR-Primer BG003-R.
 SEQ ID Nr. 5: PCR-Primer BG003-F.
 SEQ ID Nr. 6: PCR-Primer c545-1F.
 SEQ ID Nr. 7: PCR-Primer c545-2R.
 SEQ ID Nr. 8: PCR-Primer c755-4F.
 SEQ ID Nr. 9: PCR-Primer c755-4R.
 SEQ ID Nr. 10: PCR-Primer für die ortsspezifische Mutagenese EcoAMA1.
 SEQ ID Nr. 11: PCR-Primer für die ortsspezifische Mutagenese AMA1Sal.
 SEQ ID Nr. 12: PCR-Primer für die ortsspezifische Mutagenese XbaAMA1.
 SEQ ID Nr. 13: PCR-Primer für die ortsspezifische Mutagenese AMA1endSal.
 SEQ ID Nr. 14: Oligonucleotid für Adjuvans CpG.
 SEQ ID Nr. 15: Oligonucleotid für Adjuvans CpG-30.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0053] Der Aufbau der Plasmide wurde im Wesentlichen nach den Standardtechniken der Molekularbiologie durchgeführt (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 2001). DNA-Restriktionsfragmente wurden einer Elektrophorese auf Agarose-Gelen unterzogen und mit einem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Kat. -Nr. 28704) gereinigt.

[0054] Eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde, wenn nichts anderes erwähnt ist, unter Verwendung von ExTaq-Polymerase (Produkt-Nr.: RR001A, TaKaRa Bio, Shiga, Japan) unter den Bedingungen von 30 Temperaturzyklen, die aus 1 Minute Denaturierung bei 94°C, 2 Minuten Assoziation bei 55°C und 3 Minuten Verlängerung bei 72°C bestanden, durchgeführt.

Beispiel 1

Klonierung von cDNA, die Eimeria-AMA-1 codiert

1.1 Herstellung einer Eimeria-tenella-cDNA-Bibliothek

[0055] Sporozysten wurden aus 1×10^8 Oocysten eines im Japanischen Feld isolierten Stammes von Eimeria tenella (Spende vom Research Institute for Animal Science, Kanagawa, Japan) nach dem auf diesem Gebiet üblichen Verfahren präpariert, mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml Lysepuffer (4M Guanidinthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, 0,5% Natriumlaurylsarcosinat und 0,1 M β -Mercaptoethanol) lysiert. Messenger-RNA wurde an einer Oligo(dT)-Säule (FastTrack 2.0 mRNA Isolation Kit, Invitrogen Carlsbad, Kalifornien) gereinigt und als Matrize für die cDNA-Synthese (cDNA Synthesis Kit, Produkt-Nr.: 6120, Takara Bio, Shiga, Japan) verwendet. Nach der Synthese von doppelsträngiger cDNA wurde eine cDNA-Bibliothek unter Verwendung eines cDNA Library Kit (Produkt-Nr.: 6119, TaKara Bio, Shiga, Japan) und des Cassette-Adapters im Kit hergestellt.

1.2 Recherche in der Eimeria-EST-Datenbank und Klonierung des 5'-Endes des Eimeria-AMA-1-Gens

[0056] Das Gen für AMA-1 des Malariaparasiten Plasmodium falciparum (PfAMA-1) und die entsprechenden Proteinsequenzen wurden bereits veröffentlicht. Es wurde in der Eimeria-EST-Datenbank mit dem Translating-BLAST-Tool (tBLASTn) (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/e_tenella/omni) recherchiert, wobei die N-terminale 392-Aminosäuren-Sequenz von PfAMA-1 (Proteindatenbank-Zugriffs-Nr.: AAA29475) verwendet wurde, und die Ergebnisse sind in [Fig. 1](#) gezeigt.

[0057] EST-Sequenzen mit hoher Punktzahl, die in [Fig. 1A](#) gezeigt sind, wurden aneinander ausgerichtet. Die Ergebnisse zeigten an, dass ein Teil (394 bp) von BG725003 mit dem von BG724708 identisch ist, wie in [Fig. 1B](#) gezeigt ist. Zwei PCR-Primer (BG708-F und BG003-R) wurden anhand des Teils vor und hinter dem identischen Bereich gestaltet (unterstrichene Sequenz in [Fig. 1B](#)). Sequenzen dieser PCR-Primer sind in SEQ ID Nr. 3 bzw. 4 gezeigt. Unter Verwendung dieser PCR-Primer (BG708-F und BG003-R) und der oben beschriebenen cDNA-Bibliothek als Matrize wurde eine PCR durchgeführt.

[0058] Bei der PCR wurde ein DNA-Fragment von etwa 0,6 kbp amplifiziert, das in den Plasmidvektor des PCR Script Amp Cloning Kit (STRATAGENE, Produkt-Nr.: 211188) ligiert wurde. Die resultierenden Transformanten wurden kultiviert, und jedes Plasmid wurde gereinigt. Der Insert jedes Plasmids wurde sequenziert, und es wurde ein Plasmid mit einem DNA-Fragment gefunden, das den 5'-untranslatierten Bereich von 181 bp und den N-terminalen Bereich (151 Aminosäuren) des offenen Leserasters (ORF), der zu PfAMA-1 homolog ist, codiert. Das Plasmid wurde pPCR-EtAMA1-N genannt.

1.3 Klonierung des mittleren und des 3'-Ende-Bereichs von Eimeria-AMA-1 unbekannter Sequenz

[0059] Eine schnelle 3'-Amplifikation des cDNA-Endes (3' RACE) wurde durchgeführt, wobei man einen neuen Primer (BG003-F; SEQ ID Nr. 5), der im 3'-Ende des Inserts von pPCR-EtAMA1-N existierte, und den Oligo(dT)-Primer, der im oben beschriebenen cDNA Synthesis Kit vorhanden ist (Takara Bio, Produkt-Nr.: 6120), verwendete, aber leider wurde keine DNA amplifiziert. Daher wurde als nächster Versuch mit dem Translating-BLAST-Tool (tBLASTn) (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/e_tenella/omni) unter Verwendung der Aminosäuresequenz von der 150. bis zur 240. Aminosäure von Toxoplasma gondii-AMA-1 (TgAMA-1) (Proteindatenbank-Zugriffs-Nr.: AAB65410) in der Eimeria-EST-Datenbank recherchiert, und infolgedessen wurde herausgefunden, dass die Aminosäuresequenz, die sich von der Sequenz des 753. bis 989.

[0060] Nucleotids von c001002545.Contig1 ableitet, mit der von TgAMA-1 homolog ist, wie in **Fig. 2A** gezeigt ist.

