(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 35 472 T2** 2006.04.13

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 775 746 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 35 472.1**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 201 818.0**
(96) Europäischer Anmeldetag: **01.07.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.05.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **23.11.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.04.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C07K 14/455*** (2006.01)
A61K 39/012 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
95201801 03.07.1995 EP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Akzo Nobel N.V., Arnheim/Arnhem, NL

(74) Vertreter:
WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und Rechtsanwälte, 81541 München

(72) Erfinder:
Kok, Jacobus Johannes, 6546 DH Nijmegen, NL;
Van den Boogaart, Paul, 5344 SC Oss, NL;
Vermeulen, Arnoldus Nicolaas, 5431 HH Cuyk, NL

(54) Bezeichnung: **Impfstoff gegen Geflügelkokzidose**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein, welches von Eimeria acervulina abgeleitet ist, welches fähig ist, Immunlymphozyten zu stimulieren. Es betrifft auch eine Nukleinsäuresequenz, die alle oder einen antigenisch wesentlichen Anteil dieses Proteins kodiert, einen rekombinanten Vektor, der solch eine Nukleinsäuresequenz umfasst, eine Hostzelle oder einen Organismus, der mit solch einem rekombinanten Vektor transformiert wird und ein Impfstoff für den Schutz von Geflügel gegen Kokzidose.

[0002] Kokzidose ist eine Krankheit, die durch eine Infektion mit einem oder mehreren Arten von Kokzidien, intrazellulären protozoalen Parasiten des Subphylum Apicomplexa und der generischen Eimeria hervorgerufen wird. Geflügel wird hier als domestizierte Vögel definiert, die als eine Quelle von Eiern oder Fleisch dienen und die solche kommerziell wesentlichen Arten wie Hühner, Truthähne, Enten, Gänse, Perlhühner, Fasane, Tauben und Pfauen.

[0003] In Bezug auf Kokzidose in Hünchen ist bekannt, dass sie durch verschiedene Arten von Eimeria hervorgerufen wird, insbesondere Eimeria Acervulina, Eimeria Maxima, Eimeria Tenella, Eimeria Necatrix, Eimeria Brunetti, Eimeria Mitis, Eimeria Praecox, Eimeria Mivati und Eimeria Hagani. Einige Leute bezweifeln jedoch die tatsächliche Existenz der zwei zuletzt genannten Arten. Eine Infektion auf niedrigem Niveau mit jeglichen dieser Eimeria Arten ergibt eine schützende Immunität vor erneuter Infektion.

[0004] Die Arten unterscheiden sich in ihren pathogenen Effekt bei Hünchen, wobei die Art von Huhn auch eine Rolle spielt; so wird ein Brathuhn einen erheblichen Schaden durch einen Parasiten wie Eimeria Acervulina oder Eimeria Maxima erleiden, weil diese Parasiten grosse Teile des Dünndarms besetzen, wo die Verdauung der Nahrung eine wesentliche Rolle spielt.

[0005] Eimeria Acervulina ist einer der am meisten verbreiteten Arten, die in den Exkrementen von Hühnerzuchten in sowohl Europa als auch in den USA gefunden werden kann. Er hat ein grosses reproduktives Potential und wird als pathogenisch betrachtet, weil es eine merkliche Verminderung im Gewinn von Körpergewicht und höherer Essensausbeute erzeugt und grosse Läsionen in dem oberen Dünndarmbereich hervorruft.

[0006] Während des Lebenszyklus (siehe auch Tabelle 1) durchlaufen die Eimeria Parasiten eine Anzahl von Stufen. Der Lebenszyklus beginnt, wenn das Huhn die infektiöse Stufe aufnimmt, was als sporulierte Oozyste bekannt ist, während dem Fressen vom Boden oder dem Inhalieren von Staub. Die Wand der sporulierten Oozyste wird durch eine Kombination von mechanischer Abnutzungswirkung und chemischer Reaktion im Muskelmagen und Verdauungstrakt durchbrochen, was in der Freigabe von vier Sporozysten resultiert. Die Sporozysten gehen in den Zwölffingerdarm über, wo sie der Galle und Verdauungsenzymen ausgesetzt sind, was in der Freigabe von zwei Sporozoiten je sporulierter Oozyste resultiert.

Tabelle 1

Endogene Stufen von Eimeria Acervulina in Stammabschnitten von infiziertem Zwölffingerdarm (nach McDonald V. et al., Parasitol 8, 21–30, 1982).

Infektionszeit	Histologische Betrachtung
24 h	Unreife asexuelle Stufe erste Generation
36 h	Halbreife erste Generation Schizonten
42 h	Reife erste Generation Schizonten, Unreife zweite Generation Parasiten
48 h	Reife zweite Generation Schizonten, wenige dritte Generationen Schizonten mit 8 bis 16 Merozoiten
60 h	Reife dritte Generation Schizonten, Unreife vierte Generation Parasiten

[0007] Die Sporozoiten sind mobil und suchen nach geeigneten Host Epitheliumzellen, um in diese einzudrin-

gen und sich in diesen zu reproduzieren. Nach der Infektion von einer Epitheliumzelle, tritt der Parasit in die Schizontenphase seines Lebenszyklus ein, wobei er zwischen 8 und 16 bis über 200 Merozoiten je Schizont erzeugt. Sobald diese vom Schizonten freigelassen werden, sind die Merozoiten frei, weitere Epithel-Zellen zu infizieren. Nach zwei bis fünf von diesen asexuellen Reproduktionszyklen durchlaufen worden sind, wachsen die intrazellulären Merozyten in sexuelle Formen, die als weibliche oder Makrogametozyten und männliche oder Mikrogametozyten bekannt sind. Nach der Befruchtung der Makrogametozyten durch die Mikrogameten, die von den Mikrogametozyten freigelassen werden, wird eine Zygote ausgebildet, die eine Zystenwand um sich selbst erzeugt. Die neugeformte Oozyste wird von dem infizierten Huhn mit den Ausscheidungen abgegeben.

[0008] Bei korrekten Umgebungsbedingungen von Temperatur und Feuchtigkeit und ausreichenden Sauerstoff in der Luft wird die Oozyste in den infektiösen Zustand sporulieren, bereit, um einen neuen Host zu infizieren und damit die Krankheit weiterzugeben. Somit ist kein intermediärer Host für den Transfer von den Parasiten von Vogel zu Vogel erforderlich.

[0009] Das Ergebnis des Eimeria Parasiten, der den Verdauungstrakt eines Huhns infiziert, kann in einer Verminderung im Gewichtgewinn, einem erhöhten Futterumschlag oder dem Ausbleiben der Eiproduktion liegen und kann in manchen Fällen den Tod zu Folge haben. Die Erhöhung der Intensivhaltung von Geflügel wird durch schwere Verluste auf Grund dieses Parasiten begleitet, denn die Kokzidiose ist eine ökonomisch wesentliche parasitäre Krankheit geworden. In den Niederlanden verlieren die Geflügelfarmer jedes Jahr Millionen von Gulden; 1986 lag der Verlust bei 13 Millionen Gulden. Im selben Jahr ist ein Verlust von 300 Millionen Dollar in den Vereinigten Staaten von Amerika festgestellt worden.

[0010] In der Vergangenheit sind verschiedene Verfahren eingesetzt worden, um die Kokzidose zu kontrollieren. Vor der Ankunft von chemotherapeutischen Agentien sind verbesserte Sanitärbedingungen unter Einsatz von Desinfektionsmittel zusammen mit der mechanischen Entfernung von Ausscheidungen die hauptsächlich eingesetzten Verfahren gewesen; es verblieben jedoch üblicherweise ausreichend viele Oozysten, die die Krankheit übertragen konnten.

[0011] Die Einführung von Antikokzidose-Agentien im Futter oder Trinkwasser zusätzlich zu guter Verwaltung ergab einige Erfolge in der Kontrolle der Krankheit. Bei solchen Agentien ist jedoch festgestellt worden, dass sie über die Jahre an Effektivität verlieren, teilweise aufgrund der Entwicklung von medikamentresistenten Stämmen von Kokzidia. Darüber hinaus sind einige chemotherapeutische Agentien festgestellt worden, dass sie Residuen im Fleisch hinterlassen, was dieses ungeeignet für den Verbrauch macht.

[0012] Es sind Versuche durchgeführt worden, die Krankheit immunologisch durch Verabreichung eines Lebendimpfstoffs an Hühner zu kontrollieren, welche Oozysten von allen sieben Arten von Eimeria umfassen, wobei die Oozysten von früheren Linien verabreicht werden. Solche frühreifen Linien werden durch Inokulieren von Hühnern mit einer Wildpopulation der Eimeria Art erhalten und durch Sammeln der allerersten Parasiten, die als Ergebnis der Infektion ausgeschieden werden. Die gesammelten Parasiten werden zurück in die Hühner verfrachtet und der Zyklus wird mehrere male wiederholt. Es wird dann eventuell eine frühreife Linie von Parasiten erzeugt, die weniger Zyklen der asexuellen Reproduktion in den Eingeweiden aufweist. Da solche Linie ihre Immunogenizität behalten, während sie weniger Parasiten in den Eingeweiden erzeugen, was damit weniger Schaden in dem Host-Huhn hervorruft. Der Nachteil dieser Art von Impfstoff ist, dass er teuer herzustellen ist, weil er in lebenden Hühnern hergestellt werden muss und er nur ein geringes reproduktives Potential aufweist.

[0013] Das Aufkommen von Gentechnologie hat einige neue Methoden zum Herstellen von wirksamen Impfstoffen hervorgerufen. Unter Einsatz dieser Verfahren sind DNS, welche die antigenen Proteine von manchen pathogenen Mikroorganismen kodieren, in solchen Hostmikroorganismen wie Escherichia Coli oder Salmonella spec. geklont worden, wobei sich das Ergebnis ergeben hat, dass das Protein in ausreichend hohen Niveaus exprimiert worden ist, so dass es in einen Impfstoff übergeführt werden kann. Der Vorteil von Proteinen, die in dieser Art und Weise erstellt worden sind, liegt darin, dass sie nicht infektiös sind und relativ billig herzustellen sind. In dieser Art und Weise sind Impfstoffe hergestellt worden, die gegen eine Anzahl von Viren wie Hepatitis, Herpes Simplex und Maul und Klauenseuche wirken.

[0014] Es sind Versuche gemacht worden, auf dem biotechnologischen Weg einen Kokzidoseimpfstoff herzustellen. Die europäische Patentanmeldung EP 337 589 beschreibt die Isolierung eines Gruppe B Eimeria Tenella Proteins und seine Einfügung in einen neuen Expressionsvektor, der wiederum eingesetzt worden ist, um geeignete Hosts zu transformieren. Die PCT-Anmeldung WO 92/04461 beschreibt die Herstellung eines

Mikroorganismus, der ein antigenisches Protein erzeugt, wobei dieser entweder die "mRNS-Route" oder die Kern-DNS-Route einsetzt. In dieser Art und Weise sind gewisse Antigene von Eimeria Tenella und Eimeria Maxima hergestellt und sequenziert worden. Bei der Durchführung dieses Weges, um Antigene zur Einfügung in einen Impfstoff herzustellen, wird nur auf das Auswählen von Antigenen abgestellt, die Antikörper in einer heterologen Art erzeugen können. Diese Ansatz führt nicht zwangsläufig zur Auswahl des am meisten schützenden Antigens.

[0015] Aus H. S. Lillehoj (Vet. Immunol. Immunopath., 13, 321–330, 1986) kann entnommen werden, dass die Entwicklung von Schutzimmunität in Hühnern, die mit Kokzidia infiziert worden sind, auf Grund der Entwicklung einer Art spezifischen T Zellen-Antwort erreicht werden kann.

[0016] Es ist nun gefunden worden, dass ein sehr immunogenes Protein aus der Stufe nach 42 Stunden Entwicklung des Eimeria Schizonten isoliert werden kann. Überraschend ist dieses Protein intrazellulär in Eimeria gefunden worden und es scheint hohe Sequenzhomologie mit bekannten Heterologen Laktat-Dehydrogenasen (LDH) aufzuweisen.

[0017] Daher liefert die Erfindung ein Protein mit einer oder mehreren immunoaktiven und/oder antigenen Determinanten von Eimeria Laktat-Dehydrogenase, was ein monomerisches Molekulargewicht von ungefähr 37 kD aufweist.

[0018] Insbesondere wird die Laktat-Hydrogenase von Eimeria Acervulina abgeleitet.

[0019] Gemäss einem zweiten Aspekt der Erfindung wird eine Nukleinsäuresequenz angegeben, die alle oder einen wesentlichen Teil, insbesondere den immunologisch aktiven Teil einer gereinigten Eimeria Laktate-Hydrogenase kodiert. Solch eine Nukleinsäuresequenz kann in operativer Weise mit Exprimierungskontrollsequenzen verbunden sein, was in einem rekombinanten Nukleinsäuremolekül resultiert, welches, wenn es in einen geeigneten Vektor eingefügt wird, in einem rekombinanten Vektor resultiert, der fähig ist, die Nukleinsäuresequenz zu exprimieren.

[0020] Solch ein rekombinanter Vektor oder Nukleinsäuresequenz wie oben beschrieben, kann eingesetzt werden, um eine geeignete Hostzelle oder Organismus zu transformieren. Solch eine transformierte Hostzelle oder Organismus kann wiederum eingesetzt werden, um das stimulatorische Protein zu erzeugen, um es in einen Impfstoff für den Schutz von Geflügel gegen Kokzidose einzubringen. Alternativ kann die transformierte Hostzelle oder der Organismus selber in einen Impfstoff eingebettet werden.

[0021] Im Allgemeinen bezieht sich der Begriff "Protein" auf eine Molekularkette von Aminosäuren mit biologischer Aktivität. Ein Protein ist nicht von einer spezifischen Länge und kann, falls erforderlich, in vivo oder in vitro modifiziert werden, Beispielsweise durch Glykosylatian, Amidation, Karboxylation oder Phosphorylation; daher sind unter anderem Peptide, Oligopeptide und Polypeptide in dieser Definition inbegriffen.

[0022] Insbesondere liefert diese Erfindung Proteine mit LDH-Aktivität oder immunogenische aktive Teile davon, die die Aminosäuresequenz aufweisen, die in der Sequenz ID Nr. 2 dargestellt sind und ihre biologisch funktionellen Äquivalente oder Varianten.

[0023] Die biologisch funktionellen Äquivalente oder Varianten der Proteine, welche spezifisch hier beschrieben sind, sind Proteine, die von den oben erwähnten Aminosäurensequenzen abgeleitet worden sind, Beispielsweise durch Löschungen, Einfügungen und/oder Ersetzungen von einer oder mehreren Aminosäuren, aber sie behalten eine oder mehrere immunogene Determinanten des Eimeria Antigens, das heisst, die besagten Varianten haben eine oder mehrere Epitope, die fähig sind, eine Immunantwort in einem Hosttier hervorzurufen.

[0024] Es ist wohl verstanden, dass für die hier speziell umfassten Proteine, natürliche Variationen zwischen unterschiedlichen Eimeria Parasiten oder Stämmen existieren können. Diese Variationen können durch eine oder mehrere Aminosäureunterschiede in der Gesamtsequenz oder durch Löschungen, Substitutionen, Einfügungen, Inversionen oder Hinzufügungen von einer oder mehreren Aminosäuren in der besagten Sequenz gezeigt werden. Aminosäureersetzungen, die nicht wesentlich biologische oder immunologische Aktivitäten ändern, sind Beispielsweise durch Neurath et al. in "The Proteins" von Academic Press New York (1979) beschrieben worden. Aminosäurenersetzungen zwischen bezogenen Aminosäuren oder Ersetzungen, die häufig in der Evolution aufgetreten sind, sind unter anderem Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val (siehe Dayhof, M. D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D. C., 1978, Band 5,

Supplement 3). Andere Aminosäurensubstitutionen umfassen Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Leu/Ile, Leu/Val und Ala/Glu. Basierend auf dieser Information haben Lipman und Pearson ein Verfahren zum schnellen und empfindlichen Proteinvergleich entwickelt (Science, 227, 1435–1441, 1985) und zur Bestimmung der funktionalen Ähnlichkeit zwischen homologen Proteinen. Solche Aminosäurensubstitutionen von beispielhaften Ausführungsbeispielen dieser Erfindung sind innerhalb des Rahmens der Erfindung, so lang die sich ergebenden Proteine ihre Immunoreaktivität behalten.

[0025] Weiterhin sind auch immunogene Fragmente von Proteinen hier spezifisch offenbart und ihre funktionalen Varianten sind in der vorliegenden Erfindung eingeschlossen.

[0026] Der Begriff "Fragment" wird hier benutzt als DNS oder Aminosäurensequenz, die eine Untersequenz der Nukleinsäuresequenz oder des Proteins der Erfindung enthält. Das besagte Fragment ist oder kodiert ein Polypeptid mit einem oder mehreren immunogenen Determinanten eines Eimeria Antigens. Verfahren zur Bestimmung von geeigneten einsetzbaren immunogenen Polypeptid-Fragmenten sind unten beschrieben. Fragmente können unter anderem durch enzymatisches Abschneiden von Prekursor-Molekülen hergestellt werden, unter Einsatz von Restriktions-Endonukleasen für die DNS und Proteasen für die Polypeptide. Andere Verfahren umfassen die chemische Synthese von Fragmenten oder die Expression von Polypeptid-Fragmenten durch DNS-Fragmente.

[0027] Geeignete immunogene Polypeptid-Fragmente eines Proteins gemäss der Erfindung enthalten eine oder mehrere Epitope und können gefunden werden durch das Mittel des Verfahrens, welches in der Patentanmeldung WO 86/06487, Geysen, H. M. et al. (in Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 3998–4002, 1984), Geysen, H. M. et al. (J. Immunol. Meth. 102, 259–274, 1987), welches auf dem sogenannten Pepscan-Verfahren beruht, wobei eine Abfolge von teilweise überlappenden Peptiden entsprechend Teilsequenzen der kompletten betrachteten Polypeptide synthetisiert werden und ihre Reaktivität mit Antikörpern untersucht wird.

[0028] Zusätzlich kann eine Anzahl von Bereichen des Polypeptids, mit der genannten Aminosäuresequenz, als Epitop auf der Basis von theoretischen Betrachtungen und strukturellen Gleichheiten mit Epitopen bezeichnet werden, die nun bekannt sind. Diese Bestimmung von diesen Bereichen basiert auf einer Kombination der Hydrophilizitäts-Kriterien nach Hopp und Woods (Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 3824–3828, 1981) und den sekundären Strukturaspekten gemäss Chou und Fasman (Advances in Enzymology 47, 45–148, 1987).

[0029] T-Zellen Epitopen, die notwendig sein können, können in gleicher Weise auf theoretischer Basis abgeleitet werden, Beispielsweise mit der Hilfe von Berzofsky's Amphiphiliztäts-Kriterium (Science 235, 1059–62, 1987).

[0030] Die Erfindung liefert weiter isolierte und gereinigte Nukleinsäuresequenzen, die die oben genannten Proteine von Eimeria kodieren. Eine dieser Nukleinsäuresequenzen ist in der Sequenz ID Nr. 1 dargestellt. Es ist im Stand der Technik wohl bekannt, dass die Degeneration des genetischen Codes die Substitution von Basen in dem Kodon erlaubt, was in einem Kodon resultiert, aber der immer noch für die gleiche Aminosäure kodiert, das heisst der Kodon für die Aminosäure Glutamatsäure ist sowohl GAT als auch GAA. In der Konsequenz ist es klar, dass für die Exprimierung eines Proteins mit der Aminosäurensequenz, die in der Sequenz ID Nr. 2 dargestellt ist, die Nukleinsäuresequenz eine Kodonzusammensetzung haben kann, die unterschiedlich ist zu der Nukleinsäuresequenz, die in der Sequenz ID Nr. 1 dargestellt ist.

[0031] Eine Nukleinsäuresequenz gemäss der vorliegenden Erfindung kann aus einem Eimeria-Stamm isoliert werden und durch rekombinante DNS-Techniken multipliziert werden, umfassend Polymerasekettenreaktion (PCR) Technologie oder kann chemisch synthetisiert werden in vitro durch Techniken, die im Stand der Technik bekannt sind.

[0032] Eine Nukleinsäuresequenz gemäss der Erfindung kann mit verschiedenen replikationsbewirkenden DNS-Sequenzen ligiert werden, mit denen es nicht assoziiert ist oder in Natur verbunden ist, was in einem so genannten rekombinanten Vektor resultiert, der eingesetzt werden kann für die Transformation eines geeigneten Hosts. Geeignete rekombinante Vektoren sind vorzugsweise aus Plasmiden, Bakteriophagen, Kosmiden oder Viren abgeleitet.

[0033] Spezifische Vektoren oder Klonvehikel, die eingesetzt werden können, um Nukleinsäuresequenzen gemäss der Erfindung zu klonen, sind im Stand der Technik bekannt und umfassen unter anderem Plasmidvektoren wie pBR322, die verschiedenen pUC, pGEM und Bluescript Plasmide; Bakteriophage, Beispielsweise λgt-Wes, Charon 28 und die von M13 abgeleiteten Phagen oder viralen Vektoren wie SV40, den Adenovirus

oder Polyomavirus (siehe auch Rodriquez, R. L. und D. T. Denhardt, Herausgeber Vektors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Butterworths, 1988; Lenstra, J. A. et al., Arch. Virol., 110, 1–24, 1990). Die Verfahren, die für die Herstellung eines rekombinanten Vektors gemäss der Erfindung einzusetzen sind, sind den Fachleuten wohl bekannt und unter anderem in Maniatis, T. et al., (Molecular Cloning A Laboratory Manual, zweite Ausgabe; Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) beschrieben.

[0034] Beispielsweise kann die Einfügung der Nukleinsäuresequenz gemäss der Erfindung in einen klonenden Vektor in einfacher Weise erreicht werden, wenn sowohl die Gene als auch die gewünschten Klonvehikel mit den selben Restriktionsenzymen geschnitten sind, wie die komplementären DNS-Endstücke, die so hergestellt worden sind.

[0035] Alternativ kann es notwendig sein, die Restriktionsorte, die hergestellt worden sind, in stumpfe Enden („blunt ends") zu modifizieren, durch entweder die Verarbeitung der einzelsträngigen DNS oder durch Füllen in den einzelsträngigen Endpunkten mit einer geeigneten DNS-Polymerase. Nachfolgend ist die stumpfe Endligierung mit einem Enzym, wie T4 DNS-Ligase, ausgeführt.

[0036] Falls gewünscht kann jeder Restriktionsort durch ligierende Verbinder auf die DNS-Endstücke produziert werden. Solche Verbinder können spezifische Oligonukleotidsequenzen umfassen, die die Restriktionsortsequenzen kodieren. Der durch das Restriktionsenzym geschnittene Vektor und die Nukleinsäuresequenz können durch homopolymerisches Tailing (Schwanzanbindung) modifiziert werden.

[0037] Der Begriff "Transformation", wie er hier benutzt wird, bezieht sich auf die Einführung einer heterologen Nukleinsäuresequenz in einer Hostzelle, unabhängig von dem eingesetzten Verfahren, beispielsweise durch direkte Aufnahme oder Transduktion. Die heterologe Nukleinsäuresequenz kann durch autonome Replikation oder, in alternativer Weise, in das Hostgenom integriert werden. Falls gewünscht, werden die rekombinanten Vektoren mit geeigneten Steuersequenzen versehen, die mit dem vorgesehenen Host kompatibel sind. Diese Sequenzen können die Exprimierung der eingefügten Nukleinsäuresequenz regulieren. Zusätzlich zu Mikroorganismen, können auch Zellkulturen, die von multizellulären Organismen abstammen, als Hosts eingesetzt werden.

[0038] Die rekombinanten Vektoren gemäss der Erfindung enthalten vorzugsweise einen oder mehrere Markeraktivitäten, die eingesetzt werden können, um gewünschte Transformanten, wie Ampizillin und Tetrazyklin-Resistenz in pBR322, Ampizillin-Resistenz und α-Peptid von β-Galaktosidase in pUC8 auszuwählen.

[0039] Eine geeignete Hostzelle ist ein Mikroorganismus oder eine Zelle, die durch eine Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid kodiert, oder durch einen rekombinanten Vektor transformiert werden kann, der solch eine Nukleinsäuresequenz enthält, und welche, falls gewünscht, eingesetzt werden kann, um das besagte Polypeptid zu exprimieren, welches durch die besagte Nukleinsäuresequenz kodiert ist. Die Hostzelle kann von prokaryotischem Ursprung sein, beispielsweise von Bakterien, wie Escherichia Coli, Bacillus subtilis und Pseudomonas-Arten; oder von eukaryotischem Ursprung wie Hefe, beispielsweise Saccharomyces cerevisiae oder höhere eukaryotische Zellen wie Insekten-, Pflanzen- oder Säugetierzellen, umfassend auch HeLa-Zellen und Eierstockzellen vom chinesischen Hamster (CHO). Insektenzellen umfassen die Sf9-Zelllinie von Spodoptera frugiperda (Luckow et al., Biotechnology 6, 47–55, 1988). Information in Bezug auf das Klonieren und Exprimieren der Nukleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung in eukaryotischen Klonier-Systemen kann in der Veröffentlichung von Esser, K. et al., (Plasmids of Eukaryotes, Springer-Verlag, 1986) gefunden werden.

[0040] Allgemein werden Prokaryotiszellen für die Herstellung der rekombinanten Vektoren bevorzugt, die gemäss der vorliegenden Erfindung sinnvoll sind. E. Coli K12 Stämme sind besonders nützlich, insbesondere DH5a oder MC1061 Stämme.

[0041] Zur Exprimierung werden Nukleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung in ein Exprimierungsvektor eingeführt, das heisst die besagten Sequenzen sind in operativer Weise mit Exprimierungssteuersequenzen verlinkt. Solche Steuersequenzen können Promoter, Verstärker, Operatoren, Inducer, Ribosombindungsorte etc. enthalten. Daher liefert die vorliegende Erfindung einen rekombinanten Vektor, der eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die ein obengenanntes identifiziertes Eimeriaprotein kodiert, entsprechend mit den Exprimierungssteuersequenzen verbunden ist, welches fähig ist, die DNS-Sequenzen, die darin enthalten sind, in einer oder mehreren transformierten Hostzellen zu exprimieren.

[0042] Es ist wohlverstanden, dass natürlich die Nukleotidsequenzen, die an dem ausgewählten Ort des Klonvektors eingefügt worden sind, Nukleotide enthalten können, die nicht Teil des tatsächlichen Strukturgens

für das gewünschte Polypeptid sind oder die nur ein Fragment des kompletten Strukturgens für das gewünschte Protein enthalten, so lange der transformierte Host ein Polypeptid erzeugen wird, welches mindestens eine oder mehrere immunogene Determinanten eines Eimeriaproteinantigens hat.

[0043] Wenn die Hostzellen Bakterien sind, können nützliche Exprimierungssteuersequenzen, die hier eingesetzt werden können, den Trp-Promoter und Operator umfassen (Goeddel, et al., Nucl. Acids Res., 8, 4057, 1980); den lac-Promoter und Operator (Chang, et al., Nature, 275, 615, 1978); den äusseren Membranprotein-Promoter (Nakamura, K. und Inouge, M., EMBO J., 1, 771–775, 1982); die Bakteriophagen Lambda-Promoter und Operatoren (Remaut, E. et al., Nucl. Acids Res., 11, 4677–4688, 1983); die α-Amylase (B. Subtilis) Promoter und Operator, Endsequenzen und andere Exprimierungsverbesserungen und Steuersequenzen, die mit der ausgewählten Hostzelle kompatibel sind. Wenn die Hostzelle Hefe ist, können erläuternde nützliche Exprimierungssteuersequenzen umfassen beispielsweise den α-Prüfvektor. Für Insektenzellen können die Polyhedrin oder p10-Promotoren von Baculoviren eingesetzt werden (Smith, G. E. et al., Mol. Cell. Biol. 3, 2156–65, 1983). Wenn die Hostzelle von Säugetieren abstammt, können erläuternde nützliche Exprimierungssteuersequenzen den SV-40 Promoter umfassen (Berman, P. W. et al., Science, 222, 524–527, 1983) oder den Metallothionein-Promoter (Brinster, R. L., Nature, 296, 39–42, 1982) oder einen Hitzeschock-Promoter (Voellmy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4949–53, 1985). Alternativ können auch die Exprimierungssteuersequenzen, die in Eimeria vorhanden sind, angewandt werden. Für die Maximierung der Genexprimierung siehe auch Roberts und Lauer (Methods in Enzymology, 68, 473, 1979).

[0044] Daher kann die Erfindung auch eine oder mehrere Hostzellen umfassen, die eine Nukleinsäuresequenz oder ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül oder einen rekombinanten Vektor enthalten, wie oben beschrieben, der fähig ist, das Eimeriaprotein durch Exprimierung der Nukleinsäuresequenz herzustellen.

[0045] Die Immunisierung von Geflügel gegen Eimeriainfektion kann erreicht werden durch Verabreichung eines Proteins gemäss der Erfindung an die Vögel in einem immunologisch relevanten Kontext als sogenanntes Subunit-Impfstoff. Der Subunit-Impfstoff gemäss der Erfindung kann ein Protein in reiner Form enthalten, optional in Gegenwart eines pharmazeutisch verträglichen Trägers. Das Protein kann in optionaler Weise in kovalenter Weise mit einem nicht bezogenen Protein verbunden sein, was zur Reinigung des Fusionsproduktes von Vorteil sein kann. Beispiele sind β-Galaktosidase, Protein A, Prochymosin, Blutkoalogierfaktor Xa, etc.

[0046] In einigen Fällen kann die Fähigkeit, eine Schutzimmunität zu erhöhen, unter Einsatz dieser Proteine an sich sehr gering sein. Kleine Fragmente werden vorzugsweise an Trägermoleküle konjugiert, um ihre Immunogenizität zu erhöhen.

[0047] Geeignete Träger für diesen Zweck sind Makromoleküle, wie natürliche Polymere (Proteine wie das Schlüsselloch Limpet Hemocyanin, Albumin, Toxine), synthetische Polymere wie Polyaminosäuren (Polylysin, Polyalanin) oder Mizellen von amphiphilischen Verbindungen wie Saponine. Alternativ können diese Fragmente als Polymere von diesen geliefert werden, vorzugsweise als lineare Polymere.

[0048] Falls erforderlich können die Proteine gemäss der Erfindung, die in einem Impfstoff zu verwenden sind, in vitro oder in vivo verändert werden, beispielsweise durch Glycosylation, Acylation, Amidation, Carboxylation oder Phosphorylation.

[0049] Eine neu entwickelte Impfstoffversion ist ein Impfstoff, bei dem die DNS, welche für das Protein gemäss der Erfindung kodiert, in einer pharmazeutisch verträglichen Form verabreicht wird, beispielsweise in Gestalt von Geschossen ("bullets"), die in das Gewebe geschossen werden können. Diese nackte DNS kann als ein Impfstoff eingesetzt werden, sofern er in einem Plasmid oder in einer Kombination mit geeigneten eukaryotischen Promotersequenzen vorgelegt wird, wie beispielsweise solche des SV40-Virus. In dieser Art und Weise kann man die Einführung dieser DNS in genomische DNS erreichen und so die Exprimierung des Antigens in situ gewährleisten.

[0050] Eine Alternative für Subunit-Impfstoffe sind Lebendimpfstoffe. Eine Nukleinsäuresequenz gemäss der Erfindung wird durch rekombinante DNS-Techniken in Mikroorganismen (beispielsweise ein Bakterium oder ein Virus) in solch einer Art und Weise eingeführt, dass der rekombinante Mikroorganismus immer noch fähig ist, sich zu replizieren, wodurch ein Polypeptid exprimiert wird, welches durch die eingefügte Nukleinsäuresequenz kodiert wird und eine Immunantwort in dem infizierten Hostvogel hervorruft.

[0051] Ein bevorzugtes Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinanter Vektorvirus, der eine heterologe Nukleinsäuresequenz wie oben beschrieben enthält, die fähig ist, die DNS-Sequenz in ei-

ner oder mehreren Hostzellen oder einem Hostvogel zu exprimieren, der mit dem rekombinanten Vektorvirus infiziert ist. Der Begriff "heterolog" weist darauf hin, dass die Nukleinsäuresequenz gemäss der Erfindung nicht normaler Weise in der Natur in dem Vektorvirus enthalten ist.

[0052] Weiterhin umfasst die Erfindung eine Hostzelle oder mehrere Hostzellen oder eine Zellkultur, die mit dem rekombinanten Vektorvirus infiziert ist, fähig, das Eimeriaprotein durch Exprimierung der Nukleinsäuresequenz herzustellen.

[0053] Beispielsweise kann die gut bekannte Technik der in vivo homologen Rekombination eingesetzt werden, um eine heterologe Nukleinsäuresequenz gemäss der Erfindung in das Genom des Vektorvirus einzuführen.

[0054] Zuerst wird ein DNS-Fragment, welches mit einem Einführungsbereich des Vektorgenoms entspricht, das heisst einem Bereich, der für die Einführung einer heterologen Sequenz ohne das Zerstören von wesentlichen Funktionen des Vektors wie diejenigen eingesetzt werden kann, die für die Infektion oder die Replikation notwendig sind, in einem Kloniervektor gemäss Standard-recDNS-Techniken eingeführt. Einführungsbereiche sind für eine grosse Anzahl von Mikroorganismen genannt worden (beispielsweise EP 80,806, EP 110,385, EP 83,286, EP 314,569, WO 88/02022, WO 88/07088, US 4,769,330 und US 4,722,848).

[0055] Zweitens kann, falls gewünscht, eine Löschung in den Einführungsbereich eingeführt werden, der in dem rekombinanten Vektormolekül vorhanden ist, welches aus dem ersten Schritt erhalten worden ist. Dies kann beispielsweise durch geeignete Exonuklease III-Verarbeitung oder Restriktionsenzymbehandlung des rekombinanten Vektormoleküls aus dem ersten Schritt erreicht werden.

[0056] Drittens wird die heterologe Nukleinsäuresequenz in den Einführungsbereich eingeführt, der in dem rekombinanten Vektor des ersten Schrittes vorhanden ist oder anstelle der DNS, die von dem besagten rekombinanten Vektor gelöscht wird. Die Einführungsbereich-DNS-Sequenz sollte von geeigneter Länge sein, um es zu gestatten, das die homologe Rekombination mit dem Vektorgenom auftritt. Danach können geeignete Zellen mit dem Wildtypusvektorvirus infiziert oder mit vektorgenomischer DNS in Anwesenheit des rekombinanten Vektors transformiert zu werden, der die Einführung enthält, flankiert von geeigneten Vektor-DNS-Sequenzen, wobei die Rekombination zwischen den entsprechenden Bereichen in dem rekombinanten Vektor und dem Vektorgenom geschieht. Die Nachkommenschaft des rekombinanten Vektors kann nun in Zellkulturen hergestellt werden und kann beispielsweise genotypisch oder phenotypisch ausgewählt werden, beispielsweise durch Hybridisation, durch Feststellen von Enzymaktivität, die durch ein Gen kodiert wird, welches mit der heterologen Nukleinsäuresequenz co-integriert wird, oder durch Feststellen des antigenen heterologen Polypeptids, welches durch den rekombinanten Vektor immunologisch exprimiert wird.

[0057] Danach können die rekombinanten Mikroorganismen Geflügel verabreicht werden, um diese zu immunisieren, wonach sie sich selbst für einige Zeit aufrecht erhalten oder selbst im Körper des inokulierten Tieres replizieren, in vivo ein Polypeptid exprimieren, welches für die eingeführte Nukleinsäuresequenz gemäss der Erfindung kodiert, was in der Stimulierung des Immunsystems des inokulierten Tieres resultiert. Geeignete Vektoren für die Einfügung einer Nukleinsäuresequenz gemäss der Erfindung kann von Viren abgeleitet werden, wie Pockenviren, beispielsweise der Vacciniavirus (EP 110,385, EP 83,286, US 4,769,330 und US 4,722,848) oder der Geflügelpockenvirus (WO 88/02022), Herpesviren wie HVT (WO 88/07088) oder Marek's Krankheitsvirus, der Adenovirus oder Influenzavirus oder Bakterien wie E. Coli oder spezifische Salmonellen-Arten. Mit rekombinanten Mikroorganismen dieses Typs kann das Polypeptid, welches in dem Hosttier synthetisiert worden ist, als ein Oberflächenantigen ausgelegt werden. In diesem Zusammenhang ist die Fusion des Polypeptids mit OMP-Proteinen oder Pilus-Proteinen von beispielsweise E. Coli oder die synthetische Vorsehung von Signal- und Ankersequenzen, die von den Organismen erkannt werden, denkbar. Es ist auch möglich, dass das Eimeria Polypeptid, falls gewünscht, als Teil eines gesamten Grösseren in dem Tier freigesetzt wird, welches zu immunisieren ist. In allen diesen Fällen ist es auch möglich, dass eines oder mehrere immunogene Produkte die Exprimierung finden wird, die den Schutz gegen verschiedene Pathogene und/oder gegen verschiedene Antigene eines bestimmten Pathogens erzeugen wird.

[0058] Ein Vektorimpfstoff gemäss der Erfindung kann durch Kultivieren eines rekombinanten Bakteriums oder einer Hostzelle, die mit einem rekombinanten Vektor infiziert ist, welche eine Nukleinsäuresequenz gemäss der Erfindung umfasst, hergestellt werden, wonach das rekombinante Bakterium oder der Vektor, der Zellen und/oder rekombinante Vektorviren enthält, die in den Zellen gewachsen sind, gesammelt werden können, optional in reiner Form, und in einem Impfstoff ausgebildet werden kann, optional in lyophilisierter Form.

[0059] Hostzellen, die mit einem rekombinanten Vektor gemäss der Erfindung transformiert worden sind, können auch unter Bedingungen kultiviert werden, die für die Exprimierung eines Polypeptids vorteilhaft sind, welches durch die besagte Nukleinsäuresequenz kodiert wird. Impfstoffe können hergestellt werden unter Einsatz von Proben der Rohkultur, Hostzellen-Lysaten oder Hostzellen-Extrakten, obwohl in einem anderen Ausführungsbeispiel gereinigtere Polypeptide gemäss der Erfindung in einen Impfstoff umgewandelt werden, abhängig von dem vorgeschlagenen Zweck. Um die so hergestellten Polypeptide zu reinigen, werden Hostzellen, die mit einem rekombinanten Vektor gemäss der Erfindung transformiert worden sind, in geeignetem Volumen kultiviert und die so hergestellten Polypeptide werden von solchen Zellen isoliert, oder von dem Medium, falls das Protein ausgeschieden wird. Polypeptide, die in das Medium ausgeschieden werden, können isoliert und durch Standardtechniken gereinigt werden, beispielsweise Salzfraktionierung, Zentrifugierung, Ultrafiltrierung, Chromatographie, Gelfiltrierung oder Immunoaffinitätschromatographie, wobei intrazelluläre Polypeptide durch ein erstes Aufsammeln der besagten Zellen isoliert werden können, wonach die Zellen aufgesprengt worden sind, beispielsweise durch Schallbestrahlung oder durch andere mechanisch zerstörende Mittel wie einem Drückfilter (sogenannte French-Press), gefolgt von der Trennung der Polypeptide von den anderen intrazellulären Komponenten und Ausbilden der Polypeptide in einen Impfstoff. Die Zellzerstörung könnte auch durch chemische (beispielsweise EDTA oder Detergentien wie Triton X114) oder enzymatische Mittel wie Lysozym-Aufschluss erreicht werden.

[0060] Antikörper oder Antiserum, welches gegen ein Polypeptid gemäss der vorliegenden Erfindung gerichtet ist, hat eine potenzielle Verwendung in der passiven Immunotherapie, in diagnostischen Immunoassays und bei der Erzeugung von Anti-idiotypischen Antikörpern.

[0061] Die Eimeriaproteine, wie sie oben charakterisiert worden sind, können eingesetzt werden, um Antikörper herzustellen, sowohl polyklonale, monospezifische als auch monoklonale. Falls polyklonale Antikörper gewünscht sind, sind Techniken zur Herstellung und der Verarbeitung von polyklonalen Seren aus dem Stand der Technik bekannt (beispielsweise Mayer und Walter. Herausgeber von Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology, Academic Press, London, 1987). Monospezifische Antikörper für ein Immunogen können in ihrer Affinität von polyspezifischen Antiseren durch eine Modifizierung des Verfahrens von Hall et al. gereinigt werden (Nature, 311, 379–387, 1984). Monospezifische Antikörper, wie hier benutzt, sind als eine einzelne Antikörperart oder eine Vielfach-Antikörperart mit homogenen Bindungscharakteristika für das relevante Antigen definiert. Homogenes Binden, wie hier benutzt, bezieht sich auf die Fähigkeit der Antikörperart, mit einem spezifischen Antigen oder einer Epitope zu binden.

[0062] Monoklonale Antikörper, die gegen die Eimeriaproteine gemäss der vorliegenden Erfindung reaktiv sind, können durch Immunisieren von gezüchteten Mäusen durch Techniken hergestellt werden, die aus dem Stand der Technik bekannt sind (Köhler und Milstein, Nature, 256, 495–497, 1975). Hybridoma-Zellen werden durch Wachstum in Hypoxanthin, Thymidin und Aminopterin in einem geeigneten Zellkulturmedium gewachsen, wie Dulbecco's modifiziertem Eagle's-Medium. Antikörper herstellende Hybridome werden geklont, vorzugsweise durch die Soft-Agar-Technik von MacPherson (Soft Agar Techniques, Tissue Culture Methods and Applications, Kruse und Paterson, Herausgeber Academic Press, 276, 1973). Diskrete Kolonien werden in einzelne Probeaufnahmen von Kulturplatten zur Kultivierung in einem geeigneten Kulturmedium übergeben. Antikörper herstellende Zellen werden durch Screenen mit geeignetem Immunogen identifiziert. Immunogen positive Hybridom-Zellen werden durch Techniken beibehalten, die aus dem Stand der Technik bekannt sind. Spezifische anti-monoklonale Antikörper werden durch Kultivieren der Hybridome in vitro hergestellt oder durch Herstellung von Asciten-Fluid in Mäusen folgend einer Hybridom-Injektion durch Verfahren, die aus dem Stand der Technik bekannt sind.

[0063] Anti-idiotypische Antikörper sind Immunoglobuline, die ein "internes Bild" des Antigens des Pathogens, gegen welches Schutz erwünscht ist, tragen, und können als ein Immunogen in einem Impfstoff eingesetzt werden (Dreesman et al., J. Infect. Disease, 151, 761, 1985). Techniken zum Erhöhen der anti-idiotypischen Antikörper sind im Stand der Technik bekannt (MacNamara et al., Science, 226, 1325, 1984).

[0064] Der Impfstoff gemäss der Erfindung kann in einem konventionellen aktiven Immunisationsschema eingesetzt werden: vereinzelte oder wiederholte Verabreichung in einer Art, die mit der Dosisformulierung kompatibel ist, und in solch einer Menge, dass es prophylaktisch effektiv sein wird, das heisst die Menge des immunisierenden Antigens oder des rekombinanten Mikroorganismus, der fähig ist, das besagte Antigen zu exprimieren, welches die Immunität in Geflügel gegen einen Challange durch virulente Eimeriaparasiten induziert. Die Immunität wird als die Induktion eines signifikanten Niveaus von Schutz in einer Geflügelpopulation nach der Impfung im Vergleich zu einer nicht geimpften Gruppe definiert.

[0065] Neben dem Anwachsen des Schutzes durch einen Impfstoff, der das Polypeptid der Erfindung enthält, wird er auch die Anzahl von Oozysten reduzieren, die durch das infizierte Tier ausgeschieden werden. Normal werden die ausgeschiedenen Oozysten andere Tiere des Geheges infizieren. Eine Abnahme in der Anzahl von Oozysten, die abgegeben worden sind, wird auch eine Abnahme der Anzahl von Tieren folgen, die nachfolgend infiziert werden und somit eine Anzahl der Oozysten vermindern, die abgegeben werden, so dass sich eine geringere infizierende Last ergibt.

[0066] Weiterhin und selbst ohne Wirkung des Parasiten selber, kann ein Impfstoff das Auftreten der Krankheit vermindern. Dies ist insbesondere so, wenn die Symptome der Krankheit durch die Produkte bewirkt werden, die durch solch einen Parasiten ausgeworfen werden. Impfstoffe, die sich direkt gegen solche Produkte richten, verringern die Symptome, ohne den Parasiten selber anzugreifen.

[0067] Für lebende virale Vektorimpfstoffe kann die Dosisrate je Huhn zwischen 10^5 und 10^8 pfu. liegen. Ein typischer Subunit-Impfstoff gemäss der Erfindung umfasst 1 µg bis 1 mg des Proteins gemäss der Erfindung. Solche Impfstoffe können intradermal, subkutan, intramuskulär, intraperitoneal, intravenös, oral oder intranasal abgegeben werden.

[0068] Zusätzlich kann der Impfstoff ein wässriges Medium oder eine wasserenthaltene Suspension umfassen, häufig gemischt mit anderen Inhaltstoffen, um die Aktivität und/oder die Lagerdauer zu erhöhen. Diese Elemente können Salze, pH Buffer, Stabilisierer (wie entrahmte Milch oder Casein Hydrosysat), Emulsifianten oder Adjuvantien sein, um die Immunantwort zu verbessern (das heisst Öle, Muramyl-Dipeptid, Aluminium-Hydroxid, Saponin, Polyanione und amphipatische Substanzen), und Konservierungsmittel.

[0069] Ein Impfstoff, der das Polypeptid gemäss der Erfindung umfasst, kann auch andere immunogene Proteine von E. maxima oder immunogene Proteine von anderen Eimeriaarten enthalten. Solch ein Kombinationsimpfstoff wird die parasitäre Last in einem Geflügelstock vermindern und wird das Schutzniveau gegen Kokzidose erhöhen.

[0070] Es ist klar, dass ein Impfstoff gemäss der vorliegenden Erfindung auch Immunogene enthalten kann, die auf andere Pathogene von Geflügel bezogen sind, oder Nukleinsäuresequenzen enthalten kann, die diese Immunogene kodieren, wie Antigene von Marek's Krankheits-Virus (MDV), den Virus der Newcastle-Krankheit (NDV), den Virus der infiziösen Bronchitis (IBV), das Hühnchenanämieagens (CAA), den Reo-Virus, den aviären Retro-Virus, den Geflügel-Adeno-Virus, den Truthahn-Rhinotracheitus-Virus oder E. Coli, um einen vielfach wirkenden Impfstoff herzustellen.

[0071] Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele klarer erläutert:

Beispiel 1

Handhabung der Parasiten

[0072] Eimeria Acervulina (Houghtonstamm) und Eimeria Tenella (Weybridge-Stamm) Parasiten sind nach der absichtlichen Infektion von Hühnern aufgesammelt worden, die in Abwesenheit von Kokzidose aufgezogen worden sind. E. Acervulina Oozysten sind aus dem Fäkalmaterial der Tage 4 und 5 nach der Infektion (kurz p.i.) isoliert worden. E. Tenella Oozysten sind aus den Ausscheidungen des Tages 7 p.i. aufgesammelt worden.

[0073] Die Oozysten sind mit starker Belüftung bei 30°C für 7 Stunden sporuliert worden, was in teilweise sporulierten Oozysten resultierte. Die Freigabe von Sporozysten und Sporozoiten von 48 Stunden sporulierten Oozysten sind gemäss dem oben beschriebenen Verfahren von A. N. Vermeulen et al. in FEMS Microbiological Letters 110, (1993), 223–230 durchgeführt worden.

[0074] Um E. Acervulina intrazelluläre Stufen zu erhalten, sind Hühner im Alter von 5 Wochen mit 10^8 sporulierten E. Acervulina Oozysten infiziert worden. Intrazelluläre Parasiten sind aus dem Zwölffingerdarm nach 42 Stunden aufgesammelt worden. Dann sind die Hühner 42 Stunden nach der Inokulation ausgeblutet worden und der Zwölffingerdarm ist entfernt worden, zwischen dem Magen und Meckel's Divertikel. Das Gewebe ist gewaschen und in kleine Stücke von ungefähr 1 cm^3 geschnitten worden. Die Stücke sind in Kalzium/Magnesium-freien Hanks BSS mit 10 mg/ml Glukose (CMF-Hanks) suspensiert worden. Epithel-Zellen sind aus der Matrix durch 10 min Inkubation in EDTA (2 mM EDTA in CMF Hanks bei 35 bis 37°C) freigesetzt worden. Supernatanten von vier Inkubationen sind zusammengeführt und 10 Minuten bei 750 g zentrifugiert worden, was die Zellen pelletiert hat. Die intrazellulären Parasiten (weiter genannt "Schizonten", obwohl auch Trophozoiten

vorhanden gewesen sind) sind nachfolgend aus den Hostzellen durch Saponin-Lyse (15 Minuten bei 0,1% Saponin in CMF-Hanks bei Raumtemperatur) und mechanischem Scheren freigesetzt worden.

[0075] Die Schizonten sind pelletiert und getrennt worden aus dem Hostmaterial nach der Zentrifugierung durch 45% Percoll (Pharmacia Fine Chemicals) (20 Minuten, 700 g, 4°C). Trockene Pellets der Schizonten sind bei –70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert worden.

Triton X114-Extraktion

[0076] Triton X114-Extraktionen sind ausgeführt worden, um die hydrophilischen Proteinfraktion der Schizonten zu erhalten. Das Verfahren, das hier eingesetzt worden ist, ist früher durch C. Bordier (1981) Journal of Biological Chemistry, Band 256, Nummer 4 (Februar), Seiten 1604–1607 beschrieben worden.

[0077] 10^8 bis 10^9 E Acervulina Schizonten je ml TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,4) sind für +/–3 × 20 sec. auf Eis mit der Mikrospitze sonifiziert worden (Branson Sonifier, Position 7). PMSF (letztendliche Konzentration 1 mM) und DNase/RNase (Endkonzentration für beide 0,02 mg/ml) sind hinzugefügt worden (DNase/RNase-Stock: 2 mg/ml DNase, 2 mg/ml RNase in 5 mM MgCl2).

[0078] Prä-kondensiertes Triton X114 ist zu dem sonifizierten Schizonten in der Suspension zu einer Endkonzentration von 10 Prozent (V/V) hinzugefügt und gut gemischt worden, um die Proteine aufzulösen. Das nicht extrahierbare Material ist durch Zentrifugierung von 20 Minuten bei 12'000 g bei 4°C pelletiert worden. Die lösliche Fraktion ist über ein Saccharose-Kissen geschichtet worden (6% Saccharose, 0,06 Prozent (V/V) TX114 in TBS), wird bei 40°C für 10 Minuten inkubiert und 10 Minuten bei 400 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die hydrophilische Fraktion ist wieder mit der selben Prozedur extrahiert worden.

[0079] Die hydrophilen Fraktionen sind bei –70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert worden. Die Gesamtproteinkonzentration ist unter Einsatz von einem BCA-Assay (Pierce Chemicals) bestimmt worden.

Prep-Zellen-Fraktionierung

[0080] Hydrophile Proteine sind weiter getrennt worden unter Bezugnahme auf ihre relative molekulare Masse auf SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen im Laemmli-Buffersystem. Bis jetzt haben wir vorbereitende Elektrophorese in den sogenannten Prep-Zellen gemacht.

Materialien:

– Prep-Zellen-Apparat (Biorad Labs) mit Prep-Zellen-Säule (37 mm ID)
– Dialysemembran für Prep-Zelle (mit einem Cut-Off 6 kD)
– Spannungsversorgung (EPS 600 Pharmacia)
– Reduzierender Probenbuffer: 62,5 mM Tris-HCl pH Wert 6,8; 10% Glycerol 2% SDS; 0,01% Bromophenol-Blau (Merck); 0,13 M DTT (Dithiothretol, Merck)
– Elektrophoresebuffer/Elutionsbuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS mit pH Wert 8,6

Verfahren und Ergebnisse:

[0081] Alle Verfahren sind bei 4°C durchgeführt worden. Für die Fraktionierung der hydrophilen Proteine ist ein 4% stapelndes/9% trennendes Gel (Polyacrylamid) in der 37 mm Röhre (bis auf 6 cm gefüllt) der Prep-Zelle gemäss dem Protokoll des Herstellers eingesetzt worden, aber mit einem Zusatz von 0,1% SDS.

[0082] Die hydrophile Phase von TX 114-Extraktionen, die bei –70°C gehalten worden sind, sind zerschnitten worden und die hydrophilen Proteine (ungefähr 8 mg je Lauf) sind in reduzierendem Probenbuffer verdünnnt worden (das Gesamtvolumen war +/–6 ml), bei 100°C für 3 Minuten gekocht worden und dann auf die Oberfläche des 4% stapelnden Gels geladen worden unter Einsatz einer an einer spritze befestigten dünnen Röhre.

[0083] Die Prep-Zelle ist mit der Spannungsversorgung verbunden worden und die Elektrophorese ist mit 40 mA bei 500 V maximal gestartet worden.

[0084] Die Sammlung der Fraktionen (Fraktionsvolumen +/–2,5 bis 3 ml, Fluss 0,6 ml/min) begann nach ungefähr 6 Stunden, wenn der verfolgende Farbstoff aus der Zelle eluiert worden ist. Die Fraktionen sind über Nacht aufgesammelt worden (+/–100 Fraktionen) in 3,5 ml Kunststoffröhrchen (Sarstedt).

[0085] Proben der Fraktionen sind für die Analyse durch SDS-PAGE und Western Blotting genommen worden. Die Fraktionen sind bei –70°C gelagert worden.

[0086] Diese Reinigungsverfahren resultierten in Fraktionen, die fast reine Proteine enthielten, wie es sich aus den unten genannten Analysen ergeben wird.

Aminosäuresequenzierung

[0087] Die ausgewählten Fraktionen des Prep-Zellen-Laufes COC9314612, die ein fast reines Band um Mr = 37k (bezeichnet als EASC2) enthielten, sind gepoolt worden, und durch Azetonausfällung konzentriert und auf einem 12% PAA-Gel gelaufen zu werden. Das Gel ist kurz mit einem nicht denaturierten Coomassie Brilliant Blue Farbprotokoll gefärbt worden: Färben: 20 Minuten bei Raumtemperatur in 0,2% CBB in 20% Methanol/0,5% Essigsäure. Entfärben: 60 Minuten in 30% Methanol.

[0088] Das färbende 37 kD-Band ist ausgeschnitten worden. Die interne Aminosäuresequenzierung ist auf einem ausgewählten HPLC-gereinigten Peptid einer Trypsin-Verarbeitung des EASC2 durchgeführt worden, alles durchgeführt durch Eurosequence BV Groningen, in den Niederlanden.

[0089] Die Aminosäuresequenz des tryptischen Peptids war GWIKQEEVDDIVQK (siehe SEQ. ID. Nr: 2 Aminosäuren 212–225).

[0090] Diese Kodiersequenz für dieses Peptid ist auch nach der DNS-Sequenzierung des Klons festgestellt worden.

Beispiel 2

Herstellung von monospezifischen Antikörpern in Hasen

[0091] Die Vorimpfungs-Seren von SPF-Kaninchen sind auf Western Blotted E. Acervulina Antigen von verschiedenen Entwicklungsstufen und auf einem Blot von E. Coli Proteinen gescreent worden. "Negative" Kaninchen sind für das Aufziehen von Antikörpern ausgewählt worden.

[0092] Fraktionen von Prepcellruns, die EASC2 (37 kD) enthalten haben, sind durch SDS-PAGE ausgewählt, gepoolt und konzentriert worden (+/–3×) mit einer Amiconzelle (YM10-Filter) auf 3,5 ml.

[0093] Das Kaninchen ist zweifach immunisiert worden mit konzentriertem Antigen in GNE (8 × 0,25 ml i.c.; 1 ml i.p.) mit einem Intervall von 4 Wochen. Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung ist das Kaninchen ausgeblutet worden und die Seren sind auf Western Blots für Eimeria Acervulina und Tenella Sporoziten und Schizonten 42 Stunden getestet worden. Die **Fig. 1** zeigt das Ergebnis der Immunodetektion der monospezifischen Antiseren von Sporozoiten Antigenen von beiden Arten. Es ist festgestellt worden, dass die Antikörper ein Parasitenprodukt von ungefähr 37 kD in beiden E. Acervulina (Band A1) und E. Tenella (Band B1) erkannt haben. Kontrollseren desselben Kaninchen vor der Immunisierung erkannten diese Bänder nicht (Bänder A/B2). Das Protein ist auch in den Schizonten-Stufen der zwei Arten enthalten (nicht dargestellt).

Beispiel 3

Impfung von Hühnern von E. Acervulina TX 114 hydrophiler Fraktion und EASC2

[0094] Die TX 114 hydrophile Phase des Schizontenmaterials ist getrennt und intensiv gegen 0,01 M PBS mit pH Wert 7,3 bei 4°C dialysiert worden.

[0095] Ausgewählte Fraktionen, die das EASC2 37 kD Protein enthalten, sind intensiv gegen 3 × 5 Liter 0,01 M PBS bei pH Wert 7,3 bei 4°C dialysiert worden.

[0096] Die Konzentration des Proteins in den Impfstoffpräparationen ist bewertet worden durch das Anfärben von verschiedenen Konstellationen der Probe mit CBB nach SDS-PAGE und Vergleichen der Intensität der Färbung mit einer Referenzprobe des BSA.

[0097] Die Volumina sind korrigiert worden, um ungefähr +/–5 µg Protein/Dosis für das gereinigte Protein und ungefähr 15 µg/Dosis für die gesamte hydrophile Fraktion zu erhalten.

[0098] Diese sind als Aliquot-Volumen gelagert worden, um die Impfung bei –70°C zu primen. Gefrorene Impfstoffpräparationen sind geschnitten worden.

[0099] Zu jeweils 15 ml von Impfstoff sind 3,2 mg Quil A Superfos Biosektor als Adjuvans hinzugefügt worden in einem Volumen von 1 ml 0,01 M PBS bei einem pH Wert 7,3.

[0100] Der Impfstoff ist durch Vortexen gut gemischt worden und in 4 bis 6 Wochen alte kokzidosefreien "White Leghorn"-Hühner in 0,75 ml subkutan gegeben worden.

[0101] Der Impfstoff enthielt 150 µg Quil A/Dosis.

[0102] Die Fig. 2 zeigte eine Coomassie BB gefärbte SDS-PAGE von EASC2 (Band 1) und 42-stündiger TX 114 hydrophiler Fraktion (Band 2), welche in die Hühner als Impfstoff injiziert worden sind.

[0103] Vier Wochen nach dem Primen der Vögel sind diese mit der selben Dosis über den selben Weg geboosted worden. Der Booster-Impfstoff ist frisch aus dem gefrorenen Antigenvorrat hergestellt worden.

[0104] Kontrollhühner sind mit 150 µg Quil A/Dosis in PBS inokuliert worden. Jede Gruppe hat 14 Hühner enthalten.

[0105] Elf Tage nach dem Impfboosten sind alle Hühner oral mit 240 sporulierten Oozysten von Eimeria Acervulina H in 1 ml von 15% Sucrose in Wasser inokuliert worden.

[0106] Die Hühner sind in Käfigen von 2 Vögeln je Käfig angeordnet worden. Der Oozysten-Abgang ist in fäkalen Proben, die in den Tagen 4 bis 8 nach dem Challenge genommen worden sind, geprüft worden.

[0107] Die Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse dieses Experimentes. Der Oozysten-Abgang ist als prozentualer Anteil der Oozysten aus dem Abgang in den Kontrolltieren ausgedrückt worden.

[0108] Statistische Erwägungen der Daten sind auf dem LOG der Anzahl der Oozysten unter Verwendung von Student's T-Test oder Mann-Whitney's Test durchgeführt worden, falls die Datenverteilung nicht normal gewesen ist.

[0109] Wenn $p < 0,05$ gewesen ist, dann ist der Unterschied als signifikant betrachtet worden.

[0110] Die Tabelle zeigt, dass sowohl die TX 114 Fraktion als auch die EASC2-Prep-Zellen-gereinigte Fraktion eine statistisch signifikante Verminderung ($p < 0,05$) am Oozysten-Abgang nach dem Challenge induziert hat.

[0111] Die Prep-Zellen-Reinigung schien den Schutz, der durch den TX 114 Impfstoff induziert worden ist, zu verbessern.

Tabelle 2: Oozysten-Abgang in Prozenten von der Kontrolle und der statistische Differenzwert.

Immunogen	% von Oozysten-Abgang aus der Kontrollgruppe +/- S.D.	p-Wert im Unterschied von der Kontrolle
EASC2 Prep-Zellen rein +/- 5 µg/Dosis	72 +/- 30	p = 0,01
Hydrophile TX 114 Proteine von Schizonten +/- 15 µg/Dosis	84 +/- 17	p = 0,02

[0112] Bei einem anderen Experiment, bei dem nur gesamte Extrakte von 42-stündigen Schizonten als Impfstoff eingesetzt worden sind, hat sich keine signifikante Oozysten-Reduktion in der Induktion ergeben (nicht

dargestellte Ergebnisse).

[0113] Bei einem zweiten Experiment ist Prep-Zellen gereinigtes EASC2 in zwei unterschiedlichen Konzentrationen von 0,2 und 2 µg/Dosis eingesetzt worden. Gemäss demselben Protokoll zur Immunisierung und Challenge ist der Schutz in zehn Hühnern je Gruppe als Reduktion des Oozysten-Abgangs im Vergleich zu der mit PBS/QuilA inokulierten Gruppe verglichen worden.

[0114] Die Tabelle 3 summarisiert die durchschnittliche prozentuale Oozysten-Abgabe der Kontrolle für zwei EASC2-geimpfte Gruppen. Diese Tabelle zeigt, dass die EASC2 geschützten in einer dosenabhängigen Art und Weise eine statistisch signifikante Unterscheidung bei zwei 2 µg/Dosis ergeben hat.

Tabelle 3: Oozysten-Abgabe in Prozent von der Kontrolle und der statistische Differenzwert.

Gruppe	% Oozysten +/- S.D. (Kontrollabgabe = 100%	Signifikanz des Unterschiedes aus der Kontrolle (p-Wert)
EASC2/QuilA 2 µg/Dosis	64,0 +/- 22	0,008
EASC2/QuilA 0,2 µg/Dosis	90,2 +/- 27	nicht signifikant

Beispiel 4

Immunologische Stimulierung nach der Impfung mit EASC2 oder TX 114 hydrophilen Proteinen

[0115] In beiden Schutzexperimenten, die oben erwähnt worden sind, sind Hühner für die Stimulierung von immunologischen Parametern wie T-Lymphozyten Proliferation und Serum-Antikörpern geassayed worden.

Serum-Antikörper

[0116] Antikörper, die Impfstoffkonstituenten erkennen, sind nur in Seren festgestellt worden, die aus den Gruppen stammen, die mit 42-stündiger TX 114-hydrophiler Fraktion geimpft worden sind, und nicht aus den Gruppen, die mit dem gereinigten EASC2 geimpft worden sind.

Lymphozyten Proliferation

[0117] Die Lymphozyten Proliferation nach der antigenen Stimulierung ist in einem Lymphozyten Stimulationstest (LST) getestet worden.

Verfahren:

[0118] Vor dem Challenge sind peripherale Blutzellen von allen Hühnern in jeder Gruppe genommen worden.

[0119] Peripherale Blutleukozyten (PBL) sind durch Zentrifugierung von 3 ml des Gesamtblutes für 7 Minuten bei 64 g bei Raumtemperatur isoliert worden. Der Leukozytenfilm ist in RPMI 1640 („Dutch Modification") gesammelt und zwei mal gewaschen worden. Die Zellkonzentration ist auf 1×10^7 Zellen je ml in RPMI 1640 eingestellt worden. Das RPMI 1640 („Dutch Modification"), welches eingesetzt worden ist, ist mit Natriumpyruvat (1 mM), Glutamin (2 mM), Penicillin 200 U/ml und Streptomyzin 200 µg/ml ergänzt worden.

[0120] 96 Proben aufnehmende Rundbodengewebekulturplatten sind mit 0,05 ml Zellsuspension und 3,0% Hühnerserum (Gibco BRL), 0,05 ml "stimulierendes Antigen"-Suspension und 0,05 ml RPMI 1640 gesät worden, kultiviert für 64 Stunden bei 41°C unter 5% CO_2-Atmosphäre. Nachfolgend sind 18,5 kBq 3-H-Thymidin (Amersham Beckenham U. K.) je Probenfläche hinzugefügt worden und 8 Stunden später sind die Zellen geerntet worden auf einem Glasfaserfilter (Skatron Norway Bluemat) unter Einsatz eines 96 Probenzellen Harvesters (Skatron Norway). Die Filter sind mit Scintillationsflüssigkeit saturiert worden (LKB BetaScint) und in

einer Betaplatte 1205 (Pharmacia/LKB Schweden) gezählt worden.

[0121] Als "stimulierendes Antigen" sind E. Acervulina Schizonten eingesetzt worden, die unter Einsatz eines mit Mikrospitze ausgerüsteten Branson Sonifiers an der Position 6 für 3 × 20 Sekunden mit zwischenliegender Kühlung sonifiziert worden und bei –70°C gelagert. Die Antigene sind vor dem Einsatz geschnitten und verdünnt worden, um die für die Stimulierung eingesetzte Konzentration zu treffen. PBL von allen Gruppen sind mit $3{,}10^5$ E. Acervulina Schizonten stimuliert worden.

[0122] Die statistische Evaluation ist unter Einsatz von Student's T-Test auf dem LOG des Stimulationsindexes (ST) durchgeführt worden (die Anzahl der gezählten Elemente je Minute (cpm) der stimulierten Kulturen geteilt durch die cpm der nicht stimulierten Kontrolle). Wenn $p < 0{,}05$ gewesen ist, dann wurde der Unterschied als signifikant angesehen.

Ergebnisse:

[0123] Tabelle 4 zeigt den mittleren Stimulationsindex für die Gruppen aus beiden oben beschriebenen Experimenten. Das erste Experiment, bei dem der EASC2-Impfstoff mit der TX 114-hydrophilen Fraktion verglichen worden ist, und das zweite Experiment, bei dem die zwei Dosierungen des EASC2-Impfstoffs behandelt worden sind.

[0124] Es ist festgestellt worden, dass alle Antigene oder Dosierungen eine signifikante positive T-Zellen Antwort induziert haben, die in dem peripheralen Blut zur Zeit des Challenge erfassbar war.

[0125] In beiden Experimenten induzierte jedoch die höhere Dosis an Prep-Zellen reinem EASC2-Impfstoff (2 oder 5 µg/Dosis) die höchste Stimulierung von T-Zellen. Das Ranking der T-Zellenstimulation korrelierte mit der Verminderung des Oozysten-Abgangs nach dem Challenge.

Tabelle 4: Mittlere Einnahme von ^{3}H-Thymidin nach der Stimulierung mit E. Acervulina Schizonten durch PBL von mit verschiedenen Impfstoffen immunisierten Gruppen, exprimiert als Stimulationsindex (S. I.) +/– Standardfehler (SE).

Experiment	Gruppe	^{3}H-Thymidin Inkorporation in S.I. +/- SE
I	EASC2 5 µg	120 +/- 47 @
	TX 114 hydrophile Proteine	31 +/- 12 @
	Placebo	6 +/- 1
II	EASC2 2 µg	112 +/- 28 @
	EASC2 0,2 µg	24 +/- 4 @
	Placebo	2,3 +/- 0,3

@) Signifikant von der Kontrollgruppe $p < 0{,}001$

Beispiel 5

Klonierexperimente

Sporulierung von E. Acervulina Oozysten

[0126] Eine Suspension von 5×10^8 E. Acervulina Oozysten in 60 ml 10^{-4} M Natrium Dithionit ist zentrifugiert worden, wonach das Pellet einmal mit 100 ml sterilem Wasser gewaschen worden ist. Die Zellen sind wiederum in 500 ml 2% Kaliumbichromatlösung resuspendiert worden und dann unter Einfluss von starker Belüftung für 7 Stunden bei 30°C inkubiert worden. Die Oozysten sind durch Zentrifugieren gesammelt und drei mal mit 200 ml sterilem Wasser gewaschen worden.

Isolation der RNS

[0127] Für die Isolation der RNS (Pasternak J. et al., Mol. & Bioch. Par. 3, 133–142, 1981) ist das Zellkügelchen in 2,8 ml Buffer mit 10 mM Trisazetat (pH Wert 7,6), 75 mM Natriumazetat, 1% SDS, 2 mM EDTA, 0,2 mg/ml Proteinase K und 10 mM Vanadyl-Ribonukleosid-Komplexe gegeben worden. Die Oozysten sind durch Vortexen für 60 Sekunden (maximal) in Gegenwart von 13 g Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) zerstört worden. 5 mm Phenol ist zum gesamten Extrakt hinzugefügt worden und die Mischung ist für weitere 60 Sekunden gevortext worden. Nach dem Zentrifugieren ist die Supernatantflüssigkeit abpipettiert und wiederum extrahiert worden mit einem gleichen Volumen von Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol (25:24:1). RNS ist ausgefällt worden nach Zufügen von 2,5 Volumen Ethanol und das resultierende Ausfallprodukt ist in 800 ml Tris 10 mM, EDTA 0, 1 mM, pH Wert 7, 6 ($T_{10}E_{0,1}$) aufgelöst worden, wonach das Produkt noch zwei mal extrahiert worden ist mit einem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol (25:24:1) und zwei mal mit Chloroform/Isoamyl Alkohol (24:1) und dann mit Ethanol ausgefällt worden. PolyA$^+$-RNS ist isoliert worden durch das Mittel einer Oligo(dT)-Zellulose-Chromatographie (Maniatis T. et al.: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Ungefähr 100 µg PolyA$^+$-RNS ist aus 5×10^8 Oozysten isoliert worden.

cDNS-Synthese

[0128] PolyA$^+$-RNS ist in cDNS gewandelt worden durch das Mittel einer Enzym-MMLV reversen Transkriptase. Zu diesem Zweck sind 25 µg PolyA$^+$-RNS in 90 ml Wasser aufgelöst und für 5 Minuten bei 20°C denaturiert worden durch Hinzufügen von Quecksilber Methyl Hydroxid zu 10 mM, wonach β-Mercaptoethanol zu 45 mM hinzugefügt worden und die Mischung für weitere 3 Minuten bei 20°C inkubiert worden ist. Die Enzymreaktion ist in 190 ml Buffer ausgeführt worden, welcher 4 mg Oligo(dT)15, 150 U RNasin (R), 20 mM Tris (pH Wert 7,6), 30 mM KCl, 4 mM Dithiothreitol (DTT), 2 mM $MgCl_2$, 1 mM von jeweils dNTP und 3000 U MMLV reverser Transkriptase enthalten hat.

[0129] Die Reaktion ist nach einer Stunde Inkubation bei 37°C unter Hinzufügung von 10 ml 0,5 M EDTA beendet worden. Nach Extration mit einem gleichen Volumen von Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol (25:24:1) ist das RNS/DNS-Hybrid durch Ammonium Azetat zu 2 M und 2,5 Volumen Ethanol ausgefällt worden. Die kombinierte Aktion der Enzyme DNS-Polymerase I und RNase H (Gubbler U. et al., Gene 25, Seiten 263–269, 1983) resultierte in der Synthese des zweiten Stranges. Das Pellet ist in 960 µl Buffer aufgelöst worden, welcher 20 mM Tris (pH Wert 7,6), 5 mM $MgCl_2$, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,6 mM β-NAD, 16 U RNase H, 200 U DNS-Polymerase I und 20 U DNS-Ligase (E. Coli). Die Inkubationszeit war eine Stunde bei 12°C und dann eine Stunde bei 22°C, wonach die Reaktion durch Hinzufügen eines gleichen Volumens von Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol (25:24:1) gestoppt worden ist und mit Ethanol ausgefällt wurde.

[0130] Bevor die cDNS in einen Vektor geklont worden ist, der für diesen Zweck geeignet ist, wurde sie zuerst geändert. cDNS (5 µg) ist in 100 µl Buffer aufgelöst worden, der 30 mM Natriumazetat (pH Wert 5,6), 50 mM NaCl, 1 mM $ZnSO_4$ und 21 U Mung Bean Nuklease enthalten hat. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 37°C ist die Reaktion durch Hinzufügen von EDTA auf 10 mM und Tris auf 25 mM gestoppt worden. Nach der Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol (25:24:1) ist die Mischung desalieniert worden über eine Sephadex G50 Säule. Das folgende ist zu dem Eluat (125 µl) hinzugefügt worden: Tris pH Wert 7,6 bis 50 mM, EDTA bis 2,5 mM und 100 U EcoRI-Methylase. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 37°C ist die Reaktion durch Aufheizen für 15 Minuten bei 65°C gestoppt worden, wonach 1/10 des Volumens einer Lösung mit Tris-HCl 100 mM, $MgCl_2$ 100 mM und NaCl 500 mM (pH Wert 7,5) hinzugefügt worden und zur selben Zeit jede dNTP auf 1 mM und 12,5 U Klenow DNS-Polymerase. Die Reaktion ist gestoppt worden durch Hinzufügen eines gleichen Volumens von Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol (25:24:1) nach einer Inkubation von 60 Minuten bei 22°C. Die Supernatantflüssigkeit ist ausgefällt worden nach Hinzufügen von 350 µl H_2O und 50 µl 3 M Natriumazetat (pH Wert 5,6) mit 500 µl Isopropanol. Nach dem Auflösen in 100 ml H_2O ist das Pellet desalieniert worden über eine Sephadex G50 Säule und das Eluat ist mit Ethanol ausgefällt worden. Nach dem Auflösen des Pellets in 24 µl H_2O, ist die Ligation in 50 µl ausgeführt worden durch Hinzufügen von 2 µg EcoRI-Linker, Tris-HCl (ph Wert 8,0) zu 30 mM, $MgCl_2$ zu 10 mM, Dithiothreitol zu 10 mM, ATP zu 1 mM, Gelatin zu 0,1 mg/ml und 10 U T4DNS-Ligase. Die Reaktion ist nach 16 Stunden Inkubationszeit bei 4°C durch Aufheizen (für 15 Minuten bei 70°C) gestoppt worden, wonach das Schneiden mit Restriktions-Endonuklease EcoRI in 210 µl Buffer ausgeführt worden ist, enthaltend 100 mM Tris-HCl (pH Wert 7,6), 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 2,5 mM DTT und 500 U EcoRI. Nach 90 Minuten Inkubationszeit bei 37°C ist die Reaktion gestoppt worden durch die Extraktion mit einem gleichen Volumen von Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol (25:24:1). Die Supernatantflüssigkeit ist mit 2,5 Volumen Ethanol nach Hinzufügen von Natriumazetat (pH Wert 5,6) zu 300 mM cDNS ausgefällt worden und Linker sind durch das Mittel einer Biogel A15M Säule separiert worden. Die cDNS ist mit Ethanol ausgefällt worden, wonach das Ausfällergebnis in Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM (pH Wert 7,6)

aufgelöst worden ist. Die cDNS-Moleküle sind dann in Phage Lambda ZAPII (Stratagene) geklont worden.

[0131] Das Screenen der cDNS-Bank (2×10^5 pfu) mit Antikörpern, die gegen den EASC2-Proteinanteil von E. Acervulina Schizonten gerichtet ist, zeigten sechs positive Phagenklone. Diese Antikörper sind mit 1:2000 mit 1 × Trissalz (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH Wert 8,0) + 0,05% Tween 20 + 10% Foetales Kälberserum (FCS) verdünnt worden und für zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) mit den Filtern inkubiert worden. Die Filter sind dann vier mal gewaschen worden, jeweils 10 Minuten mit 50 ml 1 × Trissalz + 0,05% Tween 20, dabei jeweils jeder Filter. Für die zweite Antikörperinkubation ist ein Konjugat von Zigen-Anti-Kaninchen Antikörper und Alkaline Phosphatase eingesetzt worden (verdünnt zu 1:7500 in Trissalz + 0,05% Tween 20 + 10% FCS) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden, wonach die Filter gewaschen worden sind, wie es nach der ersten Antikörperinkubation beschrieben wurde. Die Farbreaktion ist in Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, (pH Wert 9,6) durchgeführt worden, wobei 0,33 mg/ml Nitrobluetetrazolium und 0,17 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat aufgelöst worden sind. Die Filter sind nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur evaluiert worden. Die immunopositiven Klone sind Plaque gereinigt und aufgenommen worden durch eine in vivo Exzision, gemäss dem Protokoll des Herstellers (Stratagene). Die Plasmid DNS ist von den sich ergebenden in vivo exzisierten Klonen für Sequenzzwecke gemäss den Standartprotokollen (Maniatis T., et al. wie oben erwähnt) isoliert worden. Partielle Sequenzinformationen zeigt, dass alle Klone homolog sind, vom grössten Klon ist die Nukleotidsequenz vollständig bestimmt worden. Dieser Klon, der als pBLUE EASC2 bezeichnet worden ist, enthielt einen Einsatz von 1566 bp.

Legende zu den Figuren

[0132] Fig. 1 Western Blot von E. Acervulina (A) und E. Tenella (B) Sporozoiten-Proteine, die mit Antiserum getestet worden sind, gegen Prep-Zelle gereinigtes EASC2-Protein (Band 1) oder Pre-immunes Kontrollserum (Band 2). Marker weisen auf die molekulare Gewichtskalibration in kD hin.

[0133] Fig. 2 Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-PAGE von Prep-Zelle gereinigtem EASC2-Protein (Band 1) oder TX 114 hydrophile Fraktion von E. Acervulina 42 stündigen Schizonten (Band 2). Band M enthält molekulare Gewichtskalibrationsmarkierungen in kD.

Sequenzliste

(1) Allgemeine Information

(i) Anmelder

(A) Name: Akzo Nobel N.V.

(B) Strasse: Velperweg 76

(C) Stadt: Arnhem

(E) Land: Holland

(F) Postleitzahl (PLZ): 6824 BM

(G) Telefon: 04120-66204

(H) Telefax: 04120-50592

(I) Telex: 37503 akpha nl

(ii) Titel der Erfindung: T-Zellen stimulierendes Protein von Eimeria

(iii) Anzahl der Sequenzen: 2

(iv) Computer lesbare Form:

(A) Medium: Diskette

(B) Computer: IBM-kompatibler Rechner

(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) Information für Sequenz ID Nr.: 1:

(i) Sequenzcharakteristika

(A) Länge: 1679 Basispaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strängigkeit: doppelt

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: cDNS zu mRNS

(iii) Hypothetisch: Nein

(iv) Anti-Sinn: Nein

(vi) Originalquelle:

(A) Organismus: Eimeria Acervulina

(D) Entwicklungsstufe: Schizont

(vii) Unmittelbare Quelle:
(B) Klon: EASC2_1

(ix) Merkmal:
(A) Name/Schlüssel: CDS
(B) Ort: 280...1269
(D) Andere Informationen: /function= "Eimeria lactate dehydrogenase"

(ix) Merkmal:
(A) Name/Schlüssel: misc_feature
(B) Ort: 1...51
(D) Andere Informationen: /label= pBluescriptII

(ix) Merkmal:
(A) Name/Schlüssel: misc_feature
(B) Ort: 1624...1679
(D) Andere Informationen: /label= pBluescriptII

(ix) Merkmal:
(A) Name/Schlüssel: misc_feature
(B) Ort: 45..54
(D) Andere Informationen: /label= EcoRi-Linker

(ix) Merkmal:
(A) Name/Schlüssel: misc_feature
(B) Ort: 1621..1630
(D) Andere Informationen: /label= EcoRi-Linker

(xi) Sequenzbeschreibung: Sequenz ID Nr.: 1:

```
GCGGTGGCGG CCGCTCTAGA ACTAGTGGAT CCCCCGGGCT GCAGGAATTC GGGTTTTTTT      60

TTTTTTTTCT ACACATTAAT ATTCTTCGTT TACGTTTATT TTGCTACAAA TAAACCCCTT     120

AAACTCTCTA TTTCCTCATA TTCTACCGCT TCATCGGTGG GTGTGTAAGA CGTACGTACG     180

TACAGCTGGG GCTGGCTTAC TGCGCACCGC TTATTTATTA CTTAATTCAT ACACATTTTA     240

TATCTTTCTT CTTCTTTTTT CTTGCTCTTT CTTGTGAAA ATG GCG GTC TTC GAG        294
                                          Met Ala Val Phe Glu
                                           1               5

AAG AAT ACA CGC CCC AAG ATT GCT ATG GTG GGC TCC GGT ATG ATT GGA       342
Lys Asn Thr Arg Pro Lys Ile Ala Met Val Gly Ser Gly Met Ile Gly
                 10                  15                  20

GGC ACC ATG GCT TTC CTG TGC AGC TTG AGG GAA CTC GGA GAT GTT GTC       390
Gly Thr Met Ala Phe Leu Cys Ser Leu Arg Glu Leu Gly Asp Val Val
             25                  30                  35

CTC TTC GAC GTT GTA CCG AAC ATG CCG ATG GGG AAG GCG ATG GAT ATA       438
Leu Phe Asp Val Val Pro Asn Met Pro Met Gly Lys Ala Met Asp Ile
         40                  45                  50

TCG CAC AAT TCG TCG GTG GTT GAC ACG GGT ATA ACA GTA TAC GGC TCA       486
Ser His Asn Ser Ser Val Val Asp Thr Gly Ile Thr Val Tyr Gly Ser
     55                  60                  65

AAT TCA TAC GAG TGC TTG AAG GGT GCG GAC GTA GTA ATA ATA ACA GCA       534
Asn Ser Tyr Glu Cys Leu Lys Gly Ala Asp Val Val Ile Ile Thr Ala
 70                  75                  80                  85

GGG ATA ACA AAG ATA CCC GGA AAG AGC GAT AAA GAA TGG TCT AGA ATG       582
Gly Ile Thr Lys Ile Pro Gly Lys Ser Asp Lys Glu Trp Ser Arg Met
                 90                  95                  100
```

```
GAT CTA TTA CCT GTG AAT ATA AAG ATA ATG AGG GAG GTC GGT GCA GCA       630
Asp Leu Leu Pro Val Asn Ile Lys Ile Met Arg Glu Val Gly Ala Ala
            105                 110                 115

ATT AAA TCT TAC TGT CCT AAT GCA TTT GTT ATT AAT ATA ACA AAT CCT       678
Ile Lys Ser Tyr Cys Pro Asn Ala Phe Val Ile Asn Ile Thr Asn Pro
        120                 125                 130

TTA GAT GTG ATG GTA GCT GCT CTT CAA GAG TCA TCA GGA CTA CCT CAT       726
Leu Asp Val Met Val Ala Ala Leu Gln Glu Ser Ser Gly Leu Pro His
    135                 140                 145

CAT AGA ATC TGC GGT ATG GCT GGG ATG CTT GAT AGC TCT CGT TTT AGA       774
His Arg Ile Cys Gly Met Ala Gly Met Leu Asp Ser Ser Arg Phe Arg
150                 155                 160                 165

CGT ATG ATA GCT GAT AAA TTA GAA GTC TCT CCT AGA GAT GTA CAG GGG       822
Arg Met Ile Ala Asp Lys Leu Glu Val Ser Pro Arg Asp Val Gln Gly
                170                 175                 180

ATG GTC ATA GGT GTA CAC GGC GAT CAT ATG GTG CCC CTA AGT AGA TAT       870
Met Val Ile Gly Val His Gly Asp His Met Val Pro Leu Ser Arg Tyr
            185                 190                 195

GCA ACA GTT AAC GGC ATC CCG CTT TCT GAG TTT GTT AAG AAG GGC TGG       918
Ala Thr Val Asn Gly Ile Pro Leu Ser Glu Phe Val Lys Lys Gly Trp
        200                 205                 210

ATC AAG CAA GAA GAA GTA GAT GAT ATC GTT CAG AAG ACC AAG GTC GCT       966
Ile Lys Gln Glu Glu Val Asp Asp Ile Val Gln Lys Thr Lys Val Ala
    215                 220                 225

GGA GGA GAG ATC GTA CGC CTA TTA GGA CAA GGC TCT GCT TAC TAT GCT      1014
Gly Gly Glu Ile Val Arg Leu Leu Gly Gln Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala
230                 235                 240                 245
```

```
CCA GGG GCT TCA GCT ATT CAG ATG GCT GAG AGC TAT CTA AAG GAT AGA      1062
Pro Gly Ala Ser Ala Ile Gln Met Ala Glu Ser Tyr Leu Lys Asp Arg
                250                 255                 260

AAG AGA GTG ATG GTT TGC TCT TGC TAC TTG CAA GGA CAA TAT GGT GTA      1110
Lys Arg Val Met Val Cys Ser Cys Tyr Leu Gln Gly Gln Tyr Gly Val
            265                 270                 275

CAG AAT CAC TAC TTA GGA GTA CCT TGT GTT ATC GGT GGG AGA GGT GTT      1158
Gln Asn His Tyr Leu Gly Val Pro Cys Val Ile Gly Gly Arg Gly Val
        280                 285                 290

GAG AAG ATT ATT GAG TTA GAA TTG ACC GCA CAA GAA AGA CAG GAG CTT      1206
Glu Lys Ile Ile Glu Leu Glu Leu Thr Ala Gln Glu Arg Gln Glu Leu
    295                 300                 305

CAG GGA TCT ATC GAT GAG GTT AAG GAG ATG CAG AAG GCT ATT GCT GCT      1254
Gln Gly Ser Ile Asp Glu Val Lys Glu Met Gln Lys Ala Ile Ala Ala
310                 315                 320                 325

CTT GAT GCA TCC AAG TAAGCAGCAG CAAAATCGCA GAAGTTGCAG CGCTAGAACA      1309
Leu Asp Ala Ser Lys
                330

ACCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCCTATAG TTCTTGCTGC TGCTGTTCCT ACTACAGCTG    1369

CGGCTTTCTT CCTCGTGTTA TTATCATGAT AGTAAGCTGC TGTACCAGCA GCAGCAGCAG    1429

CAGCAGATTT TGCTTGCACC GCCGTTTGTT TTGCGTACAC CGGCAGAAAT ATTGACTTGC    1489

AGTTAGGAGA AAGAAAGAAA ACAAACACGA TCCCATCGAT CCCAATAAAC CCCACACTGT    1549

CGATCCCATC GATCCCAGCA ACTCCACGGG GCTCTTAACT GTTAAACCTA TTATTCTTAT    1609

CATTACTGTC TCCCGAATTC GATATCAAGC TTATCGATAC CGTCGACCTC GAGGGGGGGC    1669

CCGGTACCCA                                                           1679
```

(2) Information für die Sequenz ID Nr.: 2:

(i) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 330 Aminosäure

(B) Typ: Aminosäure

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: Sequenz ID Nr.: 2:

Met	Ala	Val	Phe	Glu	Lys	Asn	Thr	Arg	Pro	Lys	Ile	Ala	Met	Val	Gly
1				5					10						15
Ser	Gly	Met	Ile	Gly	Gly	Thr	Met	Ala	Phe	Leu	Cys	Ser	Leu	Arg	Glu
			20					25					30		
Leu	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Phe	Asp	Val	Val	Pro	Asn	Met	Pro	Met	Gly
		35					40					45			
Lys	Ala	Met	Asp	Ile	Ser	His	Asn	Ser	Ser	Val	Val	Asp	Thr	Gly	Ile
	50					55					60				
Thr	Val	Tyr	Gly	Ser	Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Leu	Lys	Gly	Ala	Asp	Val
65					70					75					80
Val	Ile	Ile	Thr	Ala	Gly	Ile	Thr	Lys	Ile	Pro	Gly	Lys	Ser	Asp	Lys
				85					90					95	
Glu	Trp	Ser	Arg	Met	Asp	Leu	Leu	Pro	Val	Asn	Ile	Lys	Ile	Met	Arg
			100					105					110		
Glu	Val	Gly	Ala	Ala	Ile	Lys	Ser	Tyr	Cys	Pro	Asn	Ala	Phe	Val	Ile
		115					120					125			

```
Asn Ile Thr Asn Pro Leu Asp Val Met Val Ala Ala Leu Gln Glu Ser
    130                 135                 140

Ser Gly Leu Pro His His Arg Ile Cys Gly Met Ala Gly Met Leu Asp
145                 150                 155                 160

Ser Ser Arg Phe Arg Arg Met Ile Ala Asp Lys Leu Glu Val Ser Pro
                165                 170                 175

Arg Asp Val Gln Gly Met Val Ile Gly Val His Gly Asp His Met Val
            180                 185                 190

Pro Leu Ser Arg Tyr Ala Thr Val Asn Gly Ile Pro Leu Ser Glu Phe
        195                 200                 205

Val Lys Lys Gly Trp Ile Lys Gln Glu Glu Val Asp Asp Ile Val Gln
    210                 215                 220

Lys Thr Lys Val Ala Gly Gly Glu Ile Val Arg Leu Leu Gly Gln Gly
225                 230                 235                 240

Ser Ala Tyr Tyr Ala Pro Gly Ala Ser Ala Ile Gln Met Ala Glu Ser
                245                 250                 255

Tyr Leu Lys Asp Arg Lys Arg Val Met Val Cys Ser Cys Tyr Leu Gln
            260                 265                 270

Gly Gln Tyr Gly Val Gln Asn His Tyr Leu Gly Val Pro Cys Val Ile
        275                 280                 285

Gly Gly Arg Gly Val Glu Lys Ile Ile Glu Leu Glu Leu Thr Ala Gln
    290                 295                 300

Glu Arg Gln Glu Leu Gln Gly Ser Ile Asp Glu Val Lys Glu Met Gln
305                 310                 315                 320

Lys Ala Ile Ala Ala Leu Asp Ala Ser Lys
                325                 330
```

Patentansprüche

1. Eimeria Laktat-Dehydrogenase (LDH) mit der in SEQ ID Nr.: 2 dargestellten Aminosäuresequenz oder eine natürliche Variante der besagten Eimeria LDH.

2. Protein nach Anspruch 1, bei dem die Eimeria Art Eimeria acervulina ist.

3. Nukleinsäuresequenz, die ein Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 2 kodiert.

4. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz die in SEQ ID Nr.: 1 dargestellte Aminosäuresequenz umfasst.

5. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 3 oder 4, wirkverbunden mit einer Exprimierungssteuersequenz, die die Exprimierung der besagten Nukleinsäuresequenz ermöglicht.

6. Rekombinanter Vektor mit einer Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 3 oder 4.

7. Rekombinanter Vektor nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz mit einer Exprimierungssteuersequenz wirkverbunden ist.

8. Hostzelle oder nicht menschlicher Organismus, transformiert mit einer Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 3 oder 4, oder ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 5, oder ein rekombinanter Vektor nach einem der Ansprüche 6 oder 7.

9. Verfahren zur Exprimierung des Proteins nach einem der Ansprüche 1 oder 2 mit dem Kultivieren einer Hostzelle nach Anspruch 8.

10. Impfstoff zur Herstellung eines Schutzes gegen Geflügelkokzidose, dadurch gekennzeichnet, dass er ein Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 2, ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 5, einen rekombinanter Vektor nach einem der Ansprüche 6 oder 7, oder eine Hostzelle oder Organismus nach Anspruch 8 umfasst, zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

11. Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes gegen Geflügelkokzidose, mit den Schritten, dass eine Hostzelle oder nicht menschlicher Organismus, der mit einem rekombinanten Vektor nach einem der Ansprüche 6 oder 7 infiziert ist, kultiviert wird, dass der rekombinante Vektor gesammelt wird und dass der rekombinante Vektor in eine pharmazeutische Zubereitung mit immunisierender Aktivität formuliert wird.

12. Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes gegen Geflügelkokzidose, mit den Schritten des Formulierens eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 oder 2 oder eines Proteins, welches nach dem Verfahren des Anspruchs 9 hergestellt wird, in eine pharmazeutische Zubereitung mit immunisierender Aktivität.

13. Antikörper oder Antiserum, welches spezifisch immunoreaktiv ist mit einem Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 2.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

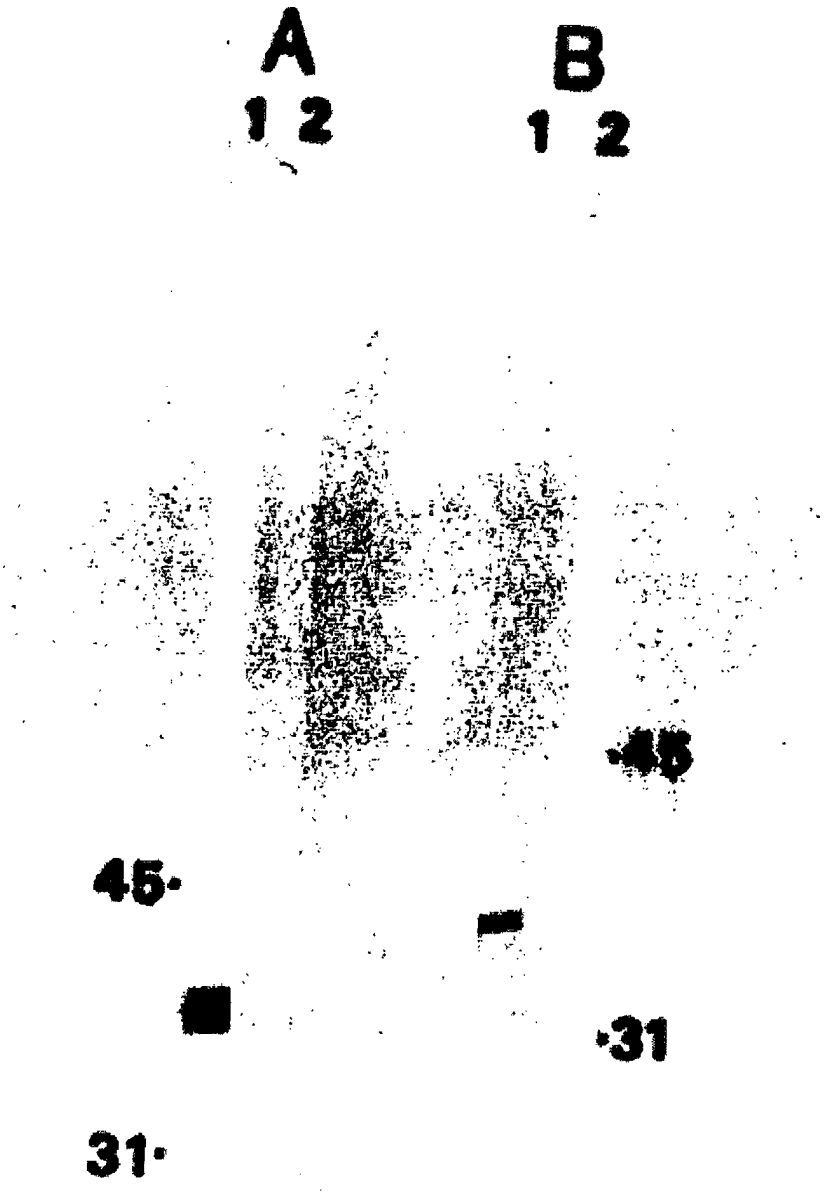

FIG. 1

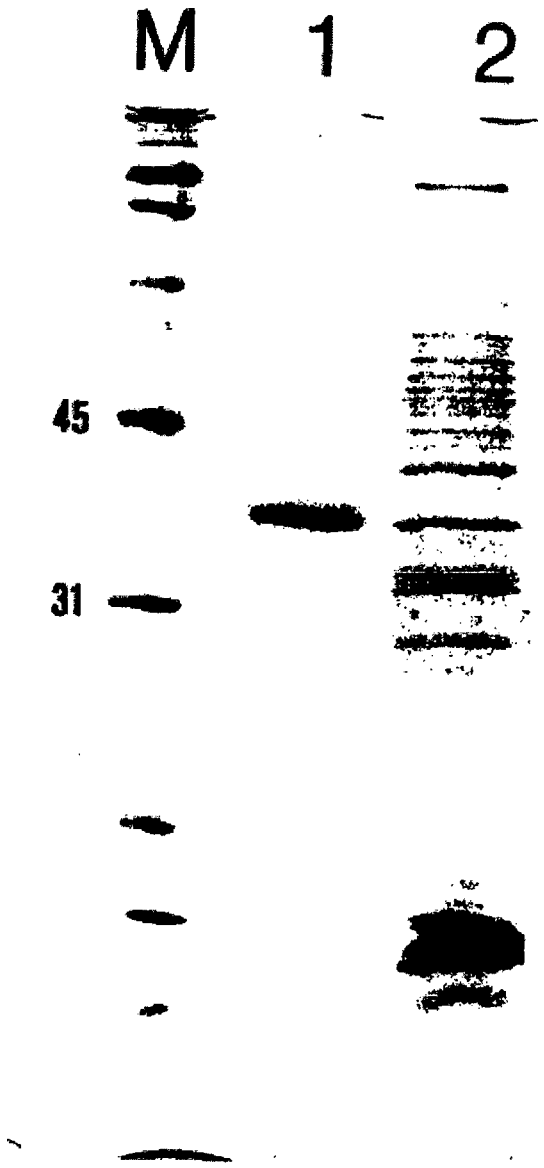

FIG. 2