

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 505087

(P2003 - 505087A)

(43)公表日 平成15年2月12日(2003.2.12)

| (51) Int.Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マコード* (参考) |
|--------------------------|------|---------------|----------------|
| C 1 2 N 15/09 | ZNA | A 6 1 K 39/02 | 2 G 0 4 5 |
| A 6 1 K 38/00 | | 39/39 | 4 B 0 2 4 |
| 38/21 | | 48/00 | 4 B 0 6 4 |
| 39/02 | | A 6 1 P 31/04 | 4 C 0 8 4 |
| 39/39 | | 37/04 | 4 C 0 8 5 |

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 62数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 512891(P2001 - 512891)

(86)(22)出願日 平成12年7月20日(2000.7.20)

(85)翻訳文提出日 平成14年1月18日(2002.1.18)

(86)国際出願番号 PCT/US00/19763

(87)国際公開番号 W001/007625

(87)国際公開日 平成13年2月1日(2001.2.1)

(31)優先権主張番号 09/358,322

(32)優先日 平成11年7月21日(1999.7.21)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 コーネル リサーチ ファンデーション
インコーポレーテッド
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 14850
イサカ スイート 105 ソーンウッドド
ライブ 20

(72)発明者 ユン - フ チャン
米国 ニューヨーク 14850 イサカ クリ
ストファー・レーン204

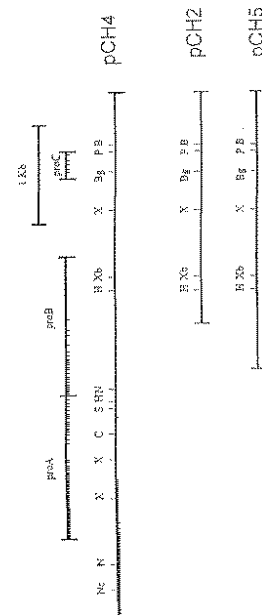
(74)代理人 弁理士 清原 義博

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エーリキア・キャニス (*Ehrlichia canis*) の遺伝子及びワクチン

(57)【要約】

この発明は、*E. canis*ゲノム由来の5,300ヌクレオチドの配列を提供する。ProA、ProB、O RFおよびシトクロムオキシダーゼ同族体の4つのタンパク質と、同じくカルボキシ末端での部分的なりポタンパク質シグナルペプチダーゼ同族体が、このクローンを作られた断片の中でコード化された。これらのタンパク質の抗原性は、ワクチンを作成するためにそれらが使用されることを可能にする。この発明の実施例は、DNAワクチン、組換えワクチンおよびT細胞エピトープワクチンの作成を含む。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の群から選択されたDNAを含む組換えDNA。

- a) 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA
- b) 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA
- c) 配列番号7で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA
- d) 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA
- e) 配列番号11で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA、および
- f) *E. canis*に対する免疫反応を誘発するタンパク質をコード化する、上述のDNAの任意の部分

【請求項2】 前記DNAが少なくとも1つの免疫原性エピトープをコード化することを特徴とする請求項1に記載の組換えDNA。

【請求項3】 以下の群から選択されたタンパク質を含む組換えタンパク質。

- a) 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- b) 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- c) 配列番号7で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- d) 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- e) 配列番号11で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質、及び
- f) *E. canis*に対する免疫反応を誘発する上述のタンパク質の任意の部分

【請求項4】 前記タンパク質が少なくとも1つの免疫原性エピトープを含んでいることを特徴とする請求項3に記載の組換えタンパク質。

【請求項5】 *E. canis*の感染症からイヌを保護するワクチン。

【請求項6】 以下の構成を含む請求項5に記載のワクチン。

- a) ベクターが適切な宿主内に提供されたとき、組換えタンパク質が発現されるようなベクターに挿入された組換えDNAを発現することができるベクター、及

び

b) 前記DNAが以下の群から選択されることを特徴とする前記ベクターが挿入された組換えDNA

i. 配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

ii. 配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

iii. 配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

iv. 配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

v. 配列番号11で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA、および

vi. E.canisに対する免疫反応を誘発するタンパク質をコード化する前記DNAの任意の部分

【請求項7】 前記DNAがさらにCpGモチーフをコード化するDNAを含むことを特徴とする請求項6に記載のワクチン。

【請求項8】 前記DNAがさらに以下の群から選択されたプロモーターを含むことを特徴とする請求項6に記載のワクチン。

a) サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター

b) ヒト組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)、及び

c) ヒト伸長因子(EF-1)のプロモーター/エンハンサー領域

【請求項9】 前記ベクターが以下の群から選択されることを特徴とする請求項6に記載のワクチン。

a) pcDNA3

b) pC1

c) VR1012、及び

d) VR1020

【請求項10】 前記ワクチンが以下の群から選択された方法によって前記ホス

トに投与されることを特徴とする請求項6に記載のワクチン。

- a) 筋肉注射
- b) 静脈注射、及び
- c) 遺伝子銃による注射

【請求項11】 前記ホストがイヌであることを特徴とする、請求項10に記載のワクチン。

【請求項12】 以下の構成を含む、請求項5に記載のワクチン。

- a) 以下の群から選択される組換えタンパク質
 - i. 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
 - ii. 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
 - iii. 配列番号7で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
 - iv. 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
 - v. 配列番号11で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質、および
 - vi. E.canisに対する免疫反応を誘発する、上記のタンパク質のうちの任意の部分

【請求項13】 前記ワクチンがさらに以下の群から選択されたアジュバンドを含むことを特徴とする請求項12に記載のワクチン。

- a) 水酸化アルミニウム
- b) QuilA、および
- c) Montamide

【請求項14】 前記組換えタンパク質に効果的に関連したサイトカインをさらに含むことを特徴とする請求項12に記載のワクチン。

【請求項15】 前記サイトカインが以下の群から選択されることを特徴とする請求項14に記載のワクチン。

- a) インターロイキン-1 (IL-1)
- b) 顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)
- c) -インターフェロン(-IFN)
- d) IL-1 タンパク質由来のアミノ酸であるVQGEESNDK、および
- e) E.canisに対する改善された免疫原性反応を誘発する、上述のサイトカイン

のうちの任意の部分

【請求項16】 前記ワクチンが以下の群から選択された方法によってホストに投与されることを特徴とする請求項12に記載のワクチン。

- a) 筋肉注射、および
- b) 静脈注射

【請求項17】 前記ホストがイヌであることを特徴とする請求項16に記載のワクチン。

【請求項18】 T細胞エピトープが以下の群から選択されるタンパク質のアミノ酸ペプチド断片を含むことを特徴とする、T細胞エピトープを含有する組換えタンパク質を含む請求項5に記載のワクチン。

- a) 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- b) 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- c) 配列番号7で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- d) 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- e) 配列番号11で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- f) *E. canis*に対する免疫反応を誘発する、上記のタンパク質の任意の部分。

【請求項19】 前記アミノ酸ペプチド断片が9~20のアミノ酸を含むことを特徴とする請求項18に記載のワクチン。

【請求項20】 免疫系の細胞を含む真核細胞へ内部移行することができるタンパク質をコード化する組換えDNAをさらに含む、請求項18に記載のワクチン。

【請求項21】 前記タンパク質が、以下の群から選択されるトキシンを含む真核細胞へ内部移行することができることを特徴とする請求項20に記載のワクチン。

- a) 気管支敗血症菌 (*Bordetella bronchiseptica*) のアデニル酸シクラーゼの組換え体、及び
- b) 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) のエキソトキシンA(PE)組換え体

【請求項22】 前記ワクチンが、以下の群から選択された方法によってホストに投与されることを特徴とする請求項18に記載のワクチン。

- a) 筋肉注射、および

b) 皮下注射

【請求項23】 前記ホストがイヌであることを特徴とする請求項22に記載のワクチン。

【請求項24】 以下の構成からなるE.canisに対するT細胞エピトープを同定する方法。

a) タンパク質が以下の群から選択されることを特徴とする、タンパク質の全長に渡る重複タンパク質断片の合成

i. 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

ii. 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

iii. 配列番号7で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

iv. 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

v. 配列番号11で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

vi. E.canisに対する免疫反応を誘発する上述のタンパク質の任意の部分

b) 前記ペプチド断片が宿主動物内において免疫反応を誘発するかどうかを決定するためのペプチド断片の測定、及び

c) 前記断片が免疫反応を誘発するかどうかをE.canisの前記T細胞エピトープとしての前記ペプチド断片の同定

【請求項25】 前記ペプチド断片が9～20のアミノ酸を含むことを特徴とする請求項24に記載の方法。

【請求項26】 以下の構成からなるE.canisに対するワクチンを生成する方法

。

a) ベクター内に挿入された組換えDNAを発現することができるベクターの選択

b) 前記DNAが以下の群から選択されることを特徴とする、前記ベクターが適切な宿主内に供給された場合に、組換えタンパク質として発現する前記ベクターへの組換えDNAの挿入

i. 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

ii. 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

- iii . 配列番号7で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA
- iv . 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA
- v . 配列番号11で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA
- vi . E.canisに対する免疫反応を誘発するタンパク質をコード化する上述のDNAの任意の部分

【請求項27】 前記DNAがさらにCpGモチーフをコード化するDNAを含むことを特徴とする請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記DNAがさらに以下の群から選択されたプロモーターを含むことを特徴とする請求項26に記載の方法。

- a) サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター
- b) ヒト組織プラスミノゲン活性化因子(t - PA)、及び
- c) ヒト伸長因子 (EF - 1) のプロモーター / エンハンサー領域

【請求項29】 前記ベクターが以下の群から選択されることを特徴とする、請求項26に記載の方法。

- a) pcDNA3
- b) pC1
- c) VR1012、及び
- d) VR1020

【請求項30】 前記ウイルスが前記ホストに以下の群から選択される方法で挿入されることを特徴とする請求項26に記載の方法

- a) 筋肉注射
- b) 静脈注射、及び
- c) 遺伝子銃による注射

【請求項31】 前記ホストがイヌであることを特徴とする請求項30に記載の方法。

【請求項32】 以下の構成からなる、E.canisに対するワクチンの生成方法。

a) ベクター内に挿入された組換えタンパク質を発現することができるベクターの選択

b) DNAが以下の群から選択されることを特徴とする、前記ベクターが細菌株内で形質転換する場合に、組換えタンパク質が発現するような組換えDNAの前記ベクター内への挿入

i. 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

ii. 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

iii. 配列番号7で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

iv. 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

v. 配列番号11で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

vi. *E. canis*に対する免疫反応を誘発するタンパク質をコード化する上記DNAの任意の部分

c) 前記細菌株からの組換えタンパク質の回収

【請求項33】 前記ワクチンが以下の群から選択されるアジュバンドをさらに含むことを特徴とする請求項32に記載の方法。

a) 水酸化アルミニウム

b) QuilA、および

c) Montamide

【請求項34】 前記ワクチンが以下の群から選択されたプロモーターをさらに含むことを特徴とする請求項32に記載の方法。

a) tac

b) T5、および

c) T7

【請求項35】 前記細菌株が、大腸菌 (*E. coli.*) であることを特徴とする請

求項32に記載の方法。

【請求項36】 前記ベクターが以下の群から選択されることを特徴とする請求項32に記載の方法。

- a) pREST
- b) pET
- c) pKK233-3

【請求項37】 前記ワクチンが前記ワクチンに関連した操作性のサイトカインをさらに含むことを特徴とする請求項32に記載の方法。

【請求項38】 前記サイトカインが以下の群から選択されることを特徴とする請求項37に記載の方法。

- a) インターロイキン-1 (IL-1)
- b) 顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)
- c) γ -インターフェロン(γ -IFN)
- d) IL-1タンパク質由来のアミノ酸であるVQGEESNDK、および
- e) E.canisに対する改善された免疫原性反応を誘発する、上述のサイトカインのうちの任意の部分

【請求項39】 前記ワクチンが以下の群から選択される方法で前記宿主に注入されることを特徴とする請求項32に記載の方法。

- a) 筋肉注射
- b) 静脈注射

【請求項40】 前記宿主がイヌであることを特徴とする請求項39に記載の方法。

【請求項41】 以下の構成を含む、T細胞エピトープワクチンの生成方法。

- a) T細胞エピトープが以下の群から選択されたタンパク質のペプチド断片を含むことを特徴とする、T細胞エピトープを含む組換えタンパク質の選択
 - i. 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
 - ii. 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
 - iii. 配列番号7で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
 - iv. 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

v. 配列番号11で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

vi. *E. canis*に対する免疫反応を誘発する上述のタンパク質の任意の部分

b) 前記タンパク質からの前記T細胞エピトープの同定

c) 前記エピトープをタンパク質として発現することができる構築物内への前記T細胞エピトープの取り込み

d) 前記タンパク質の回収

【請求項42】 前記アミノ酸ペプチド断片が9～20のアミノ酸を含むことを特徴とする請求項41に記載の方法

【請求項43】 前記エピトープを発現することができる前記構築物が、免疫系の細胞を含む真核生物の細胞内に内部移行することができるタンパク質をコード化する組換えDNAを含むことを特徴とする請求項41に記載の方法。

【請求項44】 真核生物の細胞内に内部移行することができる前記タンパク質が以下の群から選択されるトキシンを含むことを特徴とする請求項43に記載の方法。

a) 気管支敗血症菌 (*Bordetella bronchiseptica*) のアデニル酸シクラーゼの組換え、および

b) 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) のエキソトキシンA(PE)組換え体

【請求項45】 前記ワクチンが前記ホストに以下の群から選択される方法で注入されることを特徴とする請求項41に記載の方法。

a) 筋肉注射、および

b) 静脈注射

【請求項46】 前記ホストがイヌであることを特徴とする請求項45に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の技術分野)**

