

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-529605

(P2004-529605A)

(43) 公表日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7052	A 6 1 K 31/7052	4 B O 6 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 Q	4 C O 8 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 238 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-527249 (P2002-527249)	(71) 出願人	500116487 ヘスカ コーポレーション アメリカ合衆国 80525 コロラド州 フォート コリンズ プロスペクト パ ークウェイ 1613
(86) (22) 出願日	平成13年9月14日 (2001.9.14)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月13日 (2003.3.13)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/028730	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02002/022807	(72) 発明者	マッコール, キャサリン エイ. アメリカ合衆国 コロラド 80302, ボウルダー, プレザント ストリート 709
(87) 国際公開日	平成14年3月21日 (2002.3.21)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	09/662, 293		
(32) 優先日	平成12年9月14日 (2000.9.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 Dermatophagoides 核酸分子、タンパク質およびそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、高分子量の Dermatophagoides タンパク質、このようなタンパク質をコードする核酸分子、およびこのようなタンパク質から誘導される治療薬および診断薬に関する。本発明は、約 60 (kd もしくは kD)、70 kD、または約 98 kD ~ 約 109 kD の分子量を有する新規のタンパク質に関する。このようなタンパク質は、Dermatophagoides 族のダニのタンパク質アレルゲンの少なくとも 1 つのエピトープを含み、そして本明細書中で、Der HMW-map タンパク質と命名される。本発明はまた、全長タンパク質もしくは成熟タンパク質のフラグメントまたはペプチドであるタンパク質、ならびにこのようなタンパク質のいずれかの抗体、ミメトープ、またはムテインを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された核酸分子であって、以下：

(a) 少なくとも約 150ヌクレオチドを含む核酸分子であって、該核酸分子は、1×S
S C および 0%ホルムアミドを含む溶液中で、約 50 の温度で、配列番号 14、配列番
号 16、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 34、配
列番号 36、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 43
、配列番号 45 からなる群から選択される核酸配列、および配列番号 33 のアミノ酸配列
を含むタンパク質をコードする核酸配列およびそれらの相補体を含む核酸分子にハイブリ
ダイズする、少なくとも約 150ヌクレオチドを含む、核酸分子；ならびに

10

(b) (a) の核酸分子のいずれかのフラグメントを含む核酸分子であって、該フラグメ
ントは、少なくとも約 15ヌクレオチドを含む、核酸分子、
からなる群から選択される、核酸分子。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の核酸分子であって、前記核酸分子は、D e r H M W - m a p タンパク
質をコードする核酸配列を含む、核酸分子。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の核酸分子であって、前記核酸分子は、n D e r 9 8 _{1 7 5 2}、n D e r
f 9 8 _{1 6 6 5}、n D e r f 9 8 _{1 6 0 8}、n D e r p 9 8 _{1 6 2 1}、n D e r p 9 8 ₁
5 2 7、n D e r p 9 8 _{1 4 7 0} および n D e r f 6 0 _{5 1 0} からなる群から選択される
、核酸分子。

20

【請求項 4】

請求項 1 に記載の核酸分子であって、前記核酸分子は、以下：

(a) 配列番号 14、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 20、配列
番号 22、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 40、
配列番号 42、配列番号 43、配列番号 45 からなる群から選択される核酸配列を含む、
核酸分子；および

(b) (a) の核酸分子の対立遺伝子改変体を含む、核酸分子、
からなる群から選択される、核酸分子。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の核酸分子であって、前記核酸分子が、以下：

(a) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配
列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列
番号 13、配列番号 15、配列番号 18、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 24、
配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 3
5、配列番号 38、配列番号 41、および配列番号 44 からなる群から選択されるアミノ
酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列を含む、核酸分子；ならびに

(b) (a) のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸分子の対立遺伝子改変
体を含む、核酸分子、

からなる群から選択される、核酸分子。

30

40

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 に記載の核酸分子を含む、組換え分子。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 に記載の核酸分子を含む、組換えウイルス。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 に記載の核酸分子を含む、組換え細胞。

【請求項 9】

単離されたタンパク質であって、該単離されたタンパク質は、以下：

(a) 少なくとも約 150ヌクレオチドを含む核酸分子であって、該核酸分子は、1×S
S C および 0%ホルムアミドを含む溶液中で、約 50 の温度で、配列番号 16、配列番

50

号 19、配列番号 22、配列番号 36、配列番号 39、配列番号 42、配列番号 45 からなる群から選択される核酸配列、および配列番号 33 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列の相補体、を含む核酸分子にハイブリダイズする、少なくとも約 150ヌクレオチドを含む、核酸分子；ならびに

(b) (a) の核酸分子のいずれかのフラグメントを含む核酸分子であって、該フラグメントは、少なくとも約 15ヌクレオチドを含む、核酸分子、

からなる群から選択される核酸によってコードされる、単離されたタンパク質。

【請求項 10】

前記タンパク質が、動物に投与される場合、Der HMW-mapタンパク質に対して免疫応答を誘発する、請求項 9 に記載のタンパク質。

10

【請求項 11】

請求項 9 に記載のタンパク質であって、前記タンパク質が、以下：

(a) 配列番号 14、配列番号 17、配列番号 20、配列番号 34、配列番号 37、配列番号 40、配列番号 43 からなる群から選択される核酸配列、および配列番号 33 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列のコーディング鎖、を有する核酸分子によってコードされるタンパク質；および

(b) (a) の核酸分子のいずれかを含む核酸分子の対立遺伝子改変体を含む核酸分子によってコードされるタンパク質、

からなる群から選択される、タンパク質。

【請求項 12】

20

請求項 9 に記載のタンパク質であって、前記タンパク質が、以下：

(a) 配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 18、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 38、配列番号 41、および配列番号 44 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、タンパク質；ならびに

(b) (a) のアミノ酸配列のいずれかを含むタンパク質をコードする核酸分子の対立改変体によってコードされる、タンパク質、

からなる群から選択される、タンパク質。

30

【請求項 13】

請求項 9 に記載のタンパク質に選択的に結合する、単離された抗体。

【請求項 14】

前記タンパク質が、IgE に選択的に結合する、請求項 9 に記載のタンパク質。

【請求項 15】

請求項 9 に記載のタンパク質であって、前記タンパク質が、少なくとも 1 つの同定される特性を有するエピトープを含み、該特性が、以下：

(a) 該エピトープが、ペプチドの - 消失に耐性であり；

(b) 該エピトープが、プロテイナーゼ - K 消化に耐性であり；そして

(c) 該エピトープが、グリコシル化タンパク質を検出するために設計された試験に対して反応性である、特性からなる群から選択され、ここで、該エピトープが、IgE に結合し、該 IgE が、ダニに対してアレルギー性のイヌ由来のイヌ IgE およびダニに対してアレルギー性のネコ由来のネコ IgE からなる群から選択される、タンパク質。

40

【請求項 16】

ダニに対するアレルギー反応を処置するための治療組成物であって、該治療組成物が、以下：

(a) 請求項 9 ~ 12 に記載の単離されたタンパク質；

(b) 該ダニアレルギー性タンパク質のミメトープ；

(c) 該ダニアレルギー性タンパク質のムテイン；

(d) 請求項 1 ~ 5 に記載の単離された核酸分子；

50

(e) 該ダニアレルギー性タンパク質に対する抗体 ; および

(f) 該ダニアレルギー性タンパク質の I g E に対する結合のインヒビター、からなる群から選択される脱感作化合物を含む、治療組成物。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の組成物であって、前記組成物が、賦形剤、アジュバント、およびキャリアからなる群から選択される成分をさらに含む、組成物。