[0061] Weiterhin wurde in der Eimeria-EST-Datenbank auch mit dem Translating-BLAST-Tool (tBLASTn) (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/e_tenella/omni) unter Verwendung der Aminosäuresequenz von der 240. bis 420. Aminosäure von TgAMA-1 recherchiert, und infolgedessen wurde herausgefunden, dass die Aminosäuresequenz, die sich von der Sequenz des 990. bis 1046. Nucleotids von c001002545.Contig1 ableitet, mit der des 260. bis 276. Nucleotids von TgAMA-1 homolog ist, wie in **Fig. 2B** gezeigt ist. Die Aminosäuresequenz von der 260. bis 276. Aminosäure von TgAMA-1 erwies sich als homolog zu derjenigen, die vom 1255. bis 1305. Nucleotid von c001002545.Contig1 abgeleitet ist, wie in **Fig. 2C** gezeigt ist. Außerdem war die Aminosäuresequenz von der 336. bis 395. Aminosäure von TgAMA-1 zu derjenigen homolog, die von der Sequenz vom 711. bis 878. Nucleotid von c008400755.Contig1 abgeleitet ist, wie in **Fig. 2D** gezeigt ist.

[0062] Wegen der Annahme der Existenz eines Introns anhand der obigen Ergebnisse und der Regel des Spleißsignals wurde eine Exon-Intron-Struktur des Eimeria-AMA-1-Gens angenommen, wie in **Fig. 3** gezeigt ist. Aufgrund dieser Annahme wurden vier Primer (c545-1F, c545-2R, c755-4F, c755-4R: die Sequenzen sind jeweils SEQ ID Nr. 6 bis 9) gestaltet.

[0063] Eine PCR wurde durchgeführt, wobei die in Beispiel 1.1 beschriebene cDNA-Bibliothek als Matrize und der PCR-Primersatz c545-1F und c545-12R verwendet wurden. Das DNA-Fragment von etwa 450 bp wurde amplifiziert. Im Falle des PCR-Primersatzes c545-1F und c755-4R wurde das DNA-Fragment von etwa 850 bp amplifiziert, in den pBluescript-SK(+)-Plasmidvektor (STRATAGENE, Produkt-Nr.: 212205) eingefügt und sequenziert. Da die eingefügte DNA anscheinend einen zentralen Bereich von Eimeria-AMA-1 codiert, wurde das Plasmid als pBS-EtAMA1-M bezeichnet.

[0064] Dann wurde ein 3'-RACE durchgeführt, wobei die in Beispiel 1.1 beschriebene cDNA-Bibliothek als Matrize, der Primersatz c755-4F und der OligodT-Primer in dem oben beschriebenen cDNA Synthesis Kit (Takara Bio, Produkt-Nr.: 6120) verwendet wurde, und in der Folge wurde ein DNA-Fragment von etwa 630 bp amplifiziert. Das DNA-Fragment wurde auch in pBluescript SK(+) eingefügt und sequenziert. Die Sequenzdaten zeigten an, dass es sich bei dem Insert um die DNA handelte, die den C-terminalen Bereich von Eimeria-AMA-1 und einen 3'-untranslatierten Bereich enthält. Das eingefügte Plasmid wurde als pBS-EtAMA1-C bezeichnet.

[0065] Bei den Inserts von drei Plasmiden, pPCR-EtAMA1-N, pBS-EtAMA1-M und pBS-EtAMA1-C, handelte es sich aufgrund ihrer Sequenzdaten um den 5'-Terminus, das Zentrum bzw. den 3'-Terminus von cDNA, die Eimeria-tenella-AMA-1 codiert. Da die drei Inserts überlappende Enden hatten, wo es Restriktionsenzym-Schnittstellen gab, wurden sie unter Verwendung dieser Stellen zu einer einzigen kontinuierlichen cDNA verbunden (deren Sequenz in SEQ ID Nr. 1 gezeigt ist). Das Plasmid, das die kontinuierliche cDNA enthielt, wurde als pBS-EtAMA1 bezeichnet.

Beispiel 2

Nucleotid/Aminosäuresequenz-Analyse von Eimeria-AMA-1

[0066] Das DNA-Molekül von SEQ ID Nr. 1 hat insgesamt 2002 Nucleotide, die einen 5'-untranslatierten Bereich von 126 bp, ein offenes Leseraster von 536 Aminosäuren und einen 3'-untranslatierten Bereich einschließlich eines PolyA-Signals enthalten. Die Aminosäuresequenz ist in SEQ ID Nr. 2 gezeigt.

[0067] Eine Protein-Protein-BLAST(BLASTp)-Recherche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) wurde durchgeführt, wobei man die in SEQ ID Nr. 2 gezeigte Aminosäuresequenz verwendete. In der Proteindatenbank wurde kein identisches Protein gefunden, und das ähnlichste Protein war TgAMA-1 (E-Wert von $9e-92$ und 52% Homologie). Die BLASTp-Recherche-Ergebnisse sind in [Fig. 4](#) gezeigt. Außerhalb von TgAMA-1 war die Homologie zwar kleiner als 50%, doch wurde mit mehreren AMA-1 von Plasmodium-Spezies Treffer erzielt als Proteine mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu SEQ ID Nr. 2, was auch stark die Annahme stützt, dass es sich bei dem Protein von SEQ ID Nr. 2 um Eimeria-AMA-1 handelt. Bisher wurde die Nucleotid- oder Aminosäuresequenz von Eimeria-AMA-1 noch nicht veröffentlicht, und die Sequenz dieser Erfindung ist der erste Bericht über volle Sequenzdaten von Eimeria-AMA-1.

[0068] Aufgrund des Aminosäuresequenzprofils von SEQ ID Nr. 2 enthält Eimeria-AMA-1 ein Signalpeptid am N-Terminus (4. bis 25.) und eine Transmembrandomäne am C-Terminus (445. bis 467.). Daher wird vermutet, dass dieses Protein auf der Oberfläche des Eimeria-Parasiten existiert und sein C-Terminus (vom 468. bis zum Ende) die cytoplasmatische Domäne ist.

Beispiel 3

Produktion von antigenem Protein von Eimeria-AMA-1

3.1 Konstruktion eines E.-coli-Expressionsvektors für Eimeria-AMA-1

[0069] Um ein antigenes Protein von Eimeria-AMA-1 als GST-Fusionsprotein zu exprimieren, wurde ein E.-coli-Expressionsvektor pGEX-EtAMA wie folgt konstruiert ([Fig. 5](#)). Um eine DNA, die Eimeria-AMA-1 codiert, in einen pGEX-6p-3-Vektor (Amersham Nr. 27-4599-01), der ein GST-Gen enthält, zu ligieren, wurde ein DNA-Fragment von etwa 1,1 kbp durch PCR amplifiziert, wobei pBS-EtAMA1 als Matrize sowie EcoAMA1 (SEQ ID Nr. 10) und AMA1Sal (SEQ ID No. 11) als Primersatz verwendet wurden.