この発明は獣医病原体の分野に関する。特に、この発明は、イヌ(犬)の病原体エーリキア・キャニス(*Ehrlichia canis*)の特定の遺伝子の配列、およびワクチンの開発へのこの技術の適用に関する。

【0002】**(発明の背景)**

この発明は、*E. canis*バクテリアからの遺伝子の配列、およびこの有機体に対するワクチンの開発に関する。

エーリキア・キャニス(*Ehrlichia canis*) (以下、*E. canis*と称する)は小さなグラム陰性で、絶対的な細胞内のバクテリアである。このバクテリアは、イヌの単球のエーリキオシス(*ehrlichiosis*) (CME)(主にイヌに影響するダニ媒介の疾病)を引き起こす媒介生物である。*E. canis*の最多のコモン・キャリアは褐色のイヌダニであるクリイロコイタマダニ(*Rhipicephalus sanguineus*)である。その疾病は、1935年にアルジェリアで最初に記述された。それは、1962年にアメリカで続いて認識されたが、今では世界の多くの至る所で知られている。160匹の軍事用のイヌが*E. canis*伝染で死んだ時、イヌの単球の*ehrlichiosis*はベトナム戦争中に多くの関心呼んだ。*E. canis*に対して現在適用可能な予防接種はない。引き続き獣医およびペット所有者の両方にとって重要な健康懸念であるのは生命を脅かす疾病である。イヌの単球の*ehrlichiosis*は伝染性の血液疾病である。

【0003】

細胞の血液要素の縮小は疾病の主要な特性である。*E. canis*は生きており、白血球細胞(白血球)の中で再生する。それは結局全リンパ系に影響し、多数の器官を荒らす。白血球をターゲットにすることで、これらの細胞は急速に次々に死んでいく。これらの死んだ血球は第1に脾臓へ移動し、その結果、それは拡大する。骨髄は、新しく健康な細胞を形成するために白血球および形成物の損失を認識する。それは細胞を時期尚早に生成し、これらの未熟な細胞は適切に機能しない。しばしば、これらの未熟な細胞は、白血病の患者のそれに似ている。したがっ

て、この疾病は白血病として誤診される。イヌの単球のehrlichiosisはイヌを様々な癌にかかりやすくするかもしれない。

【0004】

イヌの単球のehrlichiosisには3つの段階がある。第1の急性期は穏やかなウイルス感染に似ている。急性期中は、全てではないにしてもほとんどの損害は取り返しがつき、動物は回復するであろう。これは処置が最も有効となる段階であり、初期の検知の必要性を強調している。しかしながら、処理なしでは、動物が無症状の第2段階へ、および/または慢性の最終段階に進むであろう。動物が慢性の段階に達した場合、バクテリアの有機体は骨髄内に定着している。この段階の多くのイヌは重い内出血に苦しむか、あるいは突然の発作、心臓発作、腎不全、脾臓の破裂あるいは肝臓不全のような致死の合併症になる。

*E. canis*は、哺乳類から誘導された細胞ライン(DH82)で生体外で培養することができる。主要な単球(骨髄で見つかった白血球)で2週間ごとに細胞培養を補わなければならないので、これらの細胞の継続的な維持は困難である。培養は非常に遅い成長であり、培養媒体は高価である。

【0005】

*E. canis*ゲノム中の遺伝子に関するデータは第1に16SリボソームRNA遺伝子に集中していた。以前の研究は、世界的な大多数の有機体と同様に、ehrlichiaファミリーのメンバーの遍在構成要素であるこの遺伝子の配列を決定した。生体界の至る所でこの遺伝子間の高い配列ホモロジーは、それをワクチン開発のための不十分な候補にする。この致命的な疾病に対するワクチンへの望みをいつか実現することができるならば、このゲノム内において他の遺伝子を見つけることが必要である。

【0006】

16SリボソームRNA遺伝子の配列を決定することは、ヒトehrlichiosisの新しい病因の媒介生物エーリキア・チャフェンシス(*E. chaffeensis*)と*E. canis*に密接な関係がある(98.2%の相同)ことを示す。3つの種の密接な抗原関係を示す、*E. canis*、*E. chaffeensis*および*E. ewingi*(ヒトehrlichiosisの別の原因)に対する抗血清でプローブされる時、*E. canis*のウエスタン・プロットは類似している(Che

n et al., 1994)。

【0007】

間接の蛍光性の抗体テスト(IFA)はイヌの単球のehrlichiosisの検知のために開発されている。IFAは、イヌの血液に侵入する有機体に対する抗体の存在を発見する。不運にも、このテストは必ずしも正確だとは限らない。免疫系が抗体を形成するのが遅れるために、急性期において時々、イヌはテストで陰性反応を示すであろう。慢性の段階に低いタイターがある場合、別の誤りの陰性反応が生じるかもしれない。このテストの更なる欠点は交差反応性である。抗エーリキア・キャンニス・ポリクローナル(anti *E. canis* polyclonal)抗体は、テストの特異性を崩して、*E. chaffeensis*で確かに陽性反応を示す。代替テスト、ジエスマ・スマア(Giesma smear)はイヌの血液中の実際の有機体の所在を突き止めるために使用された。不運にも、適切な染色技術および徹底的なフィルム検査にもかかわらず、有機体をしばしば捜し出すことができない。これらのテストの誤りやすさは、この疾病用のよりよい診断ツールの提供を不可欠にする。

【0008】

ダニが刺したことの検知、伝染の初期の分析、ホスト防御物の抑制、および疾病の執拗な伝染の性質のために、*E. canis*に対する有効なワクチンは、至急イヌのために必要である。

【0009】

(発明の概要)

この発明は、*E. canis*遺伝子用の斬新な配列データを示す。特に、クローンが同定され配列が決定された。ProA、ProB、ORF(未知の機能を備えたオープン・リーディング・フレーム)およびシトクロムオキシダーゼホモログと称される4つのタンパク質が、このクローン内で確認された。さらに、リポタンパク質シグナルペプチダーゼホモログをコード化する部分的な遺伝子が発見された。

【0010】

この発明の実施例は、この配列およびタンパク質情報を備えたワクチンの生成を含んでいる。この発明で示されたタンパク質は非常に抗原性である。したがって、それらは、ワクチンとして非常に有用な可能性を持っている。この斬新な技

術によって利用可能になったワクチンのタイプはDNAワクチン、組換えのワクチンおよびT細胞エピトープ・ワクチンを含んでいる。

【0011】

(最良の実施形態の開示)

*E. canis*は壊滅的なイヌの疾病を引き起こす。現在のところ、この疫病を予防することができるワクチンは存在していない。この発明はこのようなワクチンを開発するために必要とされるツールを提供することにある。より明確には、ProA、ProB、ORFおよびシトクロムオキシダーゼホモログと命名された、*E. canis*のゲノム断片から同定された4つの遺伝子に関する。さらに、リポタンパク質シグナルペプチダーゼホモログをコードする遺伝子断片が発見された。これらタンパク質のうちのいずれかは、ワクチンを開発するためにこの発明の実施例の中で利用することができる。

【0012】

*E. canis*ライブラリーのスクリーニング

*E. canis*ゲノム中の遺伝子を同定するために、ゲノムのDNA発現ライブラリーが構築された。イヌehrlichiosisから分離された*E. canis*菌株は、従来の技術により、DH82系統のイヌ細胞において成長させ、そして、これは参考文献(Dawson et al., 1991; Rikihisa, 1992)に記載されている。細胞は回収されて、従来の技術(Chang et al., 1987; Chang et al., 1989a; Chang et al., 1989b; Chang et al., 1993a; Chang et al., 1993b)に記載されている方法によって、染色体DNAが抽出された。ライブラリーを構築するために、200 µgのDNAは、Sau3Aで部分的に消化された。3~8kbのDNA断片が分離されて、プラスミドであるpHG165(Stewart et al., 1986)に連結させた。このプラスミドは大腸菌(*E. coli*) TB1(Chang et al., 1987)に形質転換された。

【0013】

ライブラリーは*E. canis*に対するポリクローナル抗体でスクリーニングされた。ポリクローナル抗体は、*E. canis*が宿ったマダニに噛まれたイヌから生成された。ポリクローナル抗体は、*E. coli*宿主菌株の溶解産物に前吸収された。ライブラリーは、ユニットを形成する1,000コロニーの濃度でペトリプレート上で培養

された。コロニーはニトロセルロースに転写され、各フィルタは1mlの前吸収されたポリクローナル抗体でプローブされた。陽性のコロニーは、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ免疫グロブリンG(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)を含む第二抗体で同定され、次いでニトロブルーテトラゾリウム(NBT)および5 - 臭素 - 4 - クロロ - 3 - インドリルリン酸塩(BCIP)を含有する基質溶液により発色された。陽性のクローンは、三回再スクリーニングされた。

【0014】

3つのクローンがこのスクリーニング方法で分離された(図1)。最長のゲノム断片(pCH4)は4つの完全な遺伝子および1つの部分的な遺伝子をコード化している。それは、リポタンパク質シグナルペプチダーゼホモログの部分的な配列を含んでいることと同様に、タンパク質ProA、ProB、ORFおよびシトクロムオキシダーゼホモログを完全にコード化している。ProAとProBは単一のオペロンに位置している。制限エンドヌクレアーゼ消化法によるマッピングおよびDNA塩基配列決定法は、従来技術に従って行い、そして、これは、参考文献(Chang et. al., 1987; Chang et. al., 1989a; Chang et. al., 1989b; Chang et. al., 1993a; Chang et. al., 1993b)によって記載されている。簡潔に、DNA配列は、ABI PRISMモデル377 DNAシステムによるDNA自動塩基配列決定法により決定された。完全なヌクレオチド配列はプライマーウォーキングによって両鎖の上で決定された。シーケンシング反応の反応熱のサイクルはTaq DyeDeoxy™ターミネーター・サイクル・シーケンシング・キットを利用した。米国バイオテクノロジー情報センター(NCBI)(Althuch et al., 1990; Gish et al., 1993)のBLASTネットワーク・サービスの使用を通じて、ホモログタンパク質のためにデータベースは検索された。

【0015】

配列情報

*E. canis*の遺伝子が配列決定された。クローン化された断片は5,300のヌクレオチドを含んでおり、4つのタンパク質をコード化する。カルボキシ末端には1つの部分的な遺伝子がさらに存在する。配列番号1は全ヌクレオチド配列である。配列番号2と3は配列番号1の12~533のヌクレオチドの翻訳であり、シトクロムオキ

シダーゼホモロークをコードしている。シトクロムオキシダーゼは毒性面において重要であり、したがってワクチンで使用するための最も有力な候補である。配列番号4及び5は配列番号1の939~2252のヌクレオチドの翻訳であり、ProAをコードする。配列番号6及び7は配列番号1の2,258~3,664のヌクレオチドの翻訳であり、ProBをコードする。予備的な証拠は、ProAとProBがプロテアーゼであることを示している。配列番号8及び9は配列番号1の4,121~4,795のヌクレオチドの翻訳であり、ORF(未知の機能を備えたタンパク質)をコードする。配列番号10及び11は配列番号1の4,884~5,300のヌクレオチドの相補的な配列の翻訳であり、リポタンパク質シグナルペプチダーゼホモロークの部分的な配列をコードする。リポタンパク質シグナルペプチダーゼは膜タンパク質であり、ワクチンの開発にとって生来それほど有望ではないかもしれない。しかしながら、このタンパク質は、まだワクチンの創作で追求する価値を有する。

【0016】

ProA、ProB、ORF、シトクロムオキシダーゼ及びリポタンパク質シグナルペプチダーゼホモロークの過剰発現

*E. canis*抗原はT7プロモータープラスミド内で過剰発現される。T7プロモーターに対する強い親和性を有しているT7RNAポリメラーゼの存在する状態で、pRSETベクターは大腸菌(*E. coli*)中で高いレベルの発現を許す。pRSETベクターへの抗原遺伝子のサブクローニングの後に、サブクローンはF'大腸菌(*E. coli*)JM109系統に形質転換される。最大限のタンパク質発現のために、形質転換株は0.D.600=0.3まで培養され、1時間IPTG(1mM)に露出された後に、細胞当たり5~10のプラーク形成単位(pfu)の感染多重度(MOI)でM13/T7バクテリオファージにより形質移入された。タイムコースの研究は、最大の誘導は、誘導から2時間後に到達することを示している。

【0017】

ペレットは遠心分離によって回収され、細胞は6Mグアニジニウム(pH7.8)の中で再懸濁される。細胞はフレンチプレスによって破裂されて、全溶解産物は、従来の技術によって細胞碎片を分離するために6000rpmで回転され、そして、これは参考文献(Chang et al., 1993c)によって記載されている。固定化金属イオンア

フィニティークロマトグラフィー(IMIAC)は、メーカー(Invitrogen, San Diego, CA)によって述べられている変性する条件の下で、タンパク質の各々を精製するために使用される。タンパク質サンプルはSDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS - PAGE)によって分離され、クーマシーブルーで染色した後に視覚化された。

【0018】

ワクチンの開発

この発明に先立って、*E. canis*に対するワクチンは開発されていない。*E. canis*は、世界中の多くの地域において、イヌ及びイヌの近縁種に固有である。北アメリカのイヌはますます危険な状態である。そして、この発明の適用により、潜在的に毎年何千ものイヌの命を救うことができる。イヌのダニ媒介の疾病に対する細胞性免疫を誘発することができる*E. canis*ワクチンは、極めて必要とされている。

【0019】

DNAワクチン

DNAワクチンは、真核生物のプラスミドベクターに関係する遺伝子のサブクローニングにより構築される。候補ベクターは、pcDNA3、pCI、VR1012およびVR1020を含むが、しかしこれらに制限はされない。この構成がワクチンとして使用される。