【請求項 18】

前記脱感作化合物が、裸の核酸分子である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 19】

動物がダニに対して感受性であるか、またはアレルギー反応を有するか否かを試験するためのアッセイキットであって、該キットは、以下 : 10

(a) 請求項 9 ~ 12 に記載の単離されたタンパク質 ; および

(b) 該動物が、感受性であるかまたはアレルギー反応を有するか否かを決定するための手段であって、該手段が、ダニに対して感受性であるか、またはアレルギー反応を有する動物を同定するための該タンパク質の使用を含む、手段、を備える、アッセイキット。

【請求項 20】

ダニに対して感受性であるか、またはアレルギー反応を有する動物を同定するための方法であって、該方法は、以下の工程 :

(a) 請求項 9 ~ 12 に記載の単離されたタンパク質と、動物の抗体とを接触させる工程 ; および 20

(b) 該タンパク質と該抗体との間の免疫複合体形成を決定する工程であって、該免疫複合体の形成は、該動物が、感受性であるかまたは該アレルギー反応を有することを示す、工程、を含む、方法。

【請求項 21】

ダニに対するアレルギー反応に対して、宿主動物を脱感作するための方法であって、該方法が、請求項 16 に記載の治療組成物を前記動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の方法であって、前記タンパク質が、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 18、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 38、配列番号 41、および配列番号 44 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、方法。 30

【請求項 23】

請求項 21 に記載の方法であって、前記治療組成物が、賦形剤、アジュバント、およびキャリアからなる群から選択される成分をさらに含む、方法。

【請求項 24】

ダニアレルギー性タンパク質を産生するための方法であって、該方法は、以下の工程 : 少なくとも約 150 ヌクレオチドを含む核酸分子であって、該核酸分子が、1 × S S C および 0 % ホルムアミドを含む溶液中で、約 50 の温度で、配列番号 16、配列番号 19、配列番号 22、配列番号 36、配列番号 39、配列番号 42、配列番号 45 からなる群から選択される核酸配列、および配列番号 33 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列の相補体 ; および該核酸分子のいずれかのフラグメントを含む核酸分子であって、該フラグメントが、少なくとも約 15 ヌクレオチドを含む核酸分子にハイブリダイズする、少なくとも約 150 ヌクレオチドを含む、核酸分子からなる群から選択される核酸分子で形質転換された細胞を培養する工程、を包含する、方法。 40

【請求項 25】

少なくとも 1 つの同定される特性を有する非タンパク質のエピトープを含む試薬であって、該特性が、以下 :

- (a) 該エピトープが、ペプチドの - 消失に対して耐性であり ;
- (b) 該エピトープが、プロテイナーゼ - K 消化に耐性であり ; そして
- (c) 該エピトープが、グリコシル化タンパク質を検出するために設計された試験に対して反応性である、特性から選択され、ここで、該エピトープが、I g E に結合し、該 I g E が、ダニに対してアレルギー性のイヌ由来のイヌ I g E およびダニに対してアレルギー性のネコ由来のネコ I g E からなる群から選択される、試薬。

【請求項 26】

請求項 25 に記載のエピトープに選択的に結合する、単離された抗体。

【請求項 27】

ダニに対するアレルギー反応を処置するための治療組成物であって、該治療組成物が、請求項 25 に記載の試薬を含む脱感作化合物を含む、治療組成物。 10

【請求項 28】

動物が、ダニに対して感受性であるか、またはアレルギー反応を有するか否かを試験するためのアッセイキットであって、該キットは、請求項 25 に記載の試薬と、該動物が感受性であるかまたはアレルギー反応を有するか否かを決定するための手段とを備え、該手段が、ダニに対して感受性であるか、またはアレルギー反応を有する動物を同定するための該試薬の使用を含む、アッセイキット。

【請求項 29】

ダニに対して感受性であるか、またはアレルギー反応を有する動物を同定するための方法であって、該方法は、以下 : 20

- (a) 請求項 25 の試薬と動物の抗体とを接触させる工程 ; および
- (b) 該試薬と該抗体の間の免疫複合体を決定する工程であって、該免疫複合体の形成は、該動物が、感受性であるかまたはアレルギー反応を有することを示す、工程、を包含する、方法。

【請求項 30】

ダニに対するアレルギー反応に対して宿主動物を脱感作するための方法であって、該方法が、請求項 25 の試薬を含む脱感作化合物を含む治療組成物を、該動物に投与する工程、を包含する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野) 30
本発明は、高分子量の *Dermatophagoides* タンパク質、核酸分子、およびこのようなタンパク質に由来する治療薬および診断薬に関する。

【0002】

(発明の背景)
アレルギー症状を媒介するイムノグロブリン E (I g E) は、多くの動物を苦しめる。動物における I g E 抗体産物は、例えば、アトピー性疾患、喘息および鼻炎を含む、病原性 I g E 応答を誘導し得る。アレルギーは、感受性のある個体において病原性 I g E 応答を誘導する能力により特徴付けされるタンパク質またはペプチドである。

【0003】

イエダニ (例えば、*Dermatophagoides farinae* および *Dermatophagoides pteronyssinus* ; それぞれ、*Der f* および *Der p*) アレルゲンは、I g E 媒介の病因に関連した主要な原因物質である。以前の研究者は、ヒトにおけるイエダニアレルギーの 2 つの大群 (第 I 群 (*Der f I* および *Der p I*、Mr 25, 000) ならびに第 2 群 (*Der f II* および *Der p II*、Mr 14, 000) ; Chapman ら、*Allergy*, 第 52 巻、37 - 379 頁、1997 年) を同定している。以前の研究者は、以下のものについてのヌクレオチド配列および / またはアミノ酸配列を開示している : *Der f I*、*Der f II*、*Der p I*、および *Der p II*、米国特許第 5, 552, 142 号 (Thomas ら、1996 年 9 月 3 日発行)、米国特許第 5, 460, 977 号 (Ando ら、1995 年 40 50

10月24日発行)、PCT特許出願公開番号WO95/28424(Chenら、1995年10月26日公開)、米国特許第5,433,948号(Thomasら、1995年7月18日発行)、PCT特許出願公開番号WO93/08279号(Garmenら、1993年3月4日発行)またはChapman、前出;DerpIII、PCT特許出願公開番号WO95/15976(Thomasら、1995年6月15日公開);DerpVII、PCT特許出願公開番号WO94/20614(Thomasら、1994年9月15日);40キロダルトン(kd)Derfアレルゲン、米国特許第5,405,758号(Okara、1995年4月11日)、米国特許第5,314,991号(Okara、1994年5月24日);熱ショックタンパク質(Hsp70)である70-kd Derfアレルゲン、Akira、J. Biochem., 第115巻、435-440、1994;またはNolira、Vet. Immunol. Immunopath., 第52巻、147-157頁、1996;ならびに98-kd Derfパラミオシン様アレルゲン、Tsaiら、J. Allergy Clin. Immunol., 第102巻、295-303頁、1998年。これらの公開された配列は、本発明のダニアレルギー核酸分子もタンパク質も、そしてまたイヌ血清、ネコ血清、またはヒト血清中のIgE抗体と免疫反応性であるこのようなタンパク質の関連性も、開示も示唆も予想もしていない。

10

【0004】

本発明の生成物およびプロセスは、ダニアレルギーの特異的検出および処置を提供する分野において必要とされる。

20

【0005】

(発明の要旨)