[0070] Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mit EcoRI und Sall geschnitten, durch eine Agarose-Gel-Elektrophorese fraktioniert und mit einem QIAquick Gel Extraction Kit gereinigt. Das Plasmid pGEX-6p-3 wurde ebenfalls mit EcoRI und Sall geschnitten, durch eine Agarose-Gel-Elektrophorese fraktioniert und mit einem QIAquick Gel Extraction Kit gereinigt. Diese gewonnenen DNA-Fragmente wurden miteinander ligiert, wobei pGEX-EtAMA entstand, und in kompetente E.-coli-Zellen von JM109 (TaKaRa Bio Inc., Japan) übertragen. Die resultierenden ampicillinresistenten Transformanten wurden zufällig herausgesucht und mit jeweils 2 ml LB-Brühe, die Ampicillin enthielt (LB+amp), kultiviert. Jedes Plasmid wurde nach den Standardverfahren (alkalische Lyse) präpariert und durch Schneiden mit Restriktionsenzym analysiert. Ein Zielplasmid, das durch Restriktionsenzymanalyse ausgewählt wurde, wurde mit zwei Sequenzprimern von Amersham, Nr. 27-1410-01 und 27-1411-01, sequenziert, um zu bestätigen, dass das Eimeria-AMA-1-Gen rastergleich in den pGEX-Vektor eingefügt wurde.

3.2 Expression eines antigenen Proteins von Eimeria AMA-1

[0071] E.-coli-BL21-Zellen (Amersham Nr. 27-1542-01) wurden mit pGEX-EtAMA transformiert. Die resultierenden Transformanten wurden 16 Stunden lang mit LB+amp-Brühe kultiviert, in 100 frische Volumina von LB+amp-Brühe eingeeimpft und zwei Stunden lang weiterkultiviert. Sie wurden nach der Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM mehr als drei Stunden lang kultiviert, durch Zentrifugation geerntet und mit Laemmli-Probenpuffer (60 mM Tris-Cl (pH 6,8), 25% Glycerin, 2% SDS, 5% 2-Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau) durch Kochen bei 100°C lysiert. Das Lysat wurde zur Elektrophorese (PAGE) auf 12,5%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, und das Gel wurde mit 0,05%iger Coomassie-Brilliant-Blau(CBB)-Lösung angefärbt. Das erwartete Protein von etwa 53 kDa wurde sehr gut als GST-Fusionsprotein induziert.

3.3 Reinigung eines antigenen Proteins von Eimeria AMA-1

[0072] BL21-Zellen, die mit pGEX-GAPDH transformiert wurden, wurden 16 Stunden lang in einer 2-ml-LB+amp-Brühe kultiviert und in frische 100-ml-LB+amp-Brühe eingepflegt und zwei Stunden lang weiterkultiviert. Sie wurden nach der Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM mehr als drei Stunden lang kultiviert, geerntet und zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Das Zellsediment wurde in Lysepuffer (50 mM Tris-Cl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2 mM 4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid (Merck Ltd., Japan; Produktname: Pefabloc SC), 1,5 mg/ml Lysozym) suspendiert und eine Stunde und 20 Minuten lang langsam geschüttelt, und danach wurde Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 0,3% hinzugefügt. Die Suspension wurde in ein Röhrchen übergeführt und 30 Minuten lang mit $12\ 000 \times g$ zentrifugiert. Das Sediment und der Überstand wurden getrennt und auf 12,5% SDS-PAGE aufgetragen. Die meisten Fusionsproteine fanden sich in der Sedimentfraktion.

[0073] Das Sediment wurde mit Laemmli-Probenpuffer suspendiert, gekocht und auf 8% SDS-PAGE aufgetragen. Das Zielfusionsprotein von 53 kDa wurde aus dem Gelbereich, in dem das Protein vorlag, eluiert und fraktioniert, wobei man einen Mini Whole Gel Eluter (Bio-Rad) mit dem Elutionspuffer (60 mM Tris-Cl (pH 8,7), 25 mM Borsäure) verwendete. Die gewonnenen Proteine in den Fraktionen wurden durch 12,5%-SDS-PAGE und CBB-Färbung überprüft, und die Fraktion, in der das Zielprotein vorlag und nicht mit anderen Proteinen kontaminiert war, wurde ausgewählt. Das antigene Protein von Eimeria-AMA-1 von etwa 1 mg wurde aus BL21-Transformanten gereinigt, die mit 100 ml LB+amp-Brühe kultiviert wurden, wie es hier beschrieben ist.

Beispiel 4

Immunantwort von Hühnern, die mit antigenem Protein von Eimeria-AMA-1 geimpft wurden

[0074] Das antigene Protein von Eimeria-AMA-1 (0,3 mg/ml), das so gereinigt wurde, wie es im obigen Beispiel 3 beschrieben ist, wurde mit dem gleichen Volumen Freund's vollständigem Adjuvans (FCA; Sigma) gemischt, wobei 2-ml-Micellen entstanden. Zehn Hühner, die 4 Wochen alt waren, wurden subkutan (sc) mit jeweils 0,2-ml-Micellen immunisiert und zweimal in Abständen von einer Woche einer sc-Auffrischungsimpfung mit derselben Menge an AMA-1-Protein und Freund's unvollständigem Adjuvans (IFA; Sigma) unterzogen.

[0075] Zehn Tage nach der letzten Immunisierung wurde den immunisierten Hühnern jeweils etwa 2 ml Blut entnommen, und die Lymphocyten des peripheren Bluts und Seren wurden durch Standardtechniken präpariert. Aus fünf nichtimmunisierten Hühnern wurden ebenfalls die Lymphocyten des peripheren Bluts und Seren als negative Kontrollproben präpariert.

[0076] Antikörper in den Seren gegen E.-tenella-Sporozoen wurden durch das Western-Blotting-Verfahren überprüft. 1×10^6 Sporozoen von E. tenella wurden mit Laemmli-Probenpuffer lysiert und 5 min lang gekocht und auf 12,5%-SDS-PAGE aufgetragen. Nach dem PAGE wurden die Proteine der Sporozoen durch Blotting auf eine PVDF-Membran (MILLIPORE; Produktname: Immobilon) aufgetragen. Nach dem Blotting wurde die Membran getrocknet und in insgesamt 12 Stücke geschnitten. Jedes Stück wurde 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (RT) mit jedem Serum (1:500 Verdünnung) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Membran 1 Stunde lang bei RT mit Ziegen-Anti-Hühner-IgG (H+L), konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (Verdünnung 1:1000; Bethyl, Inc. Katalog-Nr. A30-106AP) inkubiert, mehrmals mit PBS gewaschen und mit der Substratlösung von Bromchlorindolylphosphat/Nitroblautetrazolium (BCIP/NBT) entwickelt. Alle 10 Seren, die aus immunisierten Hühnern präpariert wurden, reagierten spezifisch auf etwa 60-kDa-Protein von Sporozoen, während zwei negative Kontrollseren nicht reagierten, obwohl es einige Proteine gab, die unspezifisch reagierten. Diese Ergebnisse zeigten an, dass das antigene Protein von Eimeria-AMA-1 bei Hühnern humorale Immunität induzieren kann und das Eimeria-AMA-1 von etwa 60 kDa in den E.-tenella-Sporozoen exprimiert wird.