【0020】

新しく同定された遺伝子であるProA、ProB、ORF、シトクロムオキシダーゼホモログの各々、あるいは部分的なりポタンパク質シグナルペプチダーゼホモログが、DNAワクチン(reviewed in Robinson, 1997)を作成するために使用されることができる。さらに、これらのタンパク質の免疫学的に活性なあらゆる部位もワクチンに対する潜在的な候補である。発現ベクターで、これらの遺伝子のうちの1つを含んでいるプラスミドが構築される。遺伝子が真核生物のプロモーターによるコントロールの下で表現されるために、遺伝子は正確な配向で挿入されなければならない。可能なプロモーターは、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター、ヒト組織プラスミノゲン活性化(t-PA)遺伝子(characterized in Degen et al., 1986)およびヒト伸長因子 (EF-1)(characterized in Uetsuk

i et al., 1989)のプロモーター/エンハンサー領域を含むが、しかし制限されない。配向は制限エンドヌクレアーゼによる消化およびDNA配列によって識別される。

【0021】

これらの遺伝子産物の発現は、一時的に形質移入したCOS細胞の間接的な免疫蛍光染色法により確認される。これらの遺伝子を有していない同じプラスミドはコントロールとして使用される。プラスミドDNAは大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 に形質転換される。DNAはセシウム塩化物濃度勾配によって精製される。その濃度は、従来技術として知られている標準的な方法によって決定され、そして、これは参考文献(Nyika et al., 1998)に記載されている。

【0022】

一旦ベクターが精製されれば、DNAを含んでいるベクターはリン酸塩バッファ溶液で懸濁されることができ、直接イヌに注入される。接種は、針を使用して筋肉を通じてあるいは静脈を通じて行うことができる。二者択一的に、遺伝子銃は、従来技術によって細胞に金ビード被覆DNAを輸送するために使用することができ、そして、ここに、参考文献(Fynan et al., 1993)に記載されている。この種のワクチンの理論的根拠は、接種を受けたホストがその細胞でプラスミドDNAを発現するという一方で、免疫反応を向上させるタンパク質を生産することである。新しく同定された遺伝子の各々は、この技術によってワクチンを作成するために使用することができる。

【0023】

CpG分子はワクチンにおいてアジュバンドとして使用することができる。この技術は、従来技術として知られており、ここに参考文献(Klinman et al., 1997)に記載されている。アジュバンドは抗原を助けるか、抗原に対する免疫反応を増加させる物質である。モチーフは、二つの5'プリンと二つの3'ピリミジンによって隣接したメチル化されていないCpGジヌクレオチドから構成される。CpGモチーフを含んでいるオリゴヌクレオチドは免疫系を活性化すると示されており、そのために、抗原に特異的な免疫反応を追加免疫する。この結果は、DNAワクチンとCpGオリゴヌクレオチドを混合することによって、あるいはCpGモチーフをプラ

スミドDNAに物理的に連結することによって、この発明で利用することができる

。

【0024】

組換えワクチン

組換えワクチンを開発するために、遺伝子の各々を個々に過剰発現ベクターへサブクローニングした後に、ワクチン開発のために精製した。ProA、ProB、ORF、シトクロムオキシダーゼホモログあるいは部分的なリポタンパク質シグナルペプチダーゼホモログは、tac、T5あるいはT7プロモーターのような強力なプロモーターとともにプラスミドの中で発現される。二者択一的に、これらのタンパク質の免疫学的に活性な断片はワクチン開発で使用される。これらの遺伝子の各々は、プラスミドへサブクローニングされて、上述のような大腸菌 (*E. coli*) 系統に形質転換される。

【0025】

組換えタンパク質は強力なプロモーターを備えるベクターを使用して過剰発現される。この技術で使用されるベクターは、pREST (Invitrogen Inc., CA)、pKK233-3 (Pharmacia, CA) および pET システム (Promega, WI) を含んでいるが、他の強力なプロモーターを備えているあらゆるベクターを使用することができる。過剰発現の後に、タンパク質は精製されて、アジュバンドと混合される。潜在的なアジュバンドは、水酸化アルミニウム、QuilA あるいは Montamide を含んでいるが、しかし制限されない。精製されたタンパク質は、従来の技術によって、イヌに予防注射をするための免疫原として使用され、そして、参考文献 (Chang et al., 1993 c; Chang et al., 1995) に記載されている。簡潔に、個々のタンパク質は発現し、*E. coli*. から精製される。その後、イヌは、精製された組換えワクチンおよびアジュバンドを筋肉内にあるいは皮下に注射される。この注射は免疫反応を誘発する。

【0026】

T細胞エピトープワクチン

CD8⁺Tリンパ球 (CTL) によってもたらされる直接細胞傷害性は、細胞内病原体に対する防御の主なメカニズムである。これらのエフェクターリンパ球は

、細胞表面上のMHCクラスIの分子と結合した短いペプチドの認識により感染細胞を除去する。外因性抗原はエンドソーム経路に入り、内因性の合成抗原がMHCクラスIの分子に関連したCD8⁺T細胞に提供されるのに対して、クラスIIの分子に関連したCD4⁺T細胞に提供される。E.canisは単球とマクロファージに存在する細胞内病原体である。本発明は、感染動物の単球やマクロファージから有機体を除去するE.canisに特有のCTL反応を生成する新しい方法を開発する。

【0027】

タンパク質ワクチンの保護反応を増加させるための戦略は、タンパク質の選択的なエピトープに免疫性を与えることである。この論理的根拠は、エピトープワクチンが無関係の部分を除く最も適切な免疫原性ペプチド成分を含むということである。したがって、検索は新しく同定されたタンパク質の最も高等な抗原性の部分のために実行される。

【0028】

新しく発見されたタンパク質からのT細胞エピトープを同定するために、T細胞エピトープを知るためのホモローグの配列の最初の電子検索が行われる。さらに、広範囲のT細胞エピトープマッピングが実行される。タンパク質、つまりProA、ProB、ORF、シトクロムオキシダーゼホモローグおよび部分的なリポタンパク質シグナルペプチダーゼホモローグの各々は、免疫原性ペプチド断片をテストされる。従来技術として知られている技術によるT細胞エピトープのマッピングは、文献(Launois et al., 1994 ; Lee and Horwitz, 1999)に記載されている。要するに、短い、重なり合っているペプチド配列(9-20のアミノ酸)は、当該タンパク質の全長以上に合成される。これらの短いペプチド断片は注目タンパク質で免疫抗原性を与えられている健康なイヌを使用してテストされる。イヌからの末梢血液単核細胞はT細胞刺激特性およびIFN-誘導特性をテストされる。最も強い反応を誘発するこれらの断片はT細胞エピトープワクチンとして最良の候補である。

【0029】

一度最良のエピトープを作る断片が同定されると、気管支敗血症菌(Bordetel

la bronchiseptica) の組換えアデニレートシクラーゼが、E.canis CD8⁺T 細胞エピトープを運んで構築される。気管支敗血症菌のアデニレートシクラーゼ トキシン (CyaA) は、イヌの疾病の原因となり、免疫反応を誘発する。さらに、CyaAは、細胞質内を目標とすることに十分に適している。1,706-残基の長いタンパク質のN-末端400のアミノ酸残基に対応するその触媒領域 (AC) は、免疫システムの細胞を含む多くの真核細胞に与えられることができる。また、トキシン内部移行は受容体伝達エンドサイトーシスに依存せず、触媒領域が細胞質膜を通過してターゲット細胞の細胞質ゾルに直接与えられることを示唆している。緑膿菌 (Peucedomonas aeruginosa) エキソトキシン A (PE) は、従来技術として知られており、文献 (Donnelly et al., 1993) に記載されている技術によって、細胞へペプチドやタンパク質を与えるためにこの過程で使用することができる別のトキシンである。

【0030】

異質のペプチド (16塩基) はその安定性又は触媒作用やカルモジュリン結合特性を変更せずに、CyaAのAC領域の様々なサイトに挿入されている。したがって、タンパク質工学は、特にCTLを刺激する抗原の設計および付与を許可する。特定のCD8⁺T細胞の誘導は、単球中のE.canisの細胞内持続性によりイヌehrlichiosisコントロールに重要な役割を果たすことができる。

【0031】

気管支敗血症菌のアデニレートシクラーゼ (AC) トキシン (cya) 遺伝子はクローンとして生成される。一方のProA、ProB、ORF、シトクロムオキシダーゼホモログ又は部分的リポタンパク質シグナルペプチダーゼホモログのどれかの9から20のアミノ酸クラスIのT細胞エピトープをコード化している合成二重らせん構造のオリゴヌクレオチドは、気管支敗血症菌コドン使用法によって設計されている。補足的なオリゴヌクレオチドは、cyaのクローンとして生成されたACをコード化する配列の過度に変動する領域に挿入される。この技術は他のシステムでの従来技術で知られており、文献 (Sebo et al., 1995 ; Guermonprez et al., 1999) に記載されている。

【0032】

キメラcya遺伝子を運ぶ組換えプラスミドは挿入されたエピトープのコピー数および定位を限定するために配列を決定される。正確な定位中にあるT細胞エピトープ(CD8⁺)を指定する挿入の完全なコピーを備えたプラスミドは、配列が決定したプラスミドから選択される。真核細胞に入る新しいキメラタンパク質の能力はエピトープの細胞内にターゲティングを確実にするために必要である(Fayolle et al., 1996)。

【0033】

ワクチンは2つの方法のうちの1つで作ることができる。組換えキメラタンパク質は精製され、イヌに予防接種するために使用することができる。あるいはまた、アデニレートシクラーゼへのインフレーム挿入によってT細胞エピトープやE. canis遺伝子を運ぶ弱まった気管支敗血症菌株は対立交換によってつくられる。対立交換は従来技術で知られている技術であり、文献(Cotter and Miller, 1994)に記載されている。

【0034】

最後に、アデニレートシクラーゼ-ProA、ProB、ORF、シトクロムオキシダーゼホモログ又はリポタンパク質シグナルペプチダーゼホモログキメラタンパク質の予防接種をしたイヌのE. canis感染に対する保護が限定される。野生タイプと組換えACおよびCyAはPBSの実用的な濃度に希釈され、キメラタンパク質はイヌの筋肉内か皮下に注入される。あるいはまた、T細胞エピトープはフレーム中の、弱まった気管支敗血症菌株のアデニレートシクラーゼ遺伝子に挿入され、イヌは生きたバクテリアを与えられる。

【0035】

組換え抗原は様々な病原体に対する人間や動物の予防接種のための有望な候補である。しかしながら、重大な欠点は在来の抗原と比較して組換え抗原の不十分な免疫抗原性である。それ故に新しい組換えワクチン開発の主な試みは、抗原の免疫抗原性を増加する新しいアジュバントのシステムを持つことである。サイトカインは強力な免疫調整分子である。本発明でアジュバントとして使用されるサイトカインはIL-12(インターロイキン-12)、GM-CSF(顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子)、IL-1(インターロイキン-1)及び-IFN(ガンマイ

ンターフェロン)を含むが制限はされない。

【0036】

これらのサイトカインは、予防接種を受けたホストの中で発熱性及び/又は扇動的徴候を含む副作用を持つことができる。したがって、全サイトカインタンパク質の副作用を避けるために、交互のアプローチは強く望まれた免疫調整特性を備えた合成ペプチド断片を使用することである。IL-1 のノナペプチド配列VQGEESNDKは強力な免疫増加特性を授けられ、免疫抗原性の増加のためのサイトカインの使用を例証するためにここで論じられる。

【0037】

このノナペプチドは、ProA、ProB、ORF、シトクロムオキシダーゼホモローク、又は部分的なりポタンパク質シグナルペプチダーゼホモロークタンパク質に挿入され、そしてその免疫抗原性は在来のタンパク質のそれと比較される。伝えられるところによると、不十分な免疫原性組換え抗原の中へのこの配列の挿入は、予防接種の後に強い保護免疫反応の機会を増加させる。このペプチドは、T-依存抗原とT-非依存抗原の両方に対する生体内の免疫反応を高めることができた。イヌのIL-1 配列は、見たところでは、その不適當な扇動的支持特性の多くを欠いている間、IL-1 の全体分子の多くの免疫調整活動を模倣するかもしれない。この戦略はProA、ProB、ORF、シトクロムオキシダーゼ、部分的なりポタンパク質シグナルペプチダーゼホモロークおよび他の*E. canis*抗原の免疫抗原性を増加させるために使用される。

【0038】

プラスミドpYFC199は、*E. canis*からのProA、ProB、ORF、シトクロムオキシダーゼホモローク、又は部分的なりポタンパク質シグナルペプチダーゼタンパク質を含んでいる断片の挿入に基づいてpBR322プラスミドに由来する。このプラスミドは、外因的配列をコード化するインフレーム挿入が挿入されることができると特有のHindIIIサイトを含んでいる。イヌのIL-1 163-171ペプチドをコード化する補足的な2つのオリゴヌクレオチド