本発明は、約60(kdもしくはkD)70kDまたは約98kD~約109kDの分子量を有する新規のタンパク質に関する。このようなタンパク質は、Dermatophagoides属のダニのタンパク質アレルゲンの少なくとも1つのエピトープを含み、そして本明細書中でDerHMW-mapタンパク質と命名される。好ましいタンパク質は、Dermatophagoides farinaeまたはDermatophagoides pteronyssiusタンパク質である。本発明はまた、全長タンパク質もしくは成熟タンパク質のフラグメントまたはペプチドであるタンパク質、ならびにこのようなタンパク質の任意の抗体、ミメトープ、またはムテインを提供する。本発明はまた、このようなタンパク質のいずれかをコードする核酸分子、ならびにこれらの相補体を提供する。本発明はまた、このようなタンパク質、核酸分子、抗体、ミメトープ、またはムテインを得るための方法、ならびに診断用途または治療用途にこのような化合物を使用するための方法を提供する。本発明はまた、ダニアレルギー性のイヌまたはネコのIgEに結合する非タンパク質様エピトープを含む試薬、ならびにこのようなエピトープに対して惹起された抗体に関する。本発明はまた、このような非タンパク質様エピトープを含む治療組成物またはアッセイキット、ならびにダニに対するアレルギー性応答に感受性の動物を同定および/または脱感作する方法に関し、この方法は、本発明の非タンパク質様エピトープの使用を含む。

30

【0006】

本発明の1つの実施形態は、以下の単離された核酸分子の少なくとも1つである:(a)少なくとも約150ヌクレオチドを含む核酸分子(ここで、このような核酸分子は、1xSSCおよび0%ホルムアミドを含む溶液中、約50の温度にて、以下の核酸配列の少なくとも1つを含む核酸分子にハイブリダイズする):配列番号14、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号22、配列番号34、配列番号36、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号42、配列番号43、配列番号45、および配列番号33のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列、ならびにそれらの相補鎖;ならびに(b)(a)の核酸分子のいずれかのフラグメントを含む核酸分子(ここで、このフラグメントは、少なくとも約15ヌクレオチドを含む)。本発明はまた、このような核酸配列を含む組換え分子、組換えウイルスおよび組換え細胞、な

40

50

らびにこれらを産生する方法を含む。

【0007】

本発明の別の実施形態は、以下の核酸分子の少なくとも1つによってコードされる単離されたタンパク質である：(a)少なくとも約150ヌクレオチドを含む核酸分子(ここで、このような核酸分子は、1×SSCおよび0%ホルムアミドを含む溶液中、約50の温度にて、以下の核酸配列の少なくとも1つを含む核酸分子にハイブリダイズする)：配列番号16、配列番号19、配列番号22、配列番号36、配列番号39、配列番号42、配列番号45、および配列番号33のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列；ならびに(b)(a)の核酸分子のいずれかのフラグメントを含む核酸分子(ここで、このフラグメントは、少なくとも約15ヌクレオチドを含む)。本発明の単離されたタンパク質はまた、以下のアミノ酸配列の少なくとも1つを有するタンパク質をコードする核酸分子の相補体と、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする核酸分子によりコードされ得る：配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号18、配列番号21、配列番号23、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号38、配列番号41、および配列番号44。本発明はまた、本発明のタンパク質に選択的に結合する抗体、ならびにこのようなタンパク質または抗体を産生および使用する方法を含む。

10

【0008】

本発明はまた、ダニに対するアレルギー応答を処置するための治療組成物を含む。このような治療組成物は、少なくとも1つの以下の脱感作化合物を含む：(a)本発明の単離された核酸分子；(b)本発明の単離されたダニアレルギー性タンパク質；(c)このようなダニアレルギー性タンパク質のミメトープ；このようなダニアレルギー性タンパク質のムテイン；(e)このようなダニアレルギー性タンパク質に対する抗体；および(f)IgEに対するダニアレルギー性タンパク質の結合のインヒビター。ダニに対するアレルギー性応答に対して、宿主動物を脱感作する方法もまた含まれる。このような方法は、本発明の治療組成物を動物に投与する行程を包含する。

20

【0009】

本発明の1つの実施形態は、ある動物が、ダニに対するアレルギー性応答に感受性であるか否か、またはこの応答を有するか否かを試験するアッセイキットである。このようなキットは、本発明の単離されたタンパク質、ならびにこの動物が、このアレルギー性応答に感受性であるか否か、またはこの応答を有するか否かを決定するための手段を含む。このような手段は、ダニに対するアレルギー性応答に感受性であるか、またはこの応答を有する動物を同定するための、このようなタンパク質の使用を含む。本発明はまた、ダニに対するアレルギー性応答に感受性であるか、またはこの応答を有する動物を同定する方法を含む。このような方法は、以下の行程を包含する：(a)本発明の単離されたタンパク質を動物の抗体と接触させる行程；および(b)タンパク質と抗体との間の免疫複合体形成を決定する行程(ここで、この免疫複合体の形成は、この動物がダニに対するアレルギー性応答に感受性であるか、またはこの応答を有することを示す)。

30

40

【0010】

本発明は、以下の同定された特性の少なくとも1つを有する非タンパク質様エピトープを含む試薬を含む：(a)エピトープが、ペプチドの脱離に耐性である；(b)エピトープがプロテインキナーゼK消化に耐性である；および(c)エピトープがグリコシル化タンパク質を検出するために設計された試験に反応性である。このようなエピトープは、以下の抗体の少なくとも1つに結合する：ダニに対してアレルギー性のイヌ由来のイヌIgE、およびダニに対してアレルギー性のネコ由来のネコIgE。このような非タンパク質様エピトープおよびこのようなエピトープの誘導体を選択的に結合する単離された抗体もまた含まれる。

【0011】

50

本発明はまた、本発明の非タンパク質様エピトープを含む治療組成物およびアッセイキット、ならびにダニに対するアレルギー応答に感受性の動物を同定および/または脱感作する方法に関し、この方法は、本発明の非タンパク質様エピトープの使用を包含する。

【0012】

(発明の詳細な説明)

本発明は、約60キロダルトン(kD)~約109キロダルトンの範囲の分子量を有する単離されたタンパク質を提供し、これは、*Dermatophagoides*属のダニ(特に、*Dermatophagoides farinae*種および/または*Dermatophagoides pteronyssius*種のダニ)のタンパク質アレルゲンのエピトープの少なくとも1つを含む。このようなタンパク質は、本明細書中でDer HMW-mapタンパク質と呼ばれる。本発明は、さらに、Der HMW-mapタンパク質をコードする核酸分子、Der HMW-mapタンパク質に対する抗体、およびDer HMW-mapタンパク質活性のインヒビターを、単離および同定する方法を含む。本明細書中で用いられる場合、用語「単離されたDer HMW-mapタンパク質」とは、*Dermatophagoides*、さらに好ましくは、*Dermatophagoides farinae*および/または*Dermatophagoides pteronyssius*(これら自体は、その天然の供給源に由来するか、または、例えば、組換え核酸技術または化学合成を用いて産生される)由来のDer HMW-mapタンパク質をいう。本発明には、Der HMW-mapタンパク質に特異的に結合する免疫グロブリンを検出するための方法、ダニアレルゲンに対する病因を処置するための方法、および以下に開示されるような他の適用における、このタンパク質および抗体の使用もまた含まれる。本発明の産物およびプロセスは都合がよい。なぜならば、これらは、動物の体液における抗Der HMW-map抗体の検出、およびIgEまたは疾患に關与するDer HMW-mapタンパク質活性の阻害を可能にするからである。