Beispiel 5

Immunantworten von Hühnern, denen DNA-Impfstoff injiziert wird, der Eimeria-AMA-1-Gen enthält

[0077] Das Plasmid pNZ45/46BacpA, das in den Beispielen von US-Patent 6,764,684 beschrieben ist, wurde als Gerüstplasmidvektor für DNA-Impfstoff verwendet.

[0078] Um das DNA-Fragment zu erhalten, das Restriktionsenzym-Schnittstellen vor und nach dem ORF von Eimeria-AMA-1 enthält, wurde eine PCR durchgeführt, wobei pBS-EtAMA1 als Matrize und der Primersatz

XbaAMA1 (SEQ ID Nr. 12) und AMA1endSal (SEQ ID Nr. 13) verwendet wurde.

[0079] Die amplifizierte DNA von 1,6 kbp wurde mit XbaI und SalI geschnitten und in XbaI/SalI-Stellen von pNZ45/46BacpA (7,4 kb) eingefügt. Das resultierende Plasmid p45BacEtAMA1 (9 kbp) könnte als DNA-Impfstoff und/oder homologer Vektor für die Konstruktion von rekombinantem Herpesvirus des Truthahns verwendet werden.

[0080] Dann wurde zur Bewertung des Plasmids für DNA-Impfstoff eine Konfrontation von immunisierten Hühnern mit *Eimeria tenella* durchgeführt.

[0081] Befruchtete SPF-Eier der Linie M wurden vom NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE, Japan, bezogen und ausgebrütet. Die geschlüpften Hühner wurden in drei Gruppen eingeteilt. 1 mg des Plasmids p45BacEtAMA-1 und jeweils 0,1 mg des Adjuvans CpG (SEQ ID Nr. 14) und CpG-30 (SEQ ID Nr. 15) wurden mit 1 ml PBS verdünnt und zweimal im Alter von 2 und 9 Tagen durch in-vivo-Elektroporation (bei 50 V, 20 µs dreimal und noch dreimal mit umgekehrter Polarität unter Verwendung von Model ECM830; Gentronics Inc., San Diego, USA) subkutan in den Beinmuskel von Hühnern aus einer Gruppe eingepflegt. Die Hühner der anderen beiden Gruppen wurden nicht eingepflegt.

[0082] Vier Wochen später (im Alter von 37 Tagen) wurden die Körpergewichte von allen Hühnern gemessen. Die Hühner wurden außer einem aus zwei nichtimmunisierten Gruppen oral (in den Schlund der Hühner) mit 1000 sporulierten Oocysten des *E.-tenella*-Stamms Rt7 (aus japanischem Feld isoliert) konfrontiert. Nicht konfrontierte Hühner bildeten die negative Kontrolle (nicht immunisiert und nicht konfrontiert). Alle Hühner wurden bis 8 Tage nach der Konfrontation beobachtet und zur Messung des Körpergewichts vorbereitet. Kot wurde 5 bis 8 Tage nach der Konfrontation gesammelt, und Oocysten aus dem Kot wurden durch das Schwimmverfahren in gesättigter Kochsalzlösung überprüft. Wenn im Kot Oocysten nachgewiesen wurden, wurden die Oocysten des Kots nach der Zentrifugation in Chromsulfatlösung mikroskopisch gezählt und als Anzahl pro Gramm Kot berechnet. Die Ergebnisse der Gewichtszunahmen und der Zahl der abgegebenen Oocysten im Kot für jede Gruppe sind in Tabelle 1 gezeigt.

[0083] Tabelle 1 zeigt an, dass mit DNA-Impfstoff dieser Erfindung immunisierte Hühner sowohl in Bezug auf die Zahl der abgegebenen Oocysten im Kot als auch in Bezug auf die Gewichtszunahme von der nichtimmunisierten Konfrontationskontrolle statisch verschieden waren und dass DNA-Impfstoff eine schützende Immunität gegenüber Konfrontation durch *Eimeria tenella* induzieren könnte.

Tabelle 1

Gruppe	Zahl der Vögel	Bewertung	
		abgegebene Oocysten im Kot*	Gewichtszunahme (%)
nicht immunisierte, nicht konfrontierte Kontrolle	12	–	35,2 ± 3,8
nicht immunisierte Kontrolle	10	++	17,9 ± 2,0
immunisiert mit DNA-Impfstoff	10	+	30,0 ± 3,0

*: Zahl der Oocysten pro g Kot 6 Tage nach der Konfrontation: (–) bedeutet "unter der Nachweisgrenze" (10^3), (+) bedeutet weniger als 10^6 , (++) bedeutet über 10^6 .

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Zeon Corporation

<120> DNA, die für das Antigen 1 der apikalen Membran von *Eimeria* codiert

<130> HMJ04141EP

<160> 15

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2002

<212> DNA

<213> *Eimeria tenella*

<220>

<221> CDS

<222> (127)..(1737)

<223>

<400> 1

tgcagcagca gcagctggcg tggeccttct gcagcagttg cggctctcttg atattccatt 60

cgagtttgat tttactcaaa atttgaaaaa aagaaatccc aaaacttgaa aagacccccc 120

agcacc atg cgg cgg ctt tcc cca gct ctg ggc ctt ctt gct gcg gcc 168

Met Arg Arg Leu Ser Pro Ala Leu Gly Leu Leu Ala Ala Ala

1 5 10

ctc agc tgc gca ggg ccg gca gca ggg gtg cag cac aag ctg cag cac 216

Leu Ser Cys Ala Gly Pro Ala Ala Gly Val Gln His Lys Leu Gln His

15 20 25 30

agg cag cag cag cag cag cac agc cac gcc tca act tcg cat gct 264

Arg Gln Gln Gln Gln Gln His Ser His Ala Ser Thr Ser His Ala

35 40 45

DE 60 2005 003 429 T2 2008.10.02

gct gca gtt ctt gct gct tct tcg gat gca tcc aca gac tcc aat ccc	312
Ala Ala Val Leu Ala Ala Ser Ser Asp Ala Ser Thr Asp Ser Asn Pro	
50 55 60	
ttc atg cag ccg ccc tat gcc gag ttc atg gcc gga ttc aac att ccc	360
Phe Met Gln Pro Pro Tyr Ala Glu Phe Met Ala Gly Phe Asn Ile Pro	
65 70 75	
aaa gtc cac ggg agc ggg gtg tac gtg gac ctg ggg aac gac aaa gag	408
Lys Val His Gly Ser Gly Val Tyr Val Asp Leu Gly Asn Asp Lys Glu	
80 85 90	
gtg aag gga aag atg tac aga gag cct ggg ggc cgc tgt ccc gtc ttt	456
Val Lys Gly Lys Met Tyr Arg Glu Pro Gly Gly Arg Cys Pro Val Phe	
95 100 105 110	
ggc aaa aac atc gag ttt tat cag ccc ctg gat tcg gac ttg tac aaa	504
Gly Lys Asn Ile Glu Phe Tyr Gln Pro Leu Asp Ser Asp Leu Tyr Lys	
115 120 125	
aac gac ttt ctc gaa aat gtc ccg acg gaa gaa gca gca gca gca gca	552
Asn Asp Phe Leu Glu Asn Val Pro Thr Glu Glu Ala Ala Ala Ala Ala	
130 135 140	
aag ccc ctc ccc gga ggc ttc aac aac aac ttt ttg atg aaa gac aaa	600
Lys Pro Leu Pro Gly Gly Phe Asn Asn Asn Phe Leu Met Lys Asp Lys	
145 150 155	
aag ccc ttt tcg ccg atg tct gtg gcg cag ctc aac agc tac ccg cag	648
Lys Pro Phe Ser Pro Met Ser Val Ala Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Gln	
160 165 170	
ttg aag gcg cgg acg ggc ctg ggg aag tgc gcg gag atg agc tac ctg	696
Leu Lys Ala Arg Thr Gly Leu Gly Lys Cys Ala Glu Met Ser Tyr Leu	
175 180 185 190	
acg acg gcg gcg ggc agc agc tac aga tac ccc ttc gtg ttc ggc agc	744
Thr Thr Ala Ala Gly Ser Ser Tyr Arg Tyr Pro Phe Val Phe Gly Ser	
195 200 205	

DE 60 2005 003 429 T2 2008.10.02

aaa aag gac ttg tgc tat ttg ctg ctg gtc ccg ctg cag cgg ctc atg	792
Lys Lys Asp Leu Cys Tyr Leu Leu Leu Val Pro Leu Gln Arg Leu Met	
210 215 220	
ggg gaa aga tac tgt tca act cgg gga agt cct ccg ggc ctt tcc cac	840
Gly Glu Arg Tyr Cys Ser Thr Arg Gly Ser Pro Pro Gly Leu Ser His	
225 230 235	
ttc tgc ttc aaa ccc tta aag agt gtt tcc ctc cgc ccg cac ctg gtc	888
Phe Cys Phe Lys Pro Leu Lys Ser Val Ser Leu Arg Pro His Leu Val	
240 245 250	
tac ggc tcc gcc tac gtg ggc gag cgc ccc gac gac tgg gag acc aag	936
Tyr Gly Ser Ala Tyr Val Gly Glu Arg Pro Asp Asp Trp Glu Thr Lys	
255 260 265 270	
tgc ccg aac aag gcg gtg aag gac gcg gtg ttc ggg gtg tgg gag ggg	984
Cys Pro Asn Lys Ala Val Lys Asp Ala Val Phe Gly Val Trp Glu Gly	
275 280 285	
ggc cgc tgc gag gag cag cgg ctg cgg ctg ggc gcg cag act gca gca	1032
Gly Arg Cys Glu Glu Gln Arg Leu Arg Leu Gly Ala Gln Thr Ala Ala	
290 295 300	
gca gca gca aaa gaa gac tgc tgg gct ttg gct ttt aat aat cct ttt	1080
Ala Ala Ala Lys Glu Asp Cys Trp Ala Leu Ala Phe Asn Asn Pro Phe	
305 310 315	
gct gct tcc gac cag ccc aca tct caa gac gaa gca gca aca agt ccc	1128
Ala Ala Ser Asp Gln Pro Thr Ser Gln Asp Glu Ala Ala Thr Ser Pro	
320 325 330	
ggc tac tac ttc cct tcc atc acc ccc agc cag ccc aaa tcc ggg ggc	1176
Gly Tyr Tyr Phe Pro Ser Ile Thr Pro Ser Gln Pro Lys Ser Gly Gly	
335 340 345 350	

DE 60 2005 003 429 T2 2008.10.02

gtg ggg gtg aac ttc gcg agc tac tac ccc tcg ggc gag tgc gtc ctg	1224
Val Gly Val Asn Phe Ala Ser Tyr Tyr Pro Ser Gly Glu Cys Val Leu	
355 360 365	
tcg ggc gaa gtg ccc act tgt ttg ctg cca agg caa gga gca gca gca	1272
Ser Gly Glu Val Pro Thr Cys Leu Leu Pro Arg Gln Gly Ala Ala Ala	
370 375 380	
ttt act tct gtg ggg tct ttg gaa gaa gaa gaa ctt ccc cac tgc gac	1320
Phe Thr Ser Val Gly Ser Leu Glu Glu Glu Glu Leu Pro His Cys Asp	
385 390 395	
ccc aca ttt ccc gcc tcc ctg gga tcg tgc gat ccc agc tcc tgc aag	1368
Pro Thr Phe Pro Ala Ser Leu Gly Ser Cys Asp Pro Ser Ser Cys Lys	
400 405 410	
gcg atc ctc acg gag tgc agg ggc ggc cgc ctc gtc gag cag cag acg	1416
Ala Ile Leu Thr Glu Cys Arg Gly Gly Arg Leu Val Glu Gln Gln Thr	
415 420 425 430	
gac tgc gtc ccc gaa gac ggc agc aag tgc gag tct aaa ggg ggc ggt	1464
Asp Cys Val Pro Glu Asp Gly Ser Lys Cys Glu Ser Lys Gly Gly Gly	
435 440 445	
gtc ttc att ggg ctg gcc gtc gcg ggg ggt ctg ctg ctg ctg ctg ctg	1512
Val Phe Ile Gly Leu Ala Val Ala Gly Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu	
450 455 460	
acg gga ggg gct ttc ttc att tac aag cag cgg caa aaa gct ctt ccg	1560
Thr Gly Gly Ala Phe Phe Ile Tyr Lys Gln Arg Gln Lys Ala Leu Pro	
465 470 475	
aaa gaa tct tct ccg cag cga aca gat ttt gtt caa gac gaa gca gca	1608
Lys Glu Ser Ser Pro Gln Arg Thr Asp Phe Val Gln Asp Glu Ala Ala	
480 485 490	
aca ggc cgc ggc aaa aag aga cag tcc gat ttg gtg cag cag gcc gag	1656
Thr Gly Arg Gly Lys Lys Arg Gln Ser Asp Leu Val Gln Gln Ala Glu	
495 500 505 510	

DE 60 2005 003 429 T2 2008.10.02

ccg tcc ttt tgg gaa gaa gca gaa gct gat gag cct cac gcc gat gaa 1704
 Pro Ser Phe Trp Glu Glu Ala Glu Ala Asp Glu Pro His Ala Asp Glu
 515 520 525

aac acc caa gtg ctg ctg gac cag gaa tac tag tagcagcagc agcaacaaca 1757
 Asn Thr Gln Val Leu Leu Asp Gln Glu Tyr
 530 535

acagcagcag cagcagctac tgctgctgct gctgcagctg caggtgcagc tgcagcggca 1817

aaagagcagc aaagagcagc agcagcagca aagagcagca gcagcagcaa aaagcagcag 1877

cagcagcaaa agggaaattg aatttaactg aattcaattc gaattagttt cattcaaaag 1937

ttcttttctt caaattaact ctccattttc cttttttatt caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1997

aaaaa 2002

<210> 2

<211> 536

<212> PRT

<213> Eimeria tenella

<400> 2

Met Arg Arg Leu Ser Pro Ala Leu Gly Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ser
 1 5 10 15

Cys Ala Gly Pro Ala Ala Gly Val Gln His Lys Leu Gln His Arg Gln
 20 25 30

Gln Gln Gln Gln Gln His Ser His Ala Ser Thr Ser His Ala Ala Ala
 35 40 45

DE 60 2005 003 429 T2 2008.10.02

Val Leu Ala Ala Ser Ser Asp Ala Ser Thr Asp Ser Asn Pro Phe Met
 50 55 60

Gln Pro Pro Tyr Ala Glu Phe Met Ala Gly Phe Asn Ile Pro Lys Val
 65 70 75 80

His Gly Ser Gly Val Tyr Val Asp Leu Gly Asn Asp Lys Glu Val Lys
 85 90 95

Gly Lys Met Tyr Arg Glu Pro Gly Gly Arg Cys Pro Val Phe Gly Lys
 100 105 110

Asn Ile Glu Phe Tyr Gln Pro Leu Asp Ser Asp Leu Tyr Lys Asn Asp
 115 120 125

Phe Leu Glu Asn Val Pro Thr Glu Glu Ala Ala Ala Ala Ala Lys Pro
 130 135 140

Leu Pro Gly Gly Phe Asn Asn Asn Phe Leu Met Lys Asp Lys Lys Pro
 145 150 155 160

Phe Ser Pro Met Ser Val Ala Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Gln Leu Lys
 165 170 175

Ala Arg Thr Gly Leu Gly Lys Cys Ala Glu Met Ser Tyr Leu Thr Thr
 180 185 190

Ala Ala Gly Ser Ser Tyr Arg Tyr Pro Phe Val Phe Gly Ser Lys Lys
 195 200 205

DE 60 2005 003 429 T2 2008.10.02

Asp Leu Cys Tyr Leu Leu Leu Val Pro Leu Gln Arg Leu Met Gly Glu
 210 215 220

Arg Tyr Cys Ser Thr Arg Gly Ser Pro Pro Gly Leu Ser His Phe Cys
 225 230 235 240

Phe Lys Pro Leu Lys Ser Val Ser Leu Arg Pro His Leu Val Tyr Gly
 245 250 255

Ser Ala Tyr Val Gly Glu Arg Pro Asp Asp Trp Glu Thr Lys Cys Pro
 260 265 270

Asn Lys Ala Val Lys Asp Ala Val Phe Gly Val Trp Glu Gly Gly Arg
 275 280 285

Cys Glu Glu Gln Arg Leu Arg Leu Gly Ala Gln Thr Ala Ala Ala Ala
 290 295 300

Ala Lys Glu Asp Cys Trp Ala Leu Ala Phe Asn Asn Pro Phe Ala Ala
 305 310 315 320

Ser Asp Gln Pro Thr Ser Gln Asp Glu Ala Ala Thr Ser Pro Gly Tyr
 325 330 335

Tyr Phe Pro Ser Ile Thr Pro Ser Gln Pro Lys Ser Gly Gly Val Gly
 340 345 350

Val Asn Phe Ala Ser Tyr Tyr Pro Ser Gly Glu Cys Val Leu Ser Gly
 355 360 365

DE 60 2005 003 429 T2 2008.10.02

Glu Val Pro Thr Cys Leu Leu Pro Arg Gln Gly Ala Ala Ala Phe Thr
 370 375 380

Ser Val Gly Ser Leu Glu Glu Glu Glu Leu Pro His Cys Asp Pro Thr
 385 390 395 400

Phe Pro Ala Ser Leu Gly Ser Cys Asp Pro Ser Ser Cys Lys Ala Ile
 405 410 415

Leu Thr Glu Cys Arg Gly Gly Arg Leu Val Glu Gln Gln Thr Asp Cys
 420 425 430

Val Pro Glu Asp Gly Ser Lys Cys Glu Ser Lys Gly Gly Gly Val Phe
 435 440 445

Ile Gly Leu Ala Val Ala Gly Gly Leu Leu Leu Leu Leu Thr Gly
 450 455 460

Gly Ala Phe Phe Ile Tyr Lys Gln Arg Gln Lys Ala Leu Pro Lys Glu
 465 470 475 480

Ser Ser Pro Gln Arg Thr Asp Phe Val Gln Asp Glu Ala Ala Thr Gly
 485 490 495

Arg Gly Lys Lys Arg Gln Ser Asp Leu Val Gln Gln Ala Glu Pro Ser
 500 505 510

DE 60 2005 003 429 T2 2008.10.02

Phe Trp Glu Glu Ala Glu Ala Asp Glu Pro His Ala Asp Glu Asn Thr
515 520 525

Gln Val Leu Leu Asp Gln Glu Tyr
530 535

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Eimeria tenella

<400> 3

tgcagcagca gctggcgtgg cc

22

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Eimeria tenella

<400> 4

gttggtgaag cctccgggga ggggc

25

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Eimeria tenella

<400> 5

cccgacggaa gaagcagcag cagcagc

27

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Eimeria tenella

<400> 6
gcccctcccc ggaggcttca acaac 25

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Eimeria tenella

<400> 7
cacaccccgga acaccgctc cttcac 26

<210> 8
<211> 28
<212> DNA
<213> Eimeria tenella

<400> 8
cctcacggag tgcaggggcg gccgcctc 28

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> Eimeria tenella

<400> 9
gaggcgccg ccctgcact ccgtgagg 28

<210> 10
<211> 27
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Primer für ortsspezifische Mutagenese über PCR

<400> 10
gctgcttctt cgaattcatc cacagac 27

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Primer für ortsspezifische Mutagenese über PCR

<400> 11
gtccgctctgc tggtcgacga ggcggcc 27

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Primer für ortsspezifische Mutagenese über PCR

<400> 12
cccaaaactt gtctagaccc cccagc 26

<210> 13
<211> 29
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> Primer für ortsspezifische Mutagenese über PCR

<400> 13
ctgttggtgt cgactgctgc tgctactag 29

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <223> synthetisches Oligonucleotid für Adjuvans

<400> 14
 tccatgacgt tcctgacggt 20

<210> 15
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <223> synthetisches Oligonucleotid für Adjuvans

<400> 15
 accgataacg ttgccggtgt cgttaccacg 30

Patentansprüche

1. Isoliertes DNA-Molekül, das ein antigenes Protein, welches vom Antigen 1 der apikalen Membran von *Eimeria tenella* abgeleitet ist, oder ein Fragment davon, das gegenüber Antikörpern gegen das Antigen 1 der apikalen Membran von *Eimeria tenella* kreuzreaktiv ist, codiert, wobei die DNA wenigstens 150 aufeinanderfolgende Basen des offenen Leserasters der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Nucleotidsequenz umfasst oder unter hochstringenten Bedingungen mit der DNA von SEQ ID Nr. 1 hybridisierbar ist.

2. DNA-Molekül gemäß Anspruch 1, wobei das antigenes Protein eine Sequenz von wenigstens 50 aufeinanderfolgenden Resten der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Aminosäuresequenz, vorzugsweise wenigstens 200 aufeinanderfolgende Reste, umfasst.

3. DNA-Molekül gemäß Anspruch 2, wobei die Sequenz durch Insertion, Deletion und/oder Substitution von einer oder mehreren Aminosäuren in der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Sequenz modifiziert ist.

4. DNA-Molekül gemäß Anspruch 2, wobei die wenigstens 50 Reste die Reste 57 bis 276 der Sequenz ID Nr. 2 umfassen, die gegebenenfalls durch Insertion, Deletion und/oder Substitution von einer oder mehreren Aminosäuren in dieser Sequenz modifiziert ist.

5. DNA-Molekül gemäß Anspruch 2, wobei das antigenes Protein mehr als 90% Identität mit der in SEQ ID Nr. 2 gezeigten Aminosäuresequenz oder den genannten 50 aufeinanderfolgenden Resten davon aufweist.

6. DNA-Vektor, der das DNA-Molekül gemäß einem der vorstehenden Ansprüche enthält.

7. Wirtszelle, die einen DNA-Vektor gemäß Anspruch 6 aufweist.

8. Antigenes Protein des Antigens 1 der apikalen Membran von *Eimeria tenella*, das von dem DNA-Molekül gemäß Anspruch 1 codiert wird.

9. Antigenes Protein des Antigens 1 der apikalen Membran von *Eimeria tenella*, das wenigstens 50 aufeinanderfolgende Reste der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2 umfasst und das gegenüber Antikörpern gegen das Antigen 1 der apikalen Membran von *Eimeria tenella* kreuzreaktiv ist.

10. Antigenes Protein gemäß Anspruch 9, das wenigstens 200 aufeinanderfolgende Reste von SEQ ID Nr. 2, vorzugsweise die Reste 57 bis 276 von SEQ ID Nr. 2, umfasst.

11. Antigenes Protein gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10, das zur Verwendung bei einem Verfahren zur Behandlung eines Vogels bestimmt ist.

12. Antigenes Protein gemäß einem der Ansprüche 8 bis 11, das isoliert ist.

13. Verwendung eines antigenen Proteins gemäß einem der Ansprüche 8 bis 12 bei der Herstellung eines Impfstoffs zur Verwendung bei der Prophylaxe von Kokzidiose.

14. DNA-Impfstoff für Vogelkokzidiose, der das DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 enthält.

15. Protein-Impfstoff für Vogelkokzidiose, der das antigene Protein gemäß einem der Ansprüche 8 bis 12 enthält.

16. Verfahren zur Herstellung des antigenen Proteins gemäß einem der Ansprüche 8 bis 12, das das Kultivieren von Wirtszellen gemäß Anspruch 7 umfasst, wobei das antigene Protein exprimiert wird.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig.1

(A)

Sequenzen, die Segmentpaare mit hoher Punktzahl bilden:				Lese- raster	hohe PZ	Wahrscheinlichkeit P(N)	N
EMBL: <u>BG516125</u>	EtESTed49e08.y1	Eimeria tenella S5-2 cD...		+1	202	2.0e-16	1
EMBL: <u>BG725003</u>	EtESTed44d06.y1	Eimeria tenella S5-2 cD...		+1	178	9.0e-14	1
EMBL: <u>BG724708</u>	EtESTed87d05.y1	Eimeria tenella S5-2 cD...		+3	113	1.1e-10	2
EMBL: <u>A1759570</u>	EtESTea22c10.x1	Eimeria S5-2 Sporozoite...		-1	67	0.24	1
EMBL: <u>BM321931</u>	EtESTee19c06.y1	Eimeria tenella M5-6 cD...		+2	76	0.43	1
EMBL: <u>BG561244</u>	EtESTed82e07.y1	Eimeria tenella S5-2 cD...		+1	76	0.49	1
EMBL: <u>BM322018</u>	EtESTee20g07.y1	Eimeria tenella M5-6 cD...		-2	70	0.98	1

(B)

BG725003	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BG724708	1	AGACACCCGG	CGGCACTGCA	GCAGCAGCAG	CTGGCGTGGC	CCTTCTGCAG	CAGTTGCGGT
BG725003	1	-----	-----	-----	-TCAAAATTT	GAAAAAAGA	AATCCCAAAA
BG724708	61	CTCTTGATAT	TCCATTCGAG	TTTGATTTTA	CTCAAAATTT	GAAAAAAGA	AATCCCAAAA
BG725003	30	CTTGAAAAGA	CCCCCAGCA	CCATGCGGCG	GCTTTCCCCA	GCTCTGGGCC	TTCTTGCTGC
BG724708	121	CTTGAAAAGA	CCCCCAGCA	CCATGCGGCG	GCTTTCCCCA	GCTCTGGGCC	TTCTTGCTGC
BG725003	90	GGCCCTCAGC	TGCGCAGGGC	CGGCAGCAGG	GGTGCAGCAC	AAGCTGCAGC	ACAGGCAGCA
BG724708	181	GGCCCTCAGC	TGCGCAGGGC	CGGCAGCAGG	GGTGCAGCAC	AAGCTGCAGC	ACAGGCAGCA
BG725003	150	GCAGCAGCAG	CAGCACAGCC	ACGCCTCAAC	TTGCGATGCT	GCTGCAGTTC	TTGCTGCTTC
BG724708	241	GCAGCAGCAG	CAGCACAGCC	ACGCCTCAAC	TTGCGATGCT	GCTGCAGTTC	TTGCTGCTTC
BG725003	210	TTCGGATGCA	TCCACAGACT	CCAATCCCTT	CATGCAGCCG	CCCTATGCCG	AGTTCATGGC
BG724708	301	TTCGGATGCA	TCCACAGACT	CCAATCCCTT	CATGCAGCCG	CCCTATGCCG	AGTTCATGGC
BG725003	270	CAGATTCAAC	ATTCCCAAAG	TCCACGGGAG	CGGGG-TGTA	CGTGGACCTG	GGGAACGACA
BG724708	361	CAGATTCAAC	ATTCCCAAAG	TCCACGGGAG	CGGGGNTGTA	CGTGGACCTG	GGGAACGACA
BG725003	329	AAGAGGTGAA	GGGAAAGATG	TACAGAGAGC	CTGGGGGCCG	CTGTCCCGTC	TTTGGCAAAA
BG724708	421	AAGAGGTGAA	GGGAAAGATG	TACAGAGAGC	CTGGGGGCCG	CTGTCCCGTC	TTTGGCAAAA
BG725003	389	ACATCGAGTT	TTATCAGCCC	CTGGATTCCG	ACTTGTACAA	AAACGACTTT	CTCGAAAATG
BG724708	481	ACATCG-----	-----	-----	-----	-----	-----
BG725003	449	TCCCGACGGA	AGAAGCAGCA	GCAGCAGCAA	AGCCCCTCCC	CGGAGGCTTC	AACAACAACT
BG724708	486	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BG725003	509	TTTTG					
BG724708	486	-----					

Fig. 2

(A)

TgAMA1: 156 IKASTDLGRCAEFAFKTVAMDKNKKNKATKYRYPFVYDSKKRLCHILYVSMQLMEGKKYCSV 215
 +KA T LG+CAE ++ T A + YRYPFV+DSKK LC++L V +0 + G++YCS
 c001002545. Contig1: 753 VKARTGLGKCAEMSYLTTAA-----GSSYRYPFVDFDSSKDKLCLYLLLVPLORLMGERYCST 917

TgAMA1: 216 KGEPPDLTWYCFKPRKSVTENHHL 238
 +G PP L+ +CFKP KSV+ HL
 c001002545. Contig1: 918 RGSPPGLSHFCFKPLKSVSLRPHL 989

(B)

TgAMA1: 241 IYGSAYVGENPDAFISK 259
 +YGSAYVGE PD + +KC
 c001002545. Contig1: 990 VYGSAYVGERPDDWETKC 1046

(C)

TgAMA1: 260 NOALRGYRFGVWKKGRC 276
 N+A++ FGVW+ GRC
 c001002545. Contig1: 1255 NKAVKDAVFGVWEGGRC 1305

(D)

TgAMA1: 336 SGGVGRNYGFYYVDTTGEGKCALSDQVDPDCLVSDSAVSYTAAGSLSEETPNFI IPSNPS 395
 +GGVG N+ YY G+C LS +VP CL+ A ++T+ GSL EE P+ P+
 c008400755. Contig1: 711 AGGVGVNFASYPS----GECVLSGEVPTCLLPROGAAAFTSVGSLEEEELPHCDPTFPA 878

Fig. 4

(A)

Sequenzen, die signifikante Alignments ergeben: (bits) Wert
 AF010264_1(AF010264|pid:g2293476) *Toxoplasma gondii* apical memb... 339 9e-92
 PCU49743_1(U49743|pid:g1469496) *Plasmodium chabaudi* DS apical m... 148 3e-34

(B)

AF010264_1(AF010264|pid:g2293476) *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen 1 homolog (AMA1Tg)

Länge = 541

Punktzahl = 339 bits (861). Erwartungswert = 9e-92

Identitäten = 192/485 (39%), Positive = 255/485 (52%), Lücken = 37/485 (7%)

EtAMA1: 61 NPFM-QPPYAEFMAGFNIPKVVHSGVYVDLGNDEKVKGKMYREPGGRCVPVFGKNIIFYQP 119
 NPF FM FN+ H SG+YVDLG DKEV G +YREP G CP++GK+IE QP
 TgAMA1: 42 NPFQANVENKTFMERFNLTHHQSGIYVDLGQDKEVDGTLYREPAGLCPVWGHIELOQP 101

EtAMA1: 120 LQSDLYKNDFLNVPTE-EAAAAAKPLPGGFNNFLMKDKKPFSPMSVAQLNSYPQLKAR 178
 D Y+N+FLE+VPTE E + PLPGGFN NF+ + SP + L +KA
 TgAMA1: 102 -DRLPYRNNFLEDVPTKEKYKOSGNPLPGGFNLFVTPSGQRI SPFPMELLEKNSNIKAS 160

EtAMA1: 179 TGLGKCAEMSYLTTA-----AGSSYRYPFVFGSKKDLCYLLLVPLQRLMGERYCSTRGSP 233
 T LG+CAE ++ T A + YRYPFV+ SKK LC++L V +Q + G++YCS +G P
 TgAMA1: 161 TDLGRCAEFAFKTVAMDKNNKATKYRYPFYDSSKKRLCHILYVSMQLMEGKKYCSVKGEP 220

EtAMA1: 234 PGLSHCFKPLKSVSLRPHLVYGSAYVGERPDDWETKCPNKAVKDAVFGVWEGGRCEEOR 293
 P L+ +CFKP KSV+ HL+YGSAYVGE PD + +KCPN+A++ FGVW+ GRC +
 TgAMA1: 221 PDLTWYCFKPRKSVTENHHLIYGSAYVGENPDAFISKCPNQLRGYRFGVWKKGRCLDYT 280

EtAMA1: 294 LRLGAQTAAAAAKEDCWALAFNNPFAASDQP-TSQDEAATSPGYFFPSITPSQPKSGGVG 352
 K CW F N ASDQP T + S ++P QP SGGVG
 TgAMA1: 281 ELTDTVIERVESKAQCWVKTFENDGVASDQPHYPLTSQASWDDWVPLHQSDQPHSGGVG 340

EtAMA1: 353 VNFASY-----PSGECVLSGEVPTCLLPRQGAAAFSTVGSLEEEELPHCDPT----- 400
 N+ YY G+C LS +VP CL+ A ++T+ GSL EE P+
 TgAMA1: 341 RNYGFYVDTTGEGKCALSDQVPDCLVSDSAAVSYTAAGSLSEETPNFIIPSNPSVTPPT 400

EtAMA1: 401 -----FPASLGSCDPSSCKAILETCRGGRLVEOQDQVPEGSKCESKGGGVFI 449
 FP S G+CD +CK T C GG++ DC ++ ++C S
 TgAMA1: 401 PETALQCTADKFPDSFGACDVQACKRQKTSVGGQIQSTSVDCQTADEQNECGSNTALVAG 460

EtAMA1: 450 GLAVAGGLLLLLLTTGGAFFIYKORQKALPKESSPORTDFVQDEAATGRGKKRQSDLVQQA 509
 + +LL+LL+ G F R K + +++ +F D G KKR SDL+Q+A
 TgAMA1: 461 LAVGGVLLLLLGGGCFYAKRLDRNKGV--QAAHHEHEFQSDRGAR---KKRPSDLMQEA 515

EtAMA1: 510 EPSFW 514

EPSFW

TgAMA1: 516 EPSFW 520

Fig.5