AGGCTTGTTTCAGGGTGAAGAAGAATCCAACGACAAAAGCTT

およびAAGCTTTTGTGCGTTGGATTCTTCACCCTGAAGCTTGCCAはアニールされ、HindIIIで切

断され、pYFC199 HindIIIサイトに挿入される。キメラIL-1 を運ぶ組換えプラスミドは挿入されたエピトープの定位を決定するために配列が決定される。

【0039】

ワクチンとしての組換えタンパク質の有効性はイヌでテストされる。精製タンパク質は、イヌの腹腔内に注入される。特定病原体除去 (SPF) イヌは5つのグループに分類される。：1つのグループは、ProA、ProB、ORF、シトクロムオキシダーゼホモログ、又は部分的なりポタンパク質シグナルペプチダーゼホモログに由来するE.canis CD8⁺T細胞エピトープを運ぶ気管支敗血症菌の組換えアデニレートシクラーゼを与えられる。1つのグループは、コントロールとして気管支敗血症菌の組換えアデニレートシクラーゼを与えられる。1つのグループはProA、ProB、ORF、シトクロムオキシダーゼホモログ、又は部分的なりポタンパク質シグナルペプチダーゼホモログタンパク質に加えてイヌのIL-1 163-171挿入を与えられる。1つのグループは、ProA、ProB、ORF、シトクロムオキシダーゼホモログ、又は部分的なりポタンパク質シグナルペプチダーゼホモログ単独に由来するT細胞エピトープを与えられる。最後のグループはネガティブコントロールとしてPBSを与えられる。

【0040】

全ての動物は、4回予防接種を受ける(各々30-40µgずつ)。イヌは、 10^7 E.canisの最後の予防接種の10日後に試される。5回のポストチャレンジで各イヌからのおよそ1mlの血液がEDTAチューブに集められる。予防接種を受けたグループがコントロールのグループと比較して有機体を除去するかどうかは、培養とPCRによってテストされる。クローンを作られた遺伝子に由来する2つのプライマーはこれらのイヌからの組織または血液サンプルからの遺伝生成物を増幅するために使用することができる。内部プライマーもPCR遺伝生成物を交配させるためにオリゴヌクレオチドプローブとして使用のために設計することができる。

【0041】

本発明は、E.canisバクテリアに対してとても必要とされるワクチンを提供する。そのワクチンはイヌの単球のエーリキオシスから世界中のイヌを保護するた

めに使用することができる。

【0042】

従って、ここに記述された発明の実施例が、単に発明の法則の適用の例証であることが理解されるであろう。実施例を詳しく述べるための本文中の文献は、請求項の範囲を限定するものではなく、それ自身本発明にとって不可欠なもののみなされるその特徴を説明する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Chang, Yung-Fu

<120> EHRLICHIA CANIS GENES FOR VACCINE DEVELOPMENT

<130> crf2322

<150> U.S. 09/358,322

<151> 1999-07-21

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 5300

<212> DNA

<213> Ehrlichia canis

<400> 1

```

gatcaataa aatgaaacca agaataagaa acactattta tggattaata gcaataatac 60
tatctatgat atgttttagtg tacgcttctg taccactata tagtatattt tgtaaagtaa 120
caggttatgg aggtacagta agaacaagta atatatcaaa ttctaaaata ggtaacacta 180
ttattaaagt cagatttaat gcagatatac acaacaact gccatggaaa ttctatccag 240
aagtatctca tgtatttgta aaaccaggag acaaaaaatt gattttctac cgcgagaaa 300
atctacttga tgaggacact tcaggaatgg ctgtatataa tgttacacca cataaagtag 360
gaaaatattt taataaggta gcttgTTTTT gtttcaccaa acaaacatta taccctcacc 420
aaaaaactat aatgccagta tcatttttta tagatccagc catagaaaca gatcctgaaa 480
ctgctgacgt aaaactcacc actctttcat atgtattcct taagtacaaa gaataaactt 540
catataccgt acattataaa ctgattaaaa aaaataacta ttaatattga gcaaaataat 600
ttatctattc aacagattct tttcaattag agagtattca aaaacactac aactactgct 660
tgcaactttc taccactgat atataaaagt gaaataaatt taaaaaactt tagttttaat 720
agaagaattt tattaaaagc tttgaatcaa atttaattac tgatataaaa atactattaa 780
acattaacaa tgcttaatta aagtattatt atttacctta atttcataac ctttattaac 840

```

aatttcataa taaaaaact ttactcttat ttttttatca cttgatatta ttaaataatc 900
atataaactc ccaataaac tattgcaagg ttatggtaat gatgaaattt tttacttggt 960
ttttcatagt tttcttaaca atagccaatc atgctttatc ctttaacatt aaagttacac 1020
atgaaaaatt agataatgga atggaagtat acgtgattcc aaatcatcgc gcaccagcag 1080
tcatgcacat ggtattatac aaagtcggtg gaactgatga tccagtagga tactctggat 1140
tagcacattt ttttgaacac ttaatgttta gtggaacaga aaaatttcoct aatctcatca 1200
gcacacttag taatataggc ggaatttca atgcaagcac atctcaattt tgtactatat 1260
actacgaatt aatacaaaa caatatttat ctcttgcaat ggatattgaa tcagacagaa 1320
tgcagaattt taaggttacc gacaaagcat taataagaga acaaaaggta gtcttagaag 1380
aaagaaaaat gagagttgaa agccaagcaa aaaacatact agaagaagaa atggaaaatg 1440
cattttatta caatggatat ggcagaccag tagtaggatg ggaacatgaa attagcaact 1500
acaacaaaga agttgctgaa gcctttcata agctacatta tagtcctaata atgctatat 1560
taattgtaac tggagatgca gatccacaag aagtaatcac acttgcaaaa caatactatg 1620
ggaaaaatacc atctaataat aagaaacctt caagtcaagt tagggtagaa ccaccgcata 1680
aaacaaatat gactttaaca ttaaaagaca gttcagtaga aatcccagaa ctgtttttaa 1740
tgtatcaaat accaaatggt attaccaata aaaactacat acttaacatg atgtagcag 1800
aaataactcg tagtggtaaa ttcagcctgc tttacaatga tttggtaatt aacaatcaa 1860
tagttacatc gataaaaaa gattataatt acttaactga cagcgataat tacctttcca 1920
ttgaagctat acctaaaaac gggatctcta cagaagctgt agaacaagaa attcataaat 1980
gtataaataa ttatttagaa aatggaattt cagcagaata tttagaaagt gcaaagtata 2040
aagtaaaagc acatttaact tatgcatttg acggactaac tttcatatca tatttttatg 2100
gcatgcatct aatactagga gtaccgctat cagaaatcag taatatttac gataccatag 2160
acaaagtaag tatccaagat gttactccg ctatggaaaa tatctttcaa aacaatataa 2220
gattaaccgg gcatttatta cctaattggag aatagttatg agaaacatat tgtgttacac 2280
attaatattg attttctttt cattcaatac atatgcaaat gatctcaata ttaacataaa 2340
agaagctaca actaaaaata aaatacacta tctatatggt gaacatcata acctaccaac 2400
aatttcocta aaatttgcac tcaagaaagc aggatacgtc tatgatgcct ttgataagca 2460
aggacttgca tactttacat caaaaatatt aaacgaagga tcaaaaaaca actatgctct 2520
cagttttgca caacaattag aaggcaaagg tatagactta aaatttgata tagacctaga 2580

caatTTTTat atatcattaa aaaccttatac agaaaacttt gaagaagccc tagttttact 2640
cagtgattgc atattcaaca ccgtcacaga tcaagaaata ttcaatagaa taatagcaga 2700
acagattgca catgttaaatt catttatattc tgctcctgaa tttatagcta caacagaatt 2760
gaatcacgct atattcaaag ggcacccata ttctaacaaa gtttacggga cattaataac 2820
aatcaataat atcaaccagg aagacgttgc attatatata aaaaatagtt ttgacaagga 2880
acaaatcgtt atcagcgcag caggagatgt agatccaaca cagctatcaa atttactaga 2940
taaataatatt ctttcctaaat tgccatctgg taataacaaa aataccatac cagatacgac 3000
tgtaataaga gaagacacat tatttatatgt acagagagat gtaccacaaa gtgtcataat 3060
gtttgtaca gacacagtac catatcacag caaagactat catgcatcaa acttgttcaa 3120
tactatgcta ggcggattaa gtctcaattc aatattaatg atagaattaa gagacaagtt 3180
aggattaaca taccatagta gcagttcact atctaactg aatcatagta atgtgctatt 3240
tggtacaata ttcactgata ataccacagt acaaaaatgt atatccgtct taacagatat 3300
tatagagcac attaaaaagt atggagttga tgaagacact tttgcaattg caaaatctag 3360
tattaccaac ttttttattt tatctatggt aaataacaat aatgtagtg agatattggt 3420
aagcttaca ttacacgatac tagatccgag ttatattaat aaatacaatt cttactaca 3480
agcaataaca atagaagaag taataaaaat tgccaagaaa attttatcta atgaattagt 3540
aataattgaa gtaggaaaaa acaataacat aatggcaaa caaatagatg ctaaaaaaca 3600
cataccttgg ttaagtatac aggttattgt atttactaca agtattctat taggttgtat 3660
taagtaagta taagtagctt caatcaaata aaaaaacatt aaccaagtg ttagctctac 3720
cggagaagct tattataagc ttttaacctg ggataaatg aagttttgct aatgtaagc 3780
aaaaaattag taatcacaat atcaaatttt ctttacagga ttatattgtg acctaccata 3840
acaacttata tttagaaaat gacaacagat acacacatca ataaattatc actacaattc 3900
aattaataaa acaatgagta tttttactta attatttaat tttatttttt aaaaataaat 3960
tacaatttta cttactcaat aaaagcagtt atactaccaa gtattggatg gtattaatcg 4020
gagcaattac tacttaatag tatagctggt gacaagccgc aatctgcggt tcttgacaaa 4080
ataatactaa tcagttaaaa ttttgaagtg tttcaccata atggtattat ttatgaaagc 4140
tcatagcaca agtatacggg actttcagcc tttagaaga gctgctataa tcattgcagt 4200
gttaggttta gctgcattct tgtttgctgc tgctgctgc agtgatcgtt tccaaagatt 4260

gcaattaaca aatccatttg taatagcagg aatggttggc cttgcagttc ttttagttgc 4320
ttccttaaca gcagcattaa gtatatgctt aactaaaagt aagcaagtca cacaacatgc 4380
tattagacat cgctttggat acgagtcagg cacttcttct tctgtactgc ttgcaatatc 4440
aataatttct ttattacttg ctgcagcatt ttgtgaaag ataatgggta atgacaaccc 4500
agatctattc tttagcaaga tgcaagaact ctccaatcca cttgtttgtg cagctattgt 4560
agccgtttct gttttcctac tctcattcgt aatgtatgct gcaaagaaca ttataagtcc 4620
agataaaca actcacggtta ttatattatc taatcaaca actatagaag aagcaaaagt 4680
agatcaagga atgaatattt tgtcagcagt actcccagca gctggcattg acatcatgac 4740
tatagcttct tgtgacattt tagcagtgag cagccgggga tcctctcagc atcaatagat 4800
ttatgtttta gcctgtattc acctttttat taggtgttgt atcgtttctt tatataagtg 4860
tgttatatta tataaaacat ctaggagtta cagttaattt gtttcatgtg gttattactc 4920
tttgccatta ttattactat acctaaaaat ataaaagaat ccgccagggt gaatacaggc 4980
caatgtaagt tattgatata aaaatctata aaatcataga cagcaccata tcttattcta 5040
tctatgatat ttcttattga ccccccaata atgattacaa gaggtaatct ataatgtggc 5100
tgtactataa ataagtagca taaaacacaa gtaatcaaaa tcgagatact acaaaaaaca 5160
acattactat attcaaagtt atttaataa ccaaaaactaa ttccagcatt ccacactgta 5220
gtaaagcgca agaagcttaa tatctctatt acacctttat ctcctatcaa atttactaca 5280
taccatttac ttacctgatc 5300

<210> 2

<211> 522

<212> DNA

<213> Ehrlichia canis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(522)

<223> Protein translated from nucleotides 12 through 533
(cytochrome oxidase homolog).

<400> 2

atg aaa cca aga ata aga aac act att tat gga tta ata gca ata ata 48
 Met Lys Pro Arg Ile Arg Asn Thr Ile Tyr Gly Leu Ile Ala Ile Ile
 1 5 10 15

cta tct atg ata tgt tta gtg tac gct tct gta cca cta tat agt ata 96
 Leu Ser Met Ile Cys Leu Val Tyr Ala Ser Val Pro Leu Tyr Ser Ile
 20 25 30

ttt tgt aaa gta aca ggt tat gga ggt aca gta aga aca agt aat ata 144
 Phe Cys Lys Val Thr Gly Tyr Gly Gly Thr Val Arg Thr Ser Asn Ile
 35 40 45

tca aat tct aaa ata ggt aac act att att aaa gtc aga ttt aat gca 192
 Ser Asn Ser Lys Ile Gly Asn Thr Ile Ile Lys Val Arg Phe Asn Ala
 50 55 60

gat ata cac aaa caa ctg cca tgg aaa ttc tat cca gaa gta tct cat 240
 Asp Ile His Lys Gln Leu Pro Trp Lys Phe Tyr Pro Glu Val Ser His
 65 70 75 80

gta ttt gta aaa cca gga gaa caa aaa ttg att ttc tac cgc gca gaa 288
 Val Phe Val Lys Pro Gly Glu Gln Lys Leu Ile Phe Tyr Arg Ala Glu
 85 90 95

aat cta ctt gat gag gac act tca gga atg gct gta tat aat gtt aca 336
 Asn Leu Leu Asp Glu Asp Thr Ser Gly Met Ala Val Tyr Asn Val Thr
 100 105 110

cca cat aaa gta gga aaa tat ttt aat aag gta gct tgt ttt tgt ttc 384
 Pro His Lys Val Gly Lys Tyr Phe Asn Lys Val Ala Cys Phe Cys Phe
 115 120 125

acc aaa caa aca tta tac cct cat caa aaa act ata atg cca gta tca 432
 Thr Lys Gln Thr Leu Tyr Pro His Gln Lys Thr Ile Met Pro Val Ser
 130 135 140

ttt ttt ata gat cca gcc ata gaa aca gat cct gaa act gct gac gta 480
 Phe Phe Ile Asp Pro Ala Ile Glu Thr Asp Pro Glu Thr Ala Asp Val
 145 150 155 160

aaa ctc atc act ctt tca tat gta ttc ttt aag tac aaa gaa 522
 Lys Leu Ile Thr Leu Ser Tyr Val Phe Phe Lys Tyr Lys Glu
 165 170