10

20

【0013】

本発明の1つの実施形態は、以下を含む単離された*Dermatophagoides*アレルギー性組成物である：(a)以下を包含する方法により産生される組成物：(1)ゲルろ過カラムに*Dermatophagoides*抽出物の可溶性タンパク質を適用する行程；(2)ゲルろ過カラムから排除されたタンパク質を収集し、そしてこの排除されたタンパク質をアニオン交換カラムに適用する行程；および(3)約0.3M Tris-HCl(pH8)を有するアニオン交換カラムに結合したタンパク質を溶出して、*Dermatophagoides*アレルギー性組成物を得る行程；および(b)行程(a)に関して産生されたタンパク質のペプチドを含む組成物(ここで、このアレルギー性組成物は、IgEに結合すること、Bリンパ球応答を刺激すること、およびTリンパ球応答を刺激することを含む、生物学的機能を可能にする)。このような*Dermatophagoides*アレルギー性組成物はまた、本明細書中でDer HMW-map組成物ともいわれる。適切なゲルろ過カラムとしては、約50kDと約150kDの間の分子量を有するタンパク質を排除し得る任意のゲルろ過カラムが挙げられる。好ましいゲルろ過カラムとしては、Sephacryl S-100カラムが挙げられるが、これに限定されない。適切なアニオン交換カラムとしては、約pI6未満のpIを有するタンパク質に結合し得る任意のアニオン交換カラムが挙げられる。好ましいアニオン交換カラムとしては、Q-Sepharoseカラムが挙げられるが、これに限定されない。本明細書中で用いられる場合、「Bリンパ球応答を刺激する」とは、動物において本発明のDer HMW-mapにより優先的に誘導され、そしてBリンパ球の活性を伴う、動物における体液性免疫応答の増加をいう。本明細書中で用いられる場合、「Tリンパ球応答を刺激する」とは、動物において本発明のDer HMW-mapにより優先的に誘導され、そしてTリンパ球の活性を伴う、動物における体液性免疫応答の増加をいう。

30

40

【0014】

本発明の1つの実施形態は、Der HMW-mapタンパク質を含む単離されたタンパク質である。用語(ある)(「a」または「an」)実体とは、1つ以上の実体をいうこ

50

とについて特に言及する。例えば、(ある)タンパク質、(ある)核酸分子、(ある)抗体、(ある)インヒビター、(ある)化合物、または(ある)治療組成物とは、それぞれ、「1つ以上」または「少なくとも1つ」のタンパク質、「1つ以上」または「少なくとも1つ」の核酸分子、「1つ以上」または「少なくとも1つ」の抗体、「1つ以上」または「少なくとも1つ」のインヒビター、「1つ以上」または「少なくとも1つ」の化合物、あるいは「1つ以上」または「少なくとも1つ」の治療組成物をいう。それ自体では、用語「ある(「a」(または「an」))」、「1つ以上」、および「少なくとも1つ」とは、本明細書中で交換可能に用いられ得る。用語「含む」、「含有する」、および「有する」とは、交換可能に用いられ得ることについて特に言及する。本発明に従って、単離されたタンパク質、または生物学的に純粋なタンパク質は、その天然の環境から取り出されているタンパク質である。これ自体では、「単離された」および「生物学的に純粋な」とは、タンパク質が精製されている程度を反映する必要はない。本発明の単離されたタンパク質は、その天然の供給源から得られ得るか、組換えDNA技術を用いて生成され得るか、または化学合成により生成され得る。

10

20

30

40

50

【0015】

本明細書中で用いられる場合、Der HMW-mapタンパク質は、全長タンパク質、またはこのようなタンパク質の任意のホモログであり得る。本明細書中で用いられる場合、タンパク質とは、ポリペプチドまたはペプチドであり得る(これらの用語が、当業者に用いられる)。好ましくは、Der HMW-mapタンパク質は、Der HMW-mapタンパク質に対するIgE媒介性の病因を示す動物由来の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子の存在下で、IgE抗体により認識される(すなわち、本発明のタンパク質がIgE抗体に結合する)、Bリンパ球の表面上の抗体により認識される、そして/あるいはT細胞レセプターにより認識されるエピトープの少なくとも1つを含む、Der HMW-mapタンパク質の少なくとも一部を含む。

【0016】

本発明のペプチドは、IgEに結合し得る、ダニアレルギーに対して動物を脱感作し得る、Bリンパ球応答を刺激し得る、そして/あるいはTリンパ球応答を刺激し得る、本発明のDer HMW-mapタンパク質を含む。好ましくは、本発明のペプチドは、Bリンパ球エピトープ、またはTリンパ球エピトープを含む。Bリンパ球エピトープを有するペプチドは、抗体に結合し得る。Tリンパ球エピトープを有するペプチドは、ペプチドがT細胞レセプターを介してTリンパ球を刺激し得るような様式でMHC分子に結合し得る。本発明に従って、Bリンパ球エピトープを含むペプチドは、約4残基~約50残基の長さ、好ましくは、約5残基~約20残基の長さであり得る。本発明に従って、Tリンパ球エピトープを含むペプチドは、約4残基~約20残基の長さ、好ましくは、約8残基~約16残基の長さであり得る。

【0017】

本発明のDer HMW-mapタンパク質(ホモログを含む)は、Der HMW-mapタンパク質に対するアレルギー性応答を誘導し得るタンパク質の能力により、単純な方法で同定され得る。Der HMW-mapタンパク質ホモログの例としては、Der HMW-mapタンパク質が挙げられ、ここで、アミノ酸は、欠失(例えば、ペプチドのようなタンパク質の短縮型バージョン)、挿入、転換、置換、および/または誘導體化(例えば、グリコシル化、ホスホリル化、アセチル化、ミリスチル化、プレニル化、パルミトイル化、アミド化、および/またはグリセロホスファチジルイノシトールの付加による)されており、その結果、ホモログは、天然のDer HMW-mapタンパク質に対するアレルギー応答を誘導し得る。

【0018】

Der HMW-mapタンパク質ホモログは、天然の対立遺伝子改変または天然の変異の結果であり得る。本発明のDer HMW-mapタンパク質ホモログはまた、タンパク質に対する直接的改変、あるいは例えば、無作為変異もしくは標的化された変異をもたらす、古典的核酸技術もしくは組換え核酸技術を用いる、タンパク質をコードする遺伝子

に対する改変を含むが、これらに限定されない、当該分野で公知の技術を用いて産生され得る。

【0019】

本発明の1つの実施形態は、Der HMW-map遺伝子であり、これは、配列番号14、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号22、配列番号34、配列番号36、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号42、配列番号43、および配列番号45の核酸配列、ならびにこれらの核酸配列のいずれかの相補体を含む。これらの核酸配列は、本明細書中でさらに記載される。例えば、核酸配列(配列番号14)は、Der HMW-map遺伝子の核酸分子nDerf98₁₇₅₂(この生成は実施例に開示される)として、本明細書中で示されるcDNA(相補的DNA)のコード鎖の縮重配列を示す。核酸分子nDerf98₁₇₅₂は、明らかに全長コード領域を含む。配列番号14の相補体(配列番号16により本明細書中で示される)は、配列番号14を有する鎖に相補的な鎖の核酸配列をいい、これは当業者により簡単に決定され得る。同様に、本発明の任意の核酸配列の核酸配列相補体とは、配列が引用される鎖に相補的である(すなわち、この鎖と二重鎖を形成し得る)核酸鎖の核酸配列をいう。核酸配列決定技術は全体として誤りをなくせないので、配列番号14(ならびに本明細書中で示される他の核酸配列およびタンパク質配列)は、本発明のDer HMW-mapタンパク質をコードする核酸分子の明確な核酸配列を示すことに注目すべきである。