<210> 3

<211> 174

<212> PRT

<213> Ehrlichia canis

<400> 3

Met Lys Pro Arg Ile Arg Asn Thr Ile Tyr Gly Leu Ile Ala Ile Ile
 1 5 10 15

Leu Ser Met Ile Cys Leu Val Tyr Ala Ser Val Pro Leu Tyr Ser Ile
 20 25 30
 Phe Cys Lys Val Thr Gly Tyr Gly Gly Thr Val Arg Thr Ser Asn Ile
 35 40 45
 Ser Asn Ser Lys Ile Gly Asn Thr Ile Ile Lys Val Arg Phe Asn Ala
 50 55 60
 Asp Ile His Lys Gln Leu Pro Trp Lys Phe Tyr Pro Glu Val Ser His
 65 70 75 80
 Val Phe Val Lys Pro Gly Glu Gln Lys Leu Ile Phe Tyr Arg Ala Glu
 85 90 95
 Asn Leu Leu Asp Glu Asp Thr Ser Gly Met Ala Val Tyr Asn Val Thr
 100 105 110
 Pro His Lys Val Gly Lys Tyr Phe Asn Lys Val Ala Cys Phe Cys Phe
 115 120 125
 Thr Lys Gln Thr Leu Tyr Pro His Gln Lys Thr Ile Met Pro Val Ser
 130 135 140
 Phe Phe Ile Asp Pro Ala Ile Glu Thr Asp Pro Glu Thr Ala Asp Val
 145 150 155 160
 Lys Leu Ile Thr Leu Ser Tyr Val Phe Phe Lys Tyr Lys Glu
 165 170

<210> 4

<211> 1314

<212> DNA

<213> Ehrlichia canis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1314)

<223> Protein translated from nucleotides 939 through
2,252 (ProA).

<400> 4

atg atg aaa ttt ttt act tgt ttt ttc ata gtt ttc tta aca ata gcc 48
 Met Met Lys Phe Phe Thr Cys Phe Phe Ile Val Phe Leu Thr Ile Ala
 1 5 10 15

| | |
|---|-----|
| aat cat gct tta tcc ttt aac att aaa gtt aca cat gaa aaa tta gat | 96 |
| Asn His Ala Leu Ser Phe Asn Ile Lys Val Thr His Glu Lys Leu Asp | |
| 20 25 30 | |
| aat gga atg gaa gta tac gtg att cca aat cat cgc gca cca gca gtc | 144 |
| Asn Gly Met Glu Val Tyr Val Ile Pro Asn His Arg Ala Pro Ala Val | |
| 35 40 45 | |
| atg cac atg gta tta tac aaa gtc ggt gga act gat gat cca gta gga | 192 |
| Met His Met Val Leu Tyr Lys Val Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Gly | |
| 50 55 60 | |
| tac tct gga tta gca cat ttt ttt gaa cac tta atg ttt agt gga aca | 240 |
| Tyr Ser Gly Leu Ala His Phe Phe Glu His Leu Met Phe Ser Gly Thr | |
| 65 70 75 80 | |
| gaa aaa ttt cct aat ctc atc agc aca ctt agt aat ata ggc gga aat | 288 |
| Glu Lys Phe Pro Asn Leu Ile Ser Thr Leu Ser Asn Ile Gly Gly Asn | |
| 85 90 95 | |
| ttc aat gca agc aca tct caa ttt tgt act ata tac tac gaa tta ata | 336 |
| Phe Asn Ala Ser Thr Ser Gln Phe Cys Thr Ile Tyr Tyr Glu Leu Ile | |
| 100 105 110 | |
| cca aaa caa tat tta tct ctt gca atg gat att gaa tca gac aga atg | 384 |
| Pro Lys Gln Tyr Leu Ser Leu Ala Met Asp Ile Glu Ser Asp Arg Met | |
| 115 120 125 | |
| cag aat ttt aag gtt acc gac aaa gca tta ata aga gaa caa aag gta | 432 |
| Gln Asn Phe Lys Val Thr Asp Lys Ala Leu Ile Arg Glu Gln Lys Val | |
| 130 135 140 | |
| gtc tta gaa gaa aga aaa atg aga gtt gaa agc caa gca aaa aac ata | 480 |
| Val Leu Glu Glu Arg Lys Met Arg Val Glu Ser Gln Ala Lys Asn Ile | |
| 145 150 155 160 | |
| cta gaa gaa gaa atg gaa aat gca ttt tat tac aat gga tat ggc aga | 528 |
| Leu Glu Glu Glu Met Glu Asn Ala Phe Tyr Tyr Asn Gly Tyr Gly Arg | |
| 165 170 175 | |
| cca gta gta gga tgg gaa cat gaa att agc aac tac aac aaa gaa gtt | 576 |
| Pro Val Val Gly Trp Glu His Glu Ile Ser Asn Tyr Asn Lys Glu Val | |
| 180 185 190 | |
| gct gaa gcc ttt cat aag cta cat tat agt cct aat aat gct ata tta | 624 |
| Ala Glu Ala Phe His Lys Leu His Tyr Ser Pro Asn Asn Ala Ile Leu | |
| 195 200 205 | |
| att gta act gga gat gca gat cca caa gaa gta atc aca ctt gca aaa | 672 |
| Ile Val Thr Gly Asp Ala Asp Pro Gln Glu Val Ile Thr Leu Ala Lys | |
| 210 215 220 | |
| caa tac tat ggg aaa ata cca tct aat aat aag aaa cct tca agt caa | 720 |
| Gln Tyr Tyr Gly Lys Ile Pro Ser Asn Asn Lys Lys Pro Ser Ser Gln | |
| 225 230 235 240 | |

gtt agg gta gaa cca ccg cat aaa aca aat atg act tta aca tta aaa 768
 Val Arg Val Glu Pro Pro His Lys Thr Asn Met Thr Leu Thr Leu Lys
 245 250 255

gac agt tca gta gaa atc cca gaa ctg ttt tta atg tat caa ata cca 816
 Asp Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Leu Phe Leu Met Tyr Gln Ile Pro
 260 265 270

aat ggt att acc aat aaa aac tac ata ctt aac atg atg tta gca gaa 864
 Asn Gly Ile Thr Asn Lys Asn Tyr Ile Leu Asn Met Met Leu Ala Glu
 275 280 285

ata ctc ggt agt ggt aaa ttc agc ctg ctt tac aat gat ttg gta att 912
 Ile Leu Gly Ser Gly Lys Phe Ser Leu Leu Tyr Asn Asp Leu Val Ile
 290 295 300

aac aat cca ata gtt aca tcg ata aaa aca gat tat aat tac tta act 960
 Asn Asn Pro Ile Val Thr Ser Ile Lys Thr Asp Tyr Asn Tyr Leu Thr
 305 310 315 320

gac agc gat aat tac ctt tcc att gaa gct ata cct aaa aac ggg atc 1008
 Asp Ser Asp Asn Tyr Leu Ser Ile Glu Ala Ile Pro Lys Asn Gly Ile
 325 330 335

tct aca gaa gct gta gaa caa gaa att cat aaa tgt ata aat aat tat 1056
 Ser Thr Glu Ala Val Glu Gln Glu Ile His Lys Cys Ile Asn Asn Tyr
 340 345 350

tta gaa aat gga att tca gca gaa tat tta gaa agt gca aag tat aaa 1104
 Leu Glu Asn Gly Ile Ser Ala Glu Tyr Leu Glu Ser Ala Lys Tyr Lys
 355 360 365

gta aaa gca cat tta act tat gca ttt gac gga cta act ttc ata tca 1152
 Val Lys Ala His Leu Thr Tyr Ala Phe Asp Gly Leu Thr Phe Ile Ser
 370 375 380

tat ttt tat ggc atg cat cta ata cta gga gta ccg cta tca gaa atc 1200
 Tyr Phe Tyr Gly Met His Leu Ile Leu Gly Val Pro Leu Ser Glu Ile
 385 390 395 400

agt aat att tac gat acc ata gac aaa gta agt atc caa gat gtt aac 1248
 Ser Asn Ile Tyr Asp Thr Ile Asp Lys Val Ser Ile Gln Asp Val Asn
 405 410 415

tcc gct atg gaa aat atc ttt caa aac aat ata aga tta acc ggg cat 1296
 Ser Ala Met Glu Asn Ile Phe Gln Asn Asn Ile Arg Leu Thr Gly His
 420 425 430

tta tta cct aat gga gaa 1314
 Leu Leu Pro Asn Gly Glu
 435

<210> 5

<211> 438

<212> PRT

<213> Ehrlichia canis

<400> 5

```

Met Met Lys Phe Phe Thr Cys Phe Phe Ile Val Phe Leu Thr Ile Ala
 1          5          10          15

Asn His Ala Leu Ser Phe Asn Ile Lys Val Thr His Glu Lys Leu Asp
          20          25          30

Asn Gly Met Glu Val Tyr Val Ile Pro Asn His Arg Ala Pro Ala Val
          35          40          45

Met His Met Val Leu Tyr Lys Val Gly Gly Thr Asp Asp Pro Val Gly
 50          55          60

Tyr Ser Gly Leu Ala His Phe Phe Glu His Leu Met Phe Ser Gly Thr
 65          70          75          80

Glu Lys Phe Pro Asn Leu Ile Ser Thr Leu Ser Asn Ile Gly Gly Asn
          85          90          95

Phe Asn Ala Ser Thr Ser Gln Phe Cys Thr Ile Tyr Tyr Glu Leu Ile
          100          105          110

Pro Lys Gln Tyr Leu Ser Leu Ala Met Asp Ile Glu Ser Asp Arg Met
          115          120          125

Gln Asn Phe Lys Val Thr Asp Lys Ala Leu Ile Arg Glu Gln Lys Val
          130          135          140

Val Leu Glu Glu Arg Lys Met Arg Val Glu Ser Gln Ala Lys Asn Ile
          145          150          155          160

Leu Glu Glu Glu Met Glu Asn Ala Phe Tyr Tyr Asn Gly Tyr Gly Arg
          165          170          175

Pro Val Val Gly Trp Glu His Glu Ile Ser Asn Tyr Asn Lys Glu Val
          180          185          190

Ala Glu Ala Phe His Lys Leu His Tyr Ser Pro Asn Asn Ala Ile Leu
          195          200          205

Ile Val Thr Gly Asp Ala Asp Pro Gln Glu Val Ile Thr Leu Ala Lys
          210          215          220

Gln Tyr Tyr Gly Lys Ile Pro Ser Asn Asn Lys Lys Pro Ser Ser Gln
          225          230          235          240

Val Arg Val Glu Pro Pro His Lys Thr Asn Met Thr Leu Thr Leu Lys
          245          250          255

Asp Ser Ser Val Glu Ile Pro Glu Leu Phe Leu Met Tyr Gln Ile Pro
          260          265          270

```


| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| aat | aca | tat | gca | aat | gat | ctc | aat | att | aac | ata | aaa | gaa | gct | aca | act | 96 |
| Asn | Thr | Tyr | Ala | Asn | Asp | Leu | Asn | Ile | Asn | Ile | Lys | Glu | Ala | Thr | Thr | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| aaa | aat | aaa | ata | cac | tat | cta | tat | gtt | gaa | cat | cat | aac | cta | cca | aca | 144 |
| Lys | Asn | Lys | Ile | His | Tyr | Leu | Tyr | Val | Glu | His | His | Asn | Leu | Pro | Thr | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| att | tcc | tta | aaa | ttt | gca | ttc | aag | aaa | gca | gga | tac | gct | tat | gat | gcc | 192 |
| Ile | Ser | Leu | Lys | Phe | Ala | Phe | Lys | Lys | Ala | Gly | Tyr | Ala | Tyr | Asp | Ala | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| ttt | gat | aag | caa | gga | ctt | gca | tac | ttt | aca | tca | aaa | ata | tta | aac | gaa | 240 |
| Phe | Asp | Lys | Gln | Gly | Leu | Ala | Tyr | Phe | Thr | Ser | Lys | Ile | Leu | Asn | Glu | |
| | 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| gga | tca | aaa | aac | aac | tat | gct | ctc | agt | ttt | gca | caa | caa | tta | gaa | ggc | 288 |
| Gly | Ser | Lys | Asn | Asn | Tyr | Ala | Leu | Ser | Phe | Ala | Gln | Gln | Leu | Glu | Gly | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| aaa | ggt | ata | gac | tta | aaa | ttt | gat | ata | gac | cta | gac | aat | ttt | tat | ata | 336 |
| Lys | Gly | Ile | Asp | Leu | Lys | Phe | Asp | Ile | Asp | Leu | Asp | Asn | Phe | Tyr | Ile | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| tca | tta | aaa | acc | tta | tca | gaa | aac | ttt | gaa | gaa | gcc | cta | gtt | tta | ctc | 384 |
| Ser | Leu | Lys | Thr | Leu | Ser | Glu | Asn | Phe | Glu | Glu | Ala | Leu | Val | Leu | Leu | |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| agt | gat | tgc | ata | ttc | aac | acc | gtc | aca | gat | caa | gaa | ata | ttc | aat | aga | 432 |
| Ser | Asp | Cys | Ile | Phe | Asn | Thr | Val | Thr | Asp | Gln | Glu | Ile | Phe | Asn | Arg | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | | 140 | | | | |
| ata | ata | gca | gaa | cag | att | gca | cat | gtt | aaa | tca | tta | tat | tct | gct | cct | 480 |
| Ile | Ile | Ala | Glu | Gln | Ile | Ala | His | Val | Lys | Ser | Leu | Tyr | Ser | Ala | Pro | |
| | 145 | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| gaa | ttt | ata | gct | aca | aca | gaa | atg | aat | cac | gct | ata | ttc | aaa | ggg | cac | 528 |
| Glu | Phe | Ile | Ala | Thr | Thr | Glu | Met | Asn | His | Ala | Ile | Phe | Lys | Gly | His | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| cca | tat | tct | aac | aaa | gtt | tac | ggg | aca | tta | aat | aca | atc | aat | aat | atc | 576 |
| Pro | Tyr | Ser | Asn | Lys | Val | Tyr | Gly | Thr | Leu | Asn | Thr | Ile | Asn | Asn | Ile | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| aac | cag | gaa | gac | ggt | gca | tta | tat | ata | aaa | aat | agt | ttt | gac | aag | gaa | 624 |
| Asn | Gln | Glu | Asp | Val | Ala | Leu | Tyr | Ile | Lys | Asn | Ser | Phe | Asp | Lys | Glu | |
| | | | 195 | | | | 200 | | | | | | 205 | | | |
| caa | atc | ggt | atc | agc | gca | gca | gga | gat | gta | gat | cca | aca | cag | cta | tca | 672 |
| Gln | Ile | Val | Ile | Ser | Ala | Ala | Gly | Asp | Val | Asp | Pro | Thr | Gln | Leu | Ser | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | | 220 | | | | |
| aat | tta | cta | gat | aaa | tat | att | ctt | tcc | aaa | ttg | cca | tct | ggt | aat | aac | 720 |
| Asn | Leu | Leu | Asp | Lys | Tyr | Ile | Leu | Ser | Lys | Leu | Pro | Ser | Gly | Asn | Asn | |
| | 225 | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |

| | |
|---|------|
| aaa aat acc ata cca gat acg act gtt aat aga gaa gac aca tta tta | 768 |
| Lys Asn Thr Ile Pro Asp Thr Thr Val Asn Arg Glu Asp Thr Leu Leu | |
| 245 250 255 | |
| tat gta cag aga gat gta cca caa agt gtc ata atg ttt gct aca gac | 816 |
| Tyr Val Gln Arg Asp Val Pro Gln Ser Val Ile Met Phe Ala Thr Asp | |
| 260 265 270 | |
| aca gta cca tat cac agc aaa gac tat cat gca tca aac ttg ttc aat | 864 |
| Thr Val Pro Tyr His Ser Lys Asp Tyr His Ala Ser Asn Leu Phe Asn | |
| 275 280 285 | |
| act atg cta ggc gga tta agt ctc aat tca ata tta atg ata gaa tta | 912 |
| Thr Met Leu Gly Gly Leu Ser Leu Asn Ser Ile Leu Met Ile Glu Leu | |
| 290 295 300 | |
| aga gac aag tta gga tta aca tac cat agt agc agt tca cta tct aac | 960 |
| Arg Asp Lys Leu Gly Leu Thr Tyr His Ser Ser Ser Ser Leu Ser Asn | |
| 305 310 315 320 | |
| atg aat cat agt aat gtg cta ttt ggt aca ata ttc act gat aat acc | 1008 |
| Met Asn His Ser Asn Val Leu Phe Gly Thr Ile Phe Thr Asp Asn Thr | |
| 325 330 335 | |
| aca gta aca aaa tgt ata tcc gtc tta aca gat att ata gag cac att | 1056 |
| Thr Val Thr Lys Cys Ile Ser Val Leu Thr Asp Ile Ile Glu His Ile | |
| 340 345 350 | |
| aaa aag tat gga gtt gat gaa gac act ttt gca att gca aaa tct agt | 1104 |
| Lys Lys Tyr Gly Val Asp Glu Asp Thr Phe Ala Ile Ala Lys Ser Ser | |
| 355 360 365 | |
| att acc aac tct ttt att tta tct atg tta aat aac aat aat gtt agt | 1152 |
| Ile Thr Asn Ser Phe Ile Leu Ser Met Leu Asn Asn Asn Asn Val Ser | |
| 370 375 380 | |
| gag ata ttg tta agc tta caa tta cac gat cta gat ccg agt tat att | 1200 |
| Glu Ile Leu Leu Ser Leu Gln Leu His Asp Leu Asp Pro Ser Tyr Ile | |
| 385 390 395 400 | |
| aat aaa tac aat tct tac tac aaa gca ata aca ata gaa gaa gta aat | 1248 |
| Asn Lys Tyr Asn Ser Tyr Tyr Lys Ala Ile Thr Ile Glu Glu Val Asn | |
| 405 410 415 | |
| aaa att gcc aag aaa att tta tct aat gaa tta gta ata att gaa gta | 1296 |
| Lys Ile Ala Lys Lys Ile Leu Ser Asn Glu Leu Val Ile Ile Glu Val | |
| 420 425 430 | |
| gga aaa aac aat aac ata aat ggc aaa caa ata gat gct aaa aaa cac | 1344 |
| Gly Lys Asn Asn Asn Ile Asn Gly Lys Gln Ile Asp Ala Lys Lys His | |
| 435 440 445 | |
| ata cct tgg tta agt ata cag gtt att gta ttt act aca agt att cta | 1392 |
| Ile Pro Trp Leu Ser Ile Gln Val Ile Val Phe Thr Thr Ser Ile Leu | |
| 450 455 460 | |

tta ggt tgt att aag
 Leu Gly Cys Ile Lys
 465

1407

<210> 7

<211> 469

<212> PRT

<213> Ehrlichia canis

<400> 7

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Arg | Asn | Ile | Leu | Cys | Tyr | Thr | Leu | Ile | Leu | Ile | Phe | Phe | Ser | Phe |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Asn | Thr | Tyr | Ala | Asn | Asp | Leu | Asn | Ile | Asn | Ile | Lys | Glu | Ala | Thr | Thr |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Lys | Asn | Lys | Ile | His | Tyr | Leu | Tyr | Val | Glu | His | His | Asn | Leu | Pro | Thr |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Ile | Ser | Leu | Lys | Phe | Ala | Phe | Lys | Lys | Ala | Gly | Tyr | Ala | Tyr | Asp | Ala |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Phe | Asp | Lys | Gln | Gly | Leu | Ala | Tyr | Phe | Thr | Ser | Lys | Ile | Leu | Asn | Glu |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Gly | Ser | Lys | Asn | Asn | Tyr | Ala | Leu | Ser | Phe | Ala | Gln | Gln | Leu | Glu | Gly |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Lys | Gly | Ile | Asp | Leu | Lys | Phe | Asp | Ile | Asp | Leu | Asp | Asn | Phe | Tyr | Ile |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Ser | Leu | Lys | Thr | Leu | Ser | Glu | Asn | Phe | Glu | Glu | Ala | Leu | Val | Leu | Leu |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Ser | Asp | Cys | Ile | Phe | Asn | Thr | Val | Thr | Asp | Gln | Glu | Ile | Phe | Asn | Arg |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Ile | Ile | Ala | Glu | Gln | Ile | Ala | His | Val | Lys | Ser | Leu | Tyr | Ser | Ala | Pro |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Glu | Phe | Ile | Ala | Thr | Thr | Glu | Met | Asn | His | Ala | Ile | Phe | Lys | Gly | His |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Pro | Tyr | Ser | Asn | Lys | Val | Tyr | Gly | Thr | Leu | Asn | Thr | Ile | Asn | Asn | Ile |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Asn | Gln | Glu | Asp | Val | Ala | Leu | Tyr | Ile | Lys | Asn | Ser | Phe | Asp | Lys | Glu |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Gln | Ile | Val | Ile | Ser | Ala | Ala | Gly | Asp | Val | Asp | Pro | Thr | Gln | Leu | Ser |
| 210 | | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |

Asn Leu Leu Asp Lys Tyr Ile Leu Ser Lys Leu Pro Ser Gly Asn Asn
 225 230 235 240

Lys Asn Thr Ile Pro Asp Thr Thr Val Asn Arg Glu Asp Thr Leu Leu
 245 250 255

Tyr Val Gln Arg Asp Val Pro Gln Ser Val Ile Met Phe Ala Thr Asp
 260 265 270

Thr Val Pro Tyr His Ser Lys Asp Tyr His Ala Ser Asn Leu Phe Asn
 275 280 285

Thr Met Leu Gly Gly Leu Ser Leu Asn Ser Ile Leu Met Ile Glu Leu
 290 295 300

Arg Asp Lys Leu Gly Leu Thr Tyr His Ser Ser Ser Ser Leu Ser Asn
 305 310 315 320

Met Asn His Ser Asn Val Leu Phe Gly Thr Ile Phe Thr Asp Asn Thr
 325 330 335

Thr Val Thr Lys Cys Ile Ser Val Leu Thr Asp Ile Ile Glu His Ile
 340 345 350

Lys Lys Tyr Gly Val Asp Glu Asp Thr Phe Ala Ile Ala Lys Ser Ser
 355 360 365

Ile Thr Asn Ser Phe Ile Leu Ser Met Leu Asn Asn Asn Val Ser
 370 375 380

Glu Ile Leu Leu Ser Leu Gln Leu His Asp Leu Asp Pro Ser Tyr Ile
 385 390 395 400

Asn Lys Tyr Asn Ser Tyr Tyr Lys Ala Ile Thr Ile Glu Glu Val Asn
 405 410 415

Lys Ile Ala Lys Lys Ile Leu Ser Asn Glu Leu Val Ile Ile Glu Val
 420 425 430

Gly Lys Asn Asn Asn Ile Asn Gly Lys Gln Ile Asp Ala Lys Lys His
 435 440 445

Ile Pro Trp Leu Ser Ile Gln Val Ile Val Phe Thr Thr Ser Ile Leu
 450 455 460

Leu Gly Cys Ile Lys
 465

<210> 8

<211> 675

<212> DNA

<213> Ehrlichia canis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(675)

<223> Protein translated from nucleotides 4,121 through
4,795 (ORF of unknown function).

<400> 8

```

atg gta tta ttt atg aaa gct cat agc aca agt ata cgg aac ttt cag 48
Met Val Leu Phe Met Lys Ala His Ser Thr Ser Ile Arg Asn Phe Gln
  1             5             10             15

cct tta gaa aga gct gct ata atc att gca gtg tta ggt tta gct gca 96
Pro Leu Glu Arg Ala Ala Ile Ile Ile Ala Val Leu Gly Leu Ala Ala
      20             25             30

ttc ttg ttt gct gct gct gcc tgc agt gat cgt ttc caa aga ttg caa 144
Phe Leu Phe Ala Ala Ala Ala Cys Ser Asp Arg Phe Gln Arg Leu Gln
      35             40             45

tta aca aat cca ttt gta ata gca gga atg gtt ggc ctt gca gtt ctt 192
Leu Thr Asn Pro Phe Val Ile Ala Gly Met Val Gly Leu Ala Val Leu
      50             55             60

tta gtt gct tcc tta aca gca gca tta agt ata tgc tta act aaa agt 240
Leu Val Ala Ser Leu Thr Ala Ala Leu Ser Ile Cys Leu Thr Lys Ser
      65             70             75

aag caa gtc aca caa cat gct att aga cat cgc ttt gga tac gag tca 288
Lys Gln Val Thr Gln His Ala Ile Arg His Arg Phe Gly Tyr Glu Ser
      85             90             95

agc act tct tct tct gta ctg ctt gca ata tca ata att tct tta tta 336
Ser Thr Ser Ser Ser Val Leu Leu Ala Ile Ser Ile Ile Ser Leu Leu
      100            105            110

ctt gct gca gca ttt tgt gga aag ata atg ggt aat gac aac cca gat 384
Leu Ala Ala Ala Phe Cys Gly Lys Ile Met Gly Asn Asp Asn Pro Asp
      115            120            125

cta ttc ttt agc aag atg caa gaa ctc tcc aat cca ctt gtt gtt gca 432
Leu Phe Phe Ser Lys Met Gln Glu Leu Ser Asn Pro Leu Val Val Ala
      130            135            140

gct att gta gcc gtt tct gtt ttc cta ctc tca ttc gta atg tat gct 480
Ala Ile Val Ala Val Ser Val Phe Leu Leu Ser Phe Val Met Tyr Ala
      145            150            155

gca aag aac att ata agt cca gat aaa caa act cac gtt att ata tta 528
Ala Lys Asn Ile Ile Ser Pro Asp Lys Gln Thr His Val Ile Ile Leu
      165            170            175

```

tct aat caa caa act ata gaa gaa gca aaa gta gat caa gga atg aat 576
 Ser Asn Gln Gln Thr Ile Glu Glu Ala Lys Val Asp Gln Gly Met Asn
 180 185 190

att ttg tca gca gta ctc cca gca gct ggc att gac atc atg act ata 624
 Ile Leu Ser Ala Val Leu Pro Ala Ala Gly Ile Asp Ile Met Thr Ile
 195 200 205

gct tct tgt gac att tta gca gtg agc agc cgg gga tcc tct cag cat 672
 Ala Ser Cys Asp Ile Leu Ala Val Ser Ser Arg Gly Ser Ser Gln His
 210 215 220

caa 675
 Gln
 225

<210> 9

<211> 225

<212> PRT

<213> Ehrlichia canis

<400> 9

Met Val Leu Phe Met Lys Ala His Ser Thr Ser Ile Arg Asn Phe Gln
 1 5 10 15

Pro Leu Glu Arg Ala Ala Ile Ile Ile Ala Val Leu Gly Leu Ala Ala
 20 25 30

Phe Leu Phe Ala Ala Ala Ala Cys Ser Asp Arg Phe Gln Arg Leu Gln
 35 40 45

Leu Thr Asn Pro Phe Val Ile Ala Gly Met Val Gly Leu Ala Val Leu
 50 55 60

Leu Val Ala Ser Leu Thr Ala Ala Leu Ser Ile Cys Leu Thr Lys Ser
 65 70 75 80

Lys Gln Val Thr Gln His Ala Ile Arg His Arg Phe Gly Tyr Glu Ser
 85 90 95

Ser Thr Ser Ser Ser Val Leu Leu Ala Ile Ser Ile Ile Ser Leu Leu
 100 105 110

Leu Ala Ala Ala Phe Cys Gly Lys Ile Met Gly Asn Asp Asn Pro Asp
 115 120 125

Leu Phe Phe Ser Lys Met Gln Glu Leu Ser Asn Pro Leu Val Val Ala
 130 135 140

Ala Ile Val Ala Val Ser Val Phe Leu Leu Ser Phe Val Met Tyr Ala
 145 150 155 160

Ala Lys Asn Ile Ile Ser Pro Asp Lys Gln Thr His Val Ile Ile Leu
 165 170 175
 Ser Asn Gln Gln Thr Ile Glu Glu Ala Lys Val Asp Gln Gly Met Asn
 180 185 190
 Ile Leu Ser Ala Val Leu Pro Ala Ala Gly Ile Asp Ile Met Thr Ile
 195 200 205
 Ala Ser Cys Asp Ile Leu Ala Val Ser Ser Arg Gly Ser Ser Gln His
 210 215 220

Gln
 225

<210> 10

<211> 417

<212> DNA

<213> *Ehrlichia canis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(417)

<223> Protein translated from complementary sequence
 derived from nucleotides 4,884 to 5,300 (partial
 lipoprotein signal peptidase homolog).

<400> 10

gat cag gta agt aaa tgg tat gta gta aat ttg ata gga gat aaa ggt 48
 Asp Gln Val Ser Lys Trp Tyr Val Val Asn Leu Ile Gly Asp Lys Gly
 1 5 10 15
 gta ata gag ata tta agc ttc ttg cgc ttt act aca gtg tgg aat gct 96
 Val Ile Glu Ile Leu Ser Phe Leu Arg Phe Thr Thr Val Trp Asn Ala
 20 25 30
 gga att agt ttt ggt ata tta aat aac ttt gaa tat agt aat gtt gtt 144
 Gly Ile Ser Phe Gly Ile Leu Asn Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Val Val
 35 40 45
 ttt tgt agt atc tcg att ttg att act tgt gtt tta tgc tac tta ttt 192
 Phe Cys Ser Ile Ser Ile Leu Ile Thr Cys Val Leu Cys Tyr Leu Phe
 50 55 60
 ata gta cag cca cat tat aga tta cct ctt gta atc att att ggg ggg 240
 Ile Val Gln Pro His Tyr Arg Leu Pro Leu Val Ile Ile Ile Gly Gly
 65 70 75 80

```

tca ata gga aat atc ata gat aga ata aga tat ggt gct gtc tat gat 288
Ser Ile Gly Asn Ile Ile Asp Arg Ile Arg Tyr Gly Ala Val Tyr Asp
      85                      90                      95

ttt ata gat ttt tat atc aat aac tta cat tgg cct gta ttc aac ctg 336
Phe Ile Asp Phe Tyr Ile Asn Asn Leu His Trp Pro Val Phe Asn Leu
      100                      105                      110

gcg gat tct ttt ata ttt tta ggt ata gta ata ata atg gca aag agt 384
Ala Asp Ser Phe Ile Phe Leu Gly Ile Val Ile Ile Met Ala Lys Ser
      115                      120                      125

aat aac cac atg aaa caa att aac tgt aac tcc 417
Asn Asn His Met Lys Gln Ile Asn Cys Asn Ser
      130                      135

```

<210> 11

<211> 139

<212> PRT

<213> Ehrlichia canis

<400> 11

```

Asp Gln Val Ser Lys Trp Tyr Val Val Asn Leu Ile Gly Asp Lys Gly
 1          5          10          15

Val Ile Glu Ile Leu Ser Phe Leu Arg Phe Thr Thr Val Trp Asn Ala
 20          25          30

Gly Ile Ser Phe Gly Ile Leu Asn Asn Phe Glu Tyr Ser Asn Val Val
 35          40          45

Phe Cys Ser Ile Ser Ile Leu Ile Thr Cys Val Leu Cys Tyr Leu Phe
 50          55          60

Ile Val Gln Pro His Tyr Arg Leu Pro Leu Val Ile Ile Ile Gly Gly
 65          70          75          80

Ser Ile Gly Asn Ile Ile Asp Arg Ile Arg Tyr Gly Ala Val Tyr Asp
 85          90          95

Phe Ile Asp Phe Tyr Ile Asn Asn Leu His Trp Pro Val Phe Asn Leu
100          105          110

Ala Asp Ser Phe Ile Phe Leu Gly Ile Val Ile Ile Met Ala Lys Ser
115          120          125

Asn Asn His Met Lys Gln Ile Asn Cys Asn Ser
130          135

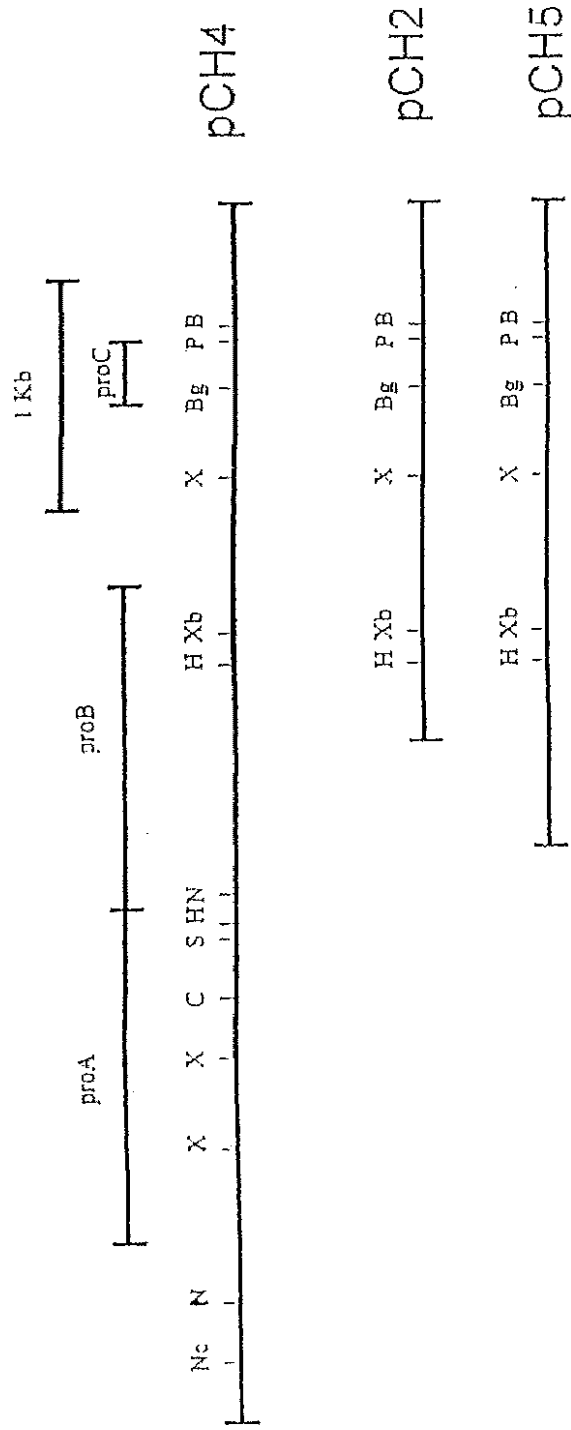
```

【図面の簡単な説明】

【図1】

ライブラリー・スクリーンの中で識別された3つのクローンを示す。

Figure 1



【手続補正書】

【提出日】平成14年2月12日(2002.2.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の群から選択されたDNAを含む組換えDNA。

- a) 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA
- b) 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA
- c) 配列番号7の1～449で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA
- d) 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA
- e) 配列番号11の1～31で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA、および
- f) 配列番号11の33～139で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

【請求項2】 前記DNAが少なくとも1つの免疫原性エピトープをコード化することを特徴とする請求項1に記載の組換えDNA。

【請求項3】 以下の群から選択されたタンパク質を含む組換えタンパク質。

- a) 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- b) 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- c) 配列番号7の1～449で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- d) 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

e) 配列番号11の1~31で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質、および

f) 配列番号11の33~139で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

【請求項4】 前記タンパク質が少なくとも1つの免疫原性エピトープを含んでいることを特徴とする請求項3に記載の組換えタンパク質。

【請求項5】 E.canisの感染症からイヌを保護するワクチン。

【請求項6】 以下の構成を含む請求項5に記載のワクチン。

a) ベクターが適切な宿主内に提供されたとき、組換えタンパク質が発現されるようなベクターに挿入された組換えDNAを発現することができるベクター、および

b) 前記DNAが以下の群から選択されることを特徴とする前記ベクターが挿入された組換えDNA

i. 配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

ii. 配列番号5で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

iii. 配列番号7の1~449で特定されるアミノ酸で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

iv. 配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

v. 配列番号11の1~31で特定されるアミノ酸で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA、および

vi. 配列番号11の33~139で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

vii. ポリペプチドが免疫反応を刺激するのに十分であることを特徴とする、上述のアミノ酸配列から少なくとも12アミノ酸数のポリペプチドをコード化する前記組換えDNAの任意の部分

【請求項7】 前記DNAがさらにCpGモチーフをコード化するDNAを含むことを特

徴とする請求項6に記載のワクチン。

【請求項8】 前記DNAがさらに以下の群から選択されたプロモーターを含むことを特徴とする請求項6に記載のワクチン。

- a) サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター
- b) ヒト組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)、および
- c) ヒト伸長因子(EF-1)のプロモーター/エンハンサー領域

【請求項9】 前記ベクターが以下の群から選択されることを特徴とする請求項6に記載のワクチン。

- a) pcDNA3
- b) pC1
- c) VR1012、および
- d) VR1020

【請求項10】 前記ワクチンが以下の群から選択された方法によって前記ホストに投与されることを特徴とする請求項6に記載のワクチン。

- a) 筋肉注射
- b) 静脈注射、および
- c) 遺伝子銃による注射

【請求項11】 前記ホストがイヌであることを特徴とする、請求項10に記載のワクチン。

【請求項12】 以下の構成を含む、請求項5に記載のワクチン。

- a) 以下の群から選択される組換えタンパク質
 - i. 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
 - ii. 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
 - iii. 配列番号7の1~449で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
 - iv. 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
 - v. 配列番号11の1~31で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質、および
 - vi. 配列番号11の33~139で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ

酸配列を有するタンパク質、および

vii. ポリペプチドが免疫反応を刺激するのに十分であることを特徴とする、上述のアミノ酸配列から少なくとも12アミノ酸数のポリペプチドをコード化する前記組換えDNAの任意の部分

【請求項13】 前記ワクチンがさらに以下の群から選択されたアジュバンドを含むことを特徴とする請求項12に記載のワクチン。

- a) 水酸化アルミニウム
- b) QuilA、および
- c) Montamide

【請求項14】 前記組換えタンパク質に効果的に関連したサイトカインをさらに含むことを特徴とする請求項12に記載のワクチン。

【請求項15】 前記サイトカインが以下の群から選択されることを特徴とする請求項14に記載のワクチン。

- a) インターロイキン-1 (IL-1)
- b) 顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)
- c) γ -インターフェロン(γ -IFN)
- d) IL-1 タンパク質由来のアミノ酸であるVQGEESNDK、および
- e) E.canisに対する改善された免疫原性反応を誘発する、上述のサイトカインのうちの任意の部分

【請求項16】 前記ワクチンが以下の群から選択された方法によってホストに投与されることを特徴とする請求項12に記載のワクチン。

- a) 筋肉注射、および
- b) 静脈注射

【請求項17】 前記ホストがイヌであることを特徴とする請求項16に記載のワクチン。

【請求項18】 T細胞エピトープが以下の群から選択されるタンパク質のアミノ酸ペプチド断片を含むことを特徴とする、T細胞エピトープを含有する組換えタンパク質を含む請求項5に記載のワクチン。

- a) 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

- b) 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- c) 配列番号7の1~449で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- d) 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- e) 配列番号11の1~31のアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質
- f) 配列番号11の33~139のアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質、および
- g) ポリペプチドが免疫反応を刺激するのに十分であることを特徴とする、上述のアミノ酸配列から少なくとも12アミノ酸数のポリペプチドをコード化する前記組換えDNAの任意の部分

【請求項19】 前記アミノ酸ペプチド断片が9~20のアミノ酸を含むことを特徴とする請求項18に記載のワクチン。

【請求項20】 免疫系の細胞を含む真核細胞へ内部移行することができるタンパク質をコード化する組換えDNAをさらに含む、請求項18に記載のワクチン。

【請求項21】 前記タンパク質が、以下の群から選択されるトキシンを含む真核細胞へ内部移行することができることを特徴とする請求項20に記載のワクチン。

a) 気管支敗血症菌 (*Bordetella bronchiseptica*) のアデニル酸シクラーゼの組換え体、および

b) 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) のエキソトキシンA(PE)組換え体

【請求項22】 前記ワクチンが、以下の群から選択された方法によってホストに投与されることを特徴とする請求項18に記載のワクチン。

a) 筋肉注射、および

b) 皮下注射

【請求項23】 前記ホストがイヌであることを特徴とする請求項22に記載のワクチン。

【請求項24】 以下の構成からなる*E. canis*に対するT細胞エピトープを同定する方法。

a) タンパク質が以下の群から選択されることを特徴とする、タンパク質の全長に渡る重複タンパク質断片の合成

i. 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

ii. 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

iii. 配列番号7の1~449で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

iv. 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

v. 配列番号11の1~31で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

vi. 配列番号11の33~139で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質、および

vii. ポリペプチドが免疫反応を刺激するのに十分であることを特徴とする、上述のアミノ酸配列から少なくとも12アミノ酸数のポリペプチドをコード化する前記組換えDNAの任意の部分

b) 前記ペプチド断片が宿主動物内において免疫反応を誘発するかどうかを決定するためのペプチド断片の測定、および

c) 前記断片が免疫反応を誘発するかどうかをE.canisの前記T細胞エピトープとしての前記ペプチド断片の同定

【請求項25】 前記ペプチド断片が9~20のアミノ酸を含むことを特徴とする請求項24に記載の方法。

【請求項26】 以下の構成からなるE.canisに対するワクチンを生成する方法。

a) ベクター内に挿入された組換えDNAを発現することができるベクターの選択

b) 前記DNAが以下の群から選択されることを特徴とする、前記ベクターが適切な宿主内に供給された場合に、組換えタンパク質として発現する前記ベクターへの組換えDNAの挿入

i. 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

ii. 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する

る組換えDNA

iii. 配列番号7の1～449で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

iv. 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

v. 配列番号11の1～31で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

vi. 配列番号11の33～139で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA、および

vii. ポリペプチドが免疫反応を刺激するのに十分であることを特徴とする、上述のアミノ酸配列から少なくとも12アミノ酸数のポリペプチドをコード化する前記組換えDNAの任意の部分

【請求項27】 前記DNAがさらにCpGモチーフをコード化するDNAを含むことを特徴とする請求項26に記載の方法。

【請求項28】 前記DNAがさらに以下の群から選択されたプロモーターを含むことを特徴とする請求項26に記載の方法。

- a) サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター
- b) ヒト組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)、および
- c) ヒト伸長因子(EF-1)のプロモーター/エンハンサー領域

【請求項29】 前記ベクターが以下の群から選択されることを特徴とする、請求項26に記載の方法。

- a) pcDNA3
- b) pC1
- c) VR1012、および
- d) VR1020

【請求項30】 前記ウイルスが前記ホストに以下の群から選択される方法で挿入されることを特徴とする請求項26に記載の方法。

- a) 筋肉注射
- b) 静脈注射、および

c) 遺伝子銃による注射

【請求項31】 前記ホストがイヌであることを特徴とする請求項30に記載の方法。

【請求項32】 以下の構成からなる、*E. canis*に対するワクチンの生成方法。

a) ベクター内に挿入された組換えタンパク質を発現することができるベクターの選択

b) DNAが以下の群から選択されることを特徴とする、前記ベクターが細菌株内で形質転換する場合に、組換えタンパク質が発現するような組換えDNAの前記ベクター内への挿入

i. 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

ii. 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

iii. 配列番号7の1~449で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

iv. 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

v. 配列番号11の1~31で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA

vi. 配列番号11の33~139で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化する組換えDNA、および

vii. ポリペプチドが免疫反応を刺激するのに十分であることを特徴とする、上述のアミノ酸配列から少なくとも12アミノ酸数のポリペプチドをコード化する前記組換えDNAの任意の部分、および

c) 前記細菌株からの組換えタンパク質の回収

【請求項33】 前記ワクチンが以下の群から選択されるアジュバンドをさらに含むことを特徴とする請求項32に記載の方法。

a) 水酸化アルミニウム

b) QuilA、および

c) Montamide

【請求項34】 前記ワクチンが以下の群から選択されたプロモーターをさらに含むことを特徴とする請求項32に記載の方法。

a) tac

b) T5、および

c) T7

【請求項35】 前記細菌株が、大腸菌(E.coli.)であることを特徴とする請求項32に記載の方法。

【請求項36】 前記ベクターが以下の群から選択されることを特徴とする請求項32に記載の方法。

a) pREST

b) pET

c) pKK233-3

【請求項37】 前記ワクチンが前記ワクチンに関連した操作性のサイトカインをさらに含むことを特徴とする請求項32に記載の方法。

【請求項38】 前記サイトカインが以下の群から選択されることを特徴とする請求項37に記載の方法。

a) インターロイキン-1 (IL-1)

b) 顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)

c) -インターフェロン(-IFN)

d) IL-1タンパク質由来のアミノ酸であるVQGEESNDK、および

e) E.canisに対する改善された免疫原性反応を誘発する、上述のサイトカインのうちの任意の部分

【請求項39】 前記ワクチンが以下の群から選択される方法で前記宿主に注入されることを特徴とする請求項32に記載の方法。

a) 筋肉注射

b) 静脈注射

【請求項40】 前記宿主がイヌであることを特徴とする請求項39に記載の方法。

【請求項41】 以下の構成を含む、T細胞エピトープワクチンの生成方法。

a) T細胞エピトープが以下の群から選択されたタンパク質のペプチド断片を含むことを特徴とする、T細胞エピトープを含む組換えタンパク質の選択

i. 配列番号3で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

ii. 配列番号5で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

iii. 配列番号7の1~449で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

iv. 配列番号9で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

v. 配列番号11の1~31で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質

vi. 配列番号11の33~139で特定されるアミノ酸で示されるようなアミノ酸配列を有するタンパク質、および

vii. ポリペプチドが免疫反応を刺激するのに十分であることを特徴とする、上述のアミノ酸配列から少なくとも12アミノ酸数のポリペプチドをコード化する前記組換えDNAの任意の部分

b) 前記タンパク質からの前記T細胞エピトープの同定

c) 前記エピトープをタンパク質として発現することができる構築物内への前記T細胞エピトープの取り込み

d) 前記タンパク質の回収

【請求項42】 前記アミノ酸ペプチド断片が9~20のアミノ酸を含むことを特徴とする請求項41に記載の方法。

【請求項43】 前記エピトープを発現することができる前記構築物が、免疫系の細胞を含む真核生物の細胞内に内部移行することができるタンパク質をコード化する組換えDNAを含むことを特徴とする請求項41に記載の方法。

【請求項44】 真核生物の細胞内に内部移行することができる前記タンパク質が以下の群から選択されるトキシンを含むことを特徴とする請求項43に記載の方法。

a) 気管支敗血症菌 (*Bordetella bronchiseptica*) のアデニル酸シクラーゼの組換え体、および

b) 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) のエキソトキシンA(PE)組換え体

【請求項45】 前記ワクチンが前記ホストに以下の群から選択される方法で注入されることを特徴とする請求項41に記載の方法。

a) 筋肉注射、および

b) 静脈注射

【請求項46】 前記ホストがイヌであることを特徴とする請求項45に記載の方法。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/19763

| | | |
|---|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC 7 | C12N15/31 C07K14/29 C12N9/52 C12N9/02 A61K39/00 | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| IPC 7 C07K C12N A61K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, BIOSIS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WAGHELA S D ET AL.: "A cloned DNA probe identifies <i>Cowdria ruminantium</i> in <i>Amblyomma variegatum</i> ticks" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 29, no. 11, 1991, pages 2571-2577, XP000960522 ISSN: 0095-1137 the whole document -& DATABASE PIR2 [Online] EMBL, Heidelberg, Germany; I40883, 16 August 1996 (1996-08-16) XP002154411 abstract --- -/-- | 1-4,26, 32,35 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| * Special categories of cited documents : | | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | | *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| *E* earlier document but published on or after the international filing date | | *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | | *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. |
| *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | *&* document member of the same patent family |
| *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report | |
| 26 March 2001 | 06.04.01 | |
| Name and mailing address of the ISA | Authorized officer | |
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Oderwald, H | |

5

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International Application No PCT/US 00/19763 |
|---|

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>SPRINGER AMY L ET AL: "Characterization and nucleotide sequence of pqqE and pqqF in Methylobacterium extorquens AM1." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 178, no. 7, 1996, pages 2154-2157, XP000990643 ISSN: 0021-9193 the whole document -& DATABASE EMPRO2 [Online] EMBL Heidelberg, Germany; AC L43135, 24 January 1996 (1996-01-24) SPRINGER A L ET AL.: XP002163808 see PQQE protease (nucleotides 972-3.101) abstract</p> <p>---</p> | 1-4,26, 32,35 |
| X | <p>FREIBERG C ET AL: "MOLECULAR BASIS OF SYMBIOSIS BETWEEN RHIZOBIUM AND LEGUMES" NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, vol. 387, no. 6631, 22 May 1997 (1997-05-22), pages 394-401, XP002047854 ISSN: 0028-0836 the whole document -& DATABASE EMPRO2 [Online] EMBL Heidelberg, Germany; AC AE000103, 19 June 1997 (1997-06-19) FREIBERG C ET AL.: XP002163809 see y4wB gene (nucleotides 1.658-3.001) abstract</p> <p>---</p> | 1-4,26, 32,35 |
| X | <p>DATABASE EMPRO1 [Online] EMBL Heidelberg, Germany; AC D50453, 1 May 1997 (1997-05-01) YAMANE K ET AL.: "The 25 degrees region of the Bacillus subtilis chromosome: determination of the sequence of a 146 kb segment and identification of 113 genes" XP002163810 see ycnb gene (nucleotides 115.269-116.687) abstract & YAMANE K ET AL.: "Homologue of multidrug resistance protein B" MICROBIOLOGY, vol. 142, 1996, pages 3047-3056, ---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 1-4,26, 32,35 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International Application No PCT/US 00/19763 |
|---|

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | DATABASE EMPRO1 [Online] EMBL Heidelberg, Germany; AC: AJ235271, 21 November 1998 (1998-11-21) ANDERSSON S G E ET AL.: "The genome of sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria" XP002163811 see lipoprotein signal peptidase (nucleotides 217.100-217.740) abstract & ANDERSSON S G E ET AL.: NATURE, vol. 396, 1998, pages 133-140, --- | 1-4,26, 32,35 |
| X | WO 98 42743 A (MERIAL SAS) 1 October 1998 (1998-10-01) the whole document --- | 5 |
| A | | |
| X | WO 98 16554 A (UNIV FLORIDA) 23 April 1998 (1998-04-23) the whole document --- | 5 |
| A | | |
| X | WO 99 13720 A (UNIV OHIO) 25 March 1999 (1999-03-25) the whole document ----- | 5 |
| A | | |

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/19763**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

As a result of the prior review under R. 40.2(e) PCT,
no additional fees are to be refunded.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-46 partially

A recombinant DNA as in SEQ ID NO: 2 that encodes an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 3 (cytochrome oxidase homolog). A recombinant protein, a vaccine, methods of identifying a T cell epitope, methods of creating vaccines using said DNA and protein.

2. Claims: 1-46 partially

same as invention 1 but comprising SEQ ID NOs: 4 and 5 (ProA).

3. Claims: 1-46 partially

same as invention 1 but comprising SEQ ID NOs: 6 and 7 (ProB).

4. Claims: 1-46 partially

same as invention 1 but comprising SEQ ID NOs: 8 and 9 (ORF).

5. Claims: 1-46 partially

same as invention 1 but comprising SEQ ID NOs: 10 and 11 (lipoprotein signal peptidase homolog).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/19763

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9842743 A | 01-10-1998 | FR 2761158 A | 25-09-1998 |
| | | AU 7208698 A | 20-10-1998 |
| WO 9816554 A | 23-04-1998 | US 6025338 A | 15-02-2000 |
| | | AU 4913097 A | 11-05-1998 |
| | | ZA 9709320 A | 16-03-1999 |
| WO 9913720 A | 25-03-1999 | AU 9571998 A | 05-04-1999 |
| | | EP 1026949 A | 16-08-2000 |

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | Ehrlichia canis 基因和疫苗 | | |
| 公开(公告)号 | JP2003505087A | 公开(公告)日 | 2003-02-12 |
| 申请号 | JP2001512891 | 申请日 | 2000-07-20 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 康乃尔研究基金会有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 康奈尔大学研究基金会有限公司 | | |
| [标]发明人 | ユンフチャン | | |
| 发明人 | ユン-フ チャン | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 A61K38/00 A61K38/21 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/39 A61K48/00 A61P31/04 A61P37/04 C07K14/29 C07K14/47 C12N1/21 C12N9/02 C12N9/52 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 | | |
| CPC分类号 | C12N9/0053 A61K39/00 C07K14/29 C12N9/52 Y02A50/403 | | |
| FI分类号 | A61K39/02 A61K39/39 A61K48/00 A61P31/04.171 A61P37/04 C07K14/47 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 A61K37/66.G | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA20 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA41 4C084/BA44 4C084/DA13 4C084/DA19 4C084/DA24 4C084/DA33 4C084/DC22 4C084/MA02 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB09 4C084/ZB35 4C084/ZC61 4C085/AA03 4C085/AA05 4C085/AA38 4C085/BA15 4C085/BB11 4C085/CC04 4C085/CC07 4C085/CC21 4C085/CC24 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/FF02 4C085/FF12 4C085/FF14 4C085/GG02 4C085/GG03 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA74 | | |
| 优先权 | 09/358322 1999-07-21 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供了来自犬大肠杆菌的基因组的5,300个核苷酸序列。在该克隆片段中编码ProA, ProB, ORF和细胞色素氧化酶同源物的四种蛋白质,以及在羧基末端的部分脂蛋白信号肽同源物。这些蛋白质的抗原性使其可用于制备疫苗。本发明的例子包括制备DNA疫苗,重组疫苗和T细胞表位疫苗。