10

【0020】

別の実施形態では、Der HMW-map遺伝子、または核酸分子は、配列番号14または配列番号16に類似するが同一ではない対立遺伝子改変体、あるいは本明細書中で引用される任意の他のDer HMW-map核酸配列であり得る。例えば、配列番号14または配列番号16を含むDer HMW-map遺伝子の対立遺伝子改変体は、配列番号14および配列番号16を含む遺伝子と、本質的に同じゲノムの遺伝子座(単数および複数)で生じる遺伝子であるが、これらは、例えば、変異または組換えにより生じる天然のバリエーションに起因して、類似するが同一ではない配列を有する。天然の選択は、代表的に、機能に影響する変異に対する選択であるので、対立遺伝子改変体(すなわち、引用される核酸配列に対応するか、または引用される核酸配列の対立遺伝子)は、通常、比較される遺伝子によりコードされるタンパク質の活性に類似する活性を有するタンパク質をコードする。遺伝子または核酸分子の対立遺伝子改変体はまた、(例えば、コントロール領域を調節する際に)遺伝子の5'または3'の非翻訳領域の変化を含み得るか、初期翻訳物の選択的スプライシングを伴って、それにより交互にエキソンを並列にし得る。対立遺伝子改変体は、当業者に周知であり、そして所定のチリダニ(例えば、Dermatophagoides)内で天然に存在することが予測される。なぜならば、代表的ゲノムは、二倍体であり、そして有性生殖は、対立遺伝子の再分類を生じるからである。

20

30

【0021】

本発明の1つの実施形態では、単離されたDer HMW-mapタンパク質は、Der HMW-mapタンパク質をコードする遺伝子にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする核酸分子によりコードされる。本発明のDer HMW-mapタンパク質の最小のサイズは、対応する天然のタンパク質をコードする核酸分子の相補的配列と、安定なハイブリッドを形成し得る(すなわち、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする)核酸分子によりコードされるのに十分なサイズである。このようなタンパク質をコードする核酸分子のサイズは、核酸の組成、およびDer HMW-map核酸分子と相補的核酸配列との間の%相同性に依存する。ストリンジェントな条件下で安定なハイブリッドを形成するために必要とされる相同性の範囲は、相同配列が所定の核酸分子の全体を通じて散在するか、または所定の核酸分子の別個の領域にクラスター化する(すなわち、局在化する)かに依存して変化し得ることが容易に理解される。

40

【0022】

Der HMW-mapタンパク質をコードする遺伝子と安定なハイブリッドを形成し得

50

る核酸分子の最小のサイズは、この核酸分子がGCリッチである場合、代表的には、少なくとも約12ヌクレオチド～約15ヌクレオチドの長さであり、そしてこれがATリッチである場合、少なくとも約15ヌクレオチド～約17塩基の長さである。本発明のDer HMW-mapタンパク質ホモログをコードするために用いられる核酸分子の最小のサイズは、約12ヌクレオチド～約18ヌクレオチドの長さ、好ましくは、約12ヌクレオチドの長さ、約15ヌクレオチドの長さ、または約18ヌクレオチドの長さである。従って、本発明のDer HMW-mapタンパク質ホモログの最小の長さは、約4～約6アミノ酸の長さである。本発明のDer HMW-mapタンパク質をコードする核酸分子の最小サイズに対して、特定の制限以外の制限はない。なぜならば、本発明の核酸分子は、ある遺伝子、遺伝子全体、または複数の遺伝子の一部を含み得るからである。本発明の核酸分子によりコードされるタンパク質の好ましいサイズは、このようなタンパク質の全長タンパク質、融合タンパク質、多価タンパク質、または機能的タンパク質のいずれが所望されるかに依存する。好ましくは、本発明の核酸分子によりコードされるタンパク質の好ましいサイズは、免疫応答を誘導するタンパク質の一部であり、これは、約30アミノ酸、より好ましくは、約35アミノ酸、そしてさらにより好ましくは、約44アミノ酸の長さである。

10

【0023】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、核酸分子がハイブリダイズし、そして数学的に規定され得る、遺伝子の規定された物理学的特性に基づいて決定される。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、当業者が非相同的な核酸分子間の優位な類似性を同定することを可能にする、実験パラメーターである。これらの条件は、当業者に周知である。例えば、Sambrookら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab Press、およびMeinkothら、1984、Anal. Biochem. 138, 267-284を参照のこと。参考文献に詳細に説明されるように、ハイブリダイゼーション条件の決定は、イオン強度(M(モル/リットル))、ハイブリダイゼーション温度()、核酸らせん不安定化剤(例えば、ホルムアミド)の濃度、最も短いハイブリッド二重鎖の平均の長さ(n)、および未知の核酸分子がハイブリダイズするフラグメントのG+C組成のパーセントを含む一組の変数の操作を伴う。少なくとも約150ヌクレオチドの核酸分子について、これらの変数は、標準的な数式に代入されて、所定の核酸分子の融解温度(すなわち T_m)を計算する。以下の式に規定されるように、 T_m は、2つの鎖の間が100%相補性であるとみなされている、2つの相補的核酸分子鎖が解離する温度である：

20

30

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log M + 0.41(G + C \text{ の } \%) - 500 / n - 0.61 \text{ (ホルムアミドの } \%)$$

約50ヌクレオチドよりも小さい核酸分子について、ハイブリッド安定性は、解離温度(T_d) (50%の二重鎖が解離する温度として規定される)により規定される。これらのより小さな分子について、標準的なイオン強度での安定性は、以下の式により定義される：

$$T_d = 4(G + C) + 2(A + T)$$

【0024】

T_d より5低い温度が、完全に一致した分子間のハイブリダイゼーションを決定するために用いられる。

40

【0025】

また、どれくらいの塩基対のミスマッチ(すなわち、比較される2つの核酸分子間の差異)が所定の位置の塩基の非相補性を含み、そしてギャップが、比較される核酸分子のいずれかの所定の位置での1つ以上の塩基の挿入または欠失に起因して、異なるサイズの核酸分子に関する T_m または T_d に影響するかも当業者に周知である。例えば、 T_m は、約150bpよりも大きいハイブリッドに関して、1%のミスマッチの塩基対の各々について約1低下し、そして T_d は、約50bpよりも小さいハイブリッドに関して、ミスマッチの塩基対の各々について約5低下する。約50～約150塩基対の間のハイブリッド

50

の条件は、経験的にかつ過度な実験なしに、当業者に周知の標準的な実験手順を用いて決定され得る。これらの単純な手順は、当業者に、特定の塩基対ミスマッチ%未滿を有する核酸ハイブリッドのみがハイブリダイズするような、(例えば、塩濃度、ホルムアミド濃度、または温度を変化させることによる)ハイブリダイゼーション条件の設定を可能にさせる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、約30%未滿の塩基対ミスマッチ(すなわち、約70%以上の同一性)を有する分子間のハイブリダイゼーションを可能にさせる実験条件であることが、当業者により一般に理解される。当業者は、試験される所定の核酸分子が、約50ヌクレオチド未滿であるか、または約50ヌクレオチドを越えるかを容易に決定し得、従って、ハイブリダイゼーション条件を決定するための適切な式を選択し得るので、当業者は、核酸分子が、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で所定の遺伝子とハイブリダイズするか否か、そして、同様に、核酸分子が、所望の量の塩基対ミスマッチを可能にするように設計された条件下でハイブリダイズするか否かを決定し得る。

10

20

30

40

50

【0026】

ハイブリダイゼーション反応はしばしば、ハイブリダイズされるべき核酸分子を、膜のような固体支持体に付着させる工程、次いで、ハイブリダイゼーション溶液中に懸濁された標識核酸分子(代表的に、プローブと称される)とハイブリダイズさせる工程によって実施される。一般的なハイブリダイゼーション反応技術の例としては、周知のサザンブロッティング手順およびノーザンブロッティング手順が挙げられるが、これらに限定されない。代表的には、実際のハイブリダイゼーション反応は、ストリンジェントではない条件(すなわち、より低い温度および/またはより高い塩濃度)でなされ、次いで、高ストリンジェンシーを、所望のストリンジェンシーを達成するためにより高い温度および/またはより低い塩濃度の溶液中でこの膜を洗浄することによって達成する。

【0027】

例えば、当業者が、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、*Dermatophagoides farinae*および/または*Dermatophagoides pteronyssius*の約150bp長の核酸分子とハイブリダイズする核酸分子を同定することを望む場合、以下の条件が好ましくは使用され得る。*Dermatophagoides farinae*および*Dermatophagoides pteronyssius*のDNAの平均G+C含量は、約39%である。未知の核酸分子が支持体膜に付着され、そしてこの150bpのプローブが標識される(例えば、放射性タグを用いて)。ハイブリダイゼーション反応は、2×SSCおよび0%ホルムアミドを含む溶液中において約37の温度(低ストリンジェンシー条件)で実施され得る。異なる濃度のSSCの溶液は、所望される濃度のSSCを得るように20×SSC(1リットルの水中において、175.3gのNaClおよび約88.2gのクエン酸ナトリウム(pH7))のストック溶液を希釈することによって、当業者により作製され得る。高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションを達成するために、当業者は、30%までの塩基対ミスマッチを許容するために必要とされる洗浄条件を算出する。例えば、1×SSCおよび0%ホルムアミドを含む洗浄溶液中において、完全なハイブリッドの T_m は約80である：

$$81.5 + 16.6 \log(0.15M) + (0.41 \times 39) - (500/150) - (0.61 \times 0) = 80.4$$

従って、約30%の塩基対ミスマッチを有する核酸分子とのハイブリダイゼーションを達成するために、ハイブリダイゼーションの洗浄を、約50の温度で実施する。従って、本明細書中に開示される所望される%塩基対ミスマッチ、式およびG/C含量に基づいて、さらなるハイブリダイゼーション温度を算出することは当業者の技術の範囲内である。例えば、本明細書中において特定される配列を有する本発明の核酸分子に対するハイブリダイゼーションについて試験されるべき核酸分子は150ヌクレオチドよりも長いので、30%までの塩基対ミスマッチを許容するハイブリダイゼーション反応のための T_m は、50から有意に変動しないことが当業者に理解される。

【0028】

さらに、2つの核酸配列間の類似性程度を決定するための市販のコンピュータプログラムが存在することが当該分野で公知である。これらのコンピュータプログラムは、ハイブリッド核酸分子間の%同一性ならびにギャップの数および長さを決定するための種々の公知の方法を含む。アミノ酸配列間およびまた核酸配列間の%同一性を決定するための好ましい方法は、核酸配列またはアミノ酸配列を比較および分析するために設計された市販の1つ以上のコンピュータプログラムを使用する分析を含む。これらのコンピュータプログラムは、以下を含むが、これらに限定されない：GCG^{T M} (Genetics Computer Group, Madison, WIから入手可能)、DNAsis^{T M} (Hitachi Software, San Bruno, CAから入手可能)およびMacVector^{T M} (Eastman Kodak Company, New Haven, CTから入手可能)。アミノ酸配列間およびまた核酸配列間の%同一性を決定するための好ましい方法は、プログラムDNAsisバージョン2.1における最大マッチによる比較機能(Compare function by maximum matching)をデフォルトパラメーターで用いる使用を含む。

10

【0029】

本発明の1つの実施形態は、Der HMW-mapタンパク質を含む。1つの実施形態では、本発明のDer HMW-mapタンパク質は、還元型12%TrisグリシンSDS-PAGEに提示された場合に、図1に示されるように、約98kD~約109kDの分子量のバンドとして移動するタンパク質を含む。図1におけるこのバンドは、タンパク質を、実施例1に詳細に記載された方法を使用してDermataphagoidea farinaeダニから収集する場合に得られる。好ましくは、本発明のDer HMW-mapタンパク質は、約90kD~約120kD、そしてより好ましくは、約98kD~約109kDの範囲の分子量を有するタンパク質を含む。本発明の好ましいDer HMW-mapタンパク質は、mapAおよびmapBを含む。この同定を、実施例の節に記載する。

20

【0030】

別の実施形態では、本発明のDer HMW-mapタンパク質は、還元型14%TrisグリシンSDS-PAGEに提示された場合に、図2に示されるように、約60kDの分子量のバンドとして移動するタンパク質を含む。図2におけるこのバンドは、タンパク質を、実施例9に詳細に記載された方法を使用してDermataphagoidea farinaeダニから収集する場合に得られる。好ましくは、本発明のDer HMW-mapタンパク質は、約60kDの分子量を有するタンパク質を含む。本発明の好ましいDer HMW-mapタンパク質は、mapDを含む。この同定を、実施例の節に記載する。

30

【0031】

別の実施形態では、好ましいDer HMW-mapタンパク質は、少なくとも約50ヌクレオチドであるかまたは約150ヌクレオチドであり、かつ、好ましくは約40%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下、より好ましくは約35%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下、より好ましくは約30%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下、より好ましくは約25%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下、より好ましくは約20%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下、より好ましくは約15%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下、より好ましくは約10%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下、そしてさらにより好ましくは約5%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下において、配列番号16、配列番号19、配列番号22、配列番号36、配列番号39、配列番号42、配列番号45、および配列番号33のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列、それらの相補体からなる群より選択される核酸分子とハイブリダイズする核酸分子によってコードされるタンパク質を含む。

40

【0032】

本発明の別の実施形態は、以下からなる群より選択される核酸分子によってコードされる

50

Der HMW-mapタンパク質を含む：少なくとも約150ヌクレオチドを含む核酸分子であって、ここで、少なくとも約150ヌクレオチドを含むこの核酸分子は、1×SSCおよび0%ホルムアミドを含む溶液中において約50の温度で、配列番号16、配列番号19、配列番号22、配列番号36、配列番号39、配列番号42、配列番号45、および配列番号33のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列の相補体、ならびに少なくとも約15ヌクレオチドを含む上記の任意の核酸分子のフラグメントを含む核酸分子からなる群より選択される核酸配列に対してハイブリダイズする。

【0033】

本発明のさらに別の好ましいDer HMW-mapタンパク質は、配列番号14、配列番号17、配列番号20、配列番号34、配列番号37、配列番号40、配列番号43および/または配列番号33のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列の相補体の核酸配列を有する核酸分子に対して、好ましくは少なくとも約60%同一、より好ましくは少なくとも約65%同一、より好ましくは少なくとも約70%同一、より好ましくは少なくとも約75%同一、より好ましくは少なくとも約80%同一、より好ましくは少なくとも約85%同一、より好ましくは少なくとも約90%同一、そしてさらにより好ましくは少なくとも約95%同一である核酸分子によってコードされるタンパク質を含む。このようなタンパク質のフラグメントもまた好ましい。本明細書中で使用される場合の%同一性は、プログラムDNAsisバージョン2.1における最大マッチによる比較機能(Compare function by maximum matching)をデフォルトパラメーターで用いて使用することにより決定される。

【0034】

本発明のさらなる好ましいDer HMW-mapタンパク質としては、以下が挙げられる：配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号18、配列番号21、配列番号23、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号38、配列番号41、配列番号44のアミノ酸配列を有するタンパク質、および配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号18、配列番号21、配列番号23、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号38、配列番号41、配列番号44のアミノ酸配列を有するタンパク質のホモログを含むタンパク質であって、ここでこのようなホモログは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号18、配列番号21、配列番号23、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号38、配列番号41、配列番号44のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する免疫応答を誘発する少なくとも1つのエピトープを含む、タンパク質。同様に、配列番号14、配列番号17、配列番号20、配列番号34、配列番号37、配列番号40、配列番号43の核酸配列および/または配列番号33のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列、あるいはそれらのホモログによってコードされる核酸分子によってコードされるタンパク質もまた好ましい。

【0035】

本発明の好ましい単離されたタンパク質は、以下の核酸分子のなかの少なくとも1つによりコードされるタンパク質である：nDerf98₁₇₅₂、nDerf98₁₆₆₅、nDerf98₁₆₀₈、nDerp98₁₆₂₁、nDerp98₁₅₂₇、nDerp98₁₄₇₀、nDerf60₅₁₀、またはこれらの任意の核酸分子の対立遺伝子改変体。別の好ましい単離されたタンパク質は、配列番号14、配列番号17、配列番号20、配列番号34、配列番号37、配列番号40、配列番号43の核酸配列を有する核酸

10

20

30

40

50

分子によってコードされるか、またはこれらの列挙された任意の核酸分子の対立遺伝子改変体によってコードされるタンパク質である。

【0036】

配列番号14 (nDerf98₁₇₅₂のコード鎖)の翻訳により、本明細書中でPDerf98₅₅₅と称される約555アミノ酸のタンパク質が生じ、このアミノ酸配列は配列番号15に提示され、最初のインフレームコドンは、配列番号14のヌクレオチド1~ヌクレオチド3にわたると考えられる。配列番号14の相補鎖を、本明細書中では配列番号16として提示する。PDerf98₅₅₅のアミノ酸配列は、nDerf98₁₆₆₅の核酸分子によってコードされ、この核酸分子は、配列番号17に示されるコード鎖および配列番号19に示される相補鎖を有する。配列番号15の分析は、ほぼアミノ酸1~ほぼアミノ酸19に及ぶシグナルペプチドの存在を示唆している。本明細書中でPDerf98₅₃₆と称される提案された成熟タンパク質は、約536アミノ酸を含む。この配列は、本明細書中で配列番号21として表され、そして配列番号20(コード鎖)および配列番号22(相補鎖)により表される、本明細書中でnDerf98₁₆₀₈と称される核酸分子によってコードされる。

10

【0037】

配列番号34 (nDerp98₁₆₂₁のコード鎖)の翻訳により、本明細書中でPDerp98₅₀₉と称される約509アミノ酸のタンパク質が生じ、このアミノ酸配列は配列番号35に提示され、最初のインフレームコドンは、配列番号34のヌクレオチド14~ヌクレオチド16にわたると考えられる。配列番号34の相補鎖を、本明細書中では配列番号36として提示する。PDerp98₅₀₉のアミノ酸配列は、nDerp98₁₅₂₇の核酸分子によってコードされ、この核酸分子は、配列番号37に示されるコード鎖および配列番号39に示される相補鎖を有する。配列番号35の分析は、ほぼアミノ酸1~ほぼアミノ酸19に及ぶシグナルペプチドの存在を示唆している。本明細書中でPDerp98₄₉₀と称される提案された成熟タンパク質は、約490アミノ酸を含む。この配列は、本明細書中で配列番号41として表され、そして配列番号40(コード鎖)および配列番号42(相補鎖)により表される、本明細書中でnDerp98₁₄₇₀と称される核酸分子によってコードされる。

20

【0038】

D.farinae 60-kD抗原タンパク質の部分をコードする核酸分子である、配列番号43 (nDerf60₅₁₀のコード鎖)の翻訳により、本明細書中でPDerf60₁₇₀と称される約170アミノ酸のタンパク質が生じ、このアミノ酸配列は、配列番号44として提示され、最初のインフレームコドンは、配列番号43のヌクレオチド1~ヌクレオチド3にわたると考えられる。配列番号43に対する相補配列は、本明細書中で配列番号45として表される。

30

【0039】

本発明の好ましいDer HMW-mapタンパク質は、PDerf98₅₅₅と、少なくとも約45%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約55%、さらにより好ましくは少なくとも約60%、さらにより好ましくは少なくとも約65%、さらにより好ましくは少なくとも約70%、さらにより好ましくは少なくとも約75%、さらにより好ましくは少なくとも約80%、さらにより好ましくは少なくとも約85%、さらにより好ましくは少なくとも約90%、そしてさらにより好ましくは約95%同一であるタンパク質を含む。より好ましいのは、PDerf98₅₅₅、PDerf98₅₃₆、PDerp98₅₀₉、PDerp98₄₉₀、および/またはPDerf60₁₇₀を含むDer HMW-mapタンパク質; ならびにPDerf98₅₅₅、PDerf98₅₃₆、PDerp98₅₀₉、PDerp98₄₉₀、および/またはPDerf60₁₇₀のタンパク質をコードする核酸分子の対立遺伝子改変体によってコードされるタンパク質である。

40

【0040】

本発明の他の好ましいDer HMW-mapタンパク質は、配列番号1、配列番号2、

50

配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 18、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 38、配列番号 41、および/または配列番号 44 のアミノ酸配列と、少なくとも約 45%、好ましくは少なくとも約 50%、より好ましくは少なくとも約 55%、さらにより好ましくは少なくとも約 60%、さらにより好ましくは少なくとも約 65%、さらにより好ましくは少なくとも約 70%、さらにより好ましくは少なくとも約 75%、さらにより好ましくは少なくとも約 80%、さらにより好ましくは少なくとも約 85%、さらにより好ましくは少なくとも約 90%、そしてさらにより好ましくは約 95% 同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質を含む。より好ましいのは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 18、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 38、配列番号 41、および/または配列番号 44 のアミノ酸配列を含む Der HMW-map タンパク質；ならびに配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 18、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 38、配列番号 41、および/または配列番号 44 のアミノ酸配列を有する Der HMW-map タンパク質をコードする核酸分子の対立遺伝子改変体によってコードされる Der HMW-map タンパク質である。

【0041】

本発明の 1 つの実施形態では、Der HMW-map タンパク質は、配列番号 15、配列番号 35、および/または配列番号 44 のアミノ酸を含み（配列番号 15、配列番号 35、および/または配列番号 44 のアミノ酸配列からなるタンパク質、それらのフラグメント、融合タンパク質、および多価タンパク質を含むが、これらに限定されない）、そして配列番号 15、配列番号 35、および/または配列番号 44 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸分子の対立遺伝子改変体によってコードされるタンパク質を含む。

【0042】

1 つの実施形態では、好ましい Der HMW-map タンパク質は、少なくとも約 35 アミノ酸長、好ましくは少なくとも約 50 アミノ酸長、より好ましくは少なくとも約 100 アミノ酸長、より好ましくは少なくとも約 200 アミノ酸長、さらにより好ましくは少なくとも約 250 アミノ酸長のアミノ酸配列を含む。この実施形態において、本発明の好ましい Der HMW-map タンパク質は、配列番号 15 の少なくとも一部を含むアミノ酸配列を有する。別の実施形態では、好ましい Der HMW-map タンパク質は、全長タンパク質（すなわち、全長コード領域によってコードされるタンパク質）を含む。

【0043】

本発明のさらなる好ましい Der HMW-map タンパク質は、nDerf98₁₇₅₂、nDerf98₁₆₆₅、nDerf98₁₆₀₈、nDerp98₁₆₂₁、nDerp98₁₅₂₇、nDerp98₁₄₇₀、および nDerf60₅₁₀ の少なくとも一部を含む核酸分子によってコードされるタンパク質、ならびにこのような核酸分子の対立遺伝子改変体によってコードされる Der HMW-map タンパク質を含む。

【0044】

また好ましいのは、配列番号 14、配列番号 17、配列番号 20、配列番号 34、配列番号 37、配列番号 40、配列番号 43 および/または配列番号 33 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列、ならびにこれらの核酸分子の対立遺伝子改変体の少なくとも一部を含む核酸配列を有する核酸分子によってコードされる Der HMW-ma

pタンパク質である。

【0045】

別の実施形態では、本発明の好ましいDer HMW-mapタンパク質は、少なくとも約12ヌクレオチド、好ましくは、少なくとも約16ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも約18ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも約20ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも約25ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも約50ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも約100ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも約350ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも約450ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも約500ヌクレオチド、そしてさらにより好ましくは、少なくとも約800ヌクレオチドを含む核酸分子によってコードされる。この実施形態に含まれるのは、nDerf98₁₇₅₂、nDerp98₁₆₂₁、および/またはnDerf60₅₁の少なくとも部分によってコードされるDer HMW-mapタンパク質であるか、あるいはこれらの核酸分子の対立遺伝子改変体によってコードされるDer HMW-mapタンパク質である。さらに別の実施形態では、本発明の好ましいDer HMW-mapタンパク質は、見かけ上全長のDer HMW-mapコード領域を含む核酸分子(すなわち、見かけ上全長のDer HMW-mapタンパク質をコードする核酸分子)によってコードされる。

10

【0046】

本発明のDer HMW-mapタンパク質の1つの実施形態は、1つ以上の融合セグメントに結合されたDer HMW-mapタンパク質含有ドメインを含む融合タンパク質である。本発明での使用に適切な融合セグメントとしては、タンパク質の安定性を増強し得るセグメント; Der HMW-mapタンパク質に対する免疫応答を増強するための免疫増強物質として作用し得るセグメント、Der HMW-mapタンパク質に対するIgE応答を減少し得るセグメント; および/またはDer HMW-mapタンパク質の精製(例えば、アフィニティークロマトグラフィーによる)を補助し得るセグメントが挙げられるが、これらに限定されない。適切な融合セグメントは、所望される機能(例えば、増加した安定性の付与、タンパク質に対する増加した免疫原性の付与、IgE応答の減少、および/またはタンパク質精製の単純化)を有する任意のサイズのドメインであり得る。融合セグメントは、このタンパク質のDer HMW-mapタンパク質含有ドメインのアミノ末端および/またはカルボキシル末端に結合され得、そしてDer HMW-mapタンパク質の簡単な回収を可能にするために、切断に対して感受性であり得る。融合タンパク質は、好ましくは、Der HMW-mapタンパク質含有ドメインのカルボキシル末端および/またはアミノ末端のいずれかに結合された融合セグメントを含むタンパク質をコードする融合核酸分子で形質転換された組換え細胞を培養することによって生成される。好ましい融合セグメントとしては、以下が挙げられる: 金属結合ドメイン(例えば、ポリ-ヒスチジンセグメント); 免疫グロブリン結合ドメイン(例えば、プロテインA; プロテインG; T細胞; B細胞; Fcレセプターまたは補体タンパク質の抗体結合ドメイン); 糖結合ドメイン(例えば、マルトース結合ドメイン); 「タグ」ドメイン(例えば、ガラクトシダーゼ、streptタグペプチド、このドメインに結合する化合物を使用して精製され得る他のドメイン(例えば、モノクローナル抗体)の少なくとも一部分); および/またはリンカーおよび酵素ドメイン(例えば、リンカーによって、Der HMW-mapタンパク質に連結されたアルカリホスファターゼドメイン)。より好ましい融合セグメントとしては、以下が挙げられる: 金属結合ドメイン(例えば、ポリ-ヒスチジンセグメント); マルトース結合ドメイン; streptタグペプチド(例えば、Biometra、Tampa、FLから入手され得るペプチド); ファージT7 S10ペプチド。

20

30

40

【0047】

別の実施形態では、本発明のDer HMW-mapタンパク質はまた、1つ以上のアレルゲンから動物を脱感作し得る少なくとも1つのさらなるタンパク質セグメントを含む。このような多価の脱感作タンパク質は、2つ以上の核酸ドメインを含む核酸分子で形質転

50

換された細胞を培養することによって生成され得、この2つ以上の核酸ドメインは、生じる核酸分子が、アレルゲンから動物を脱感作し得る少なくとも2つの脱感作化合物を含む多価の脱感作化合物として発現されるような様式で、共に連結されている。

【0048】

多価の脱感作化合物の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：1つ以上のアレルゲン（例えば、植物アレルゲン、動物アレルゲン、寄生生物アレルゲン、または外寄生生物アレルゲン）によって引き起こされるアレルギーに対して脱感作する1つ以上の化合物に対して結合された、本発明のDer HMW-mapタンパク質。アレルゲンとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：イネ科草本、メドーフェスキュー（Meadow Fescue）、ギシギシ（Curly Dock）、オオバコ（plantain）、メキシカンファイアーブッシュ（Mexican Firebush）、シロザ（Lamb's Quarter）、アカザ（pigweed）、ブタクサ（ragweed）、セージ（sage）、ニレ（elm）、オナモミ（cocklebur）、トリネコバカエデ（Box Elder）、クルミ（walnut）、ハコヤナギ（cottonwood）、トネリコ（ash）、シラカンバ（birch）、ヒマラヤスギ（cedar）、オーク（oak）、クワ（mulberry）由来の植物（plant）アレルゲン、ゴキブリ、Dermatophagoides、Alternaria、Aspergillus、Cladosporium、Fusarium、Helminthosporium、Mucor、Penicillium、Pullularia、Rhizopusおよび/またはTricophyton；蠕虫由来の寄生生物アレルゲン；あるいは、クモ形綱、昆虫（ノミ、マダニ、ハエ、カ、スナバエ、ブユ（black fly）、ウマバエ、ノサシバエ（horn fly）、アブ、ツェツェバエ、サシバエ（stable fly）、ハエウジ病原バエ（myiasis-causing fly）および噛み付きブユ（biting gnats）、アリ、クモ、シラミ；ダニならびに半翅類昆虫を含む）およびヒル型類（leech）由来の外寄生生物アレルゲン。

10

20

【0049】

本発明はまた、本発明のDer HMW-mapタンパク質のマイムトープ（mimotope）を含む。本明細書中で使用される場合、本発明のDer HMW-mapタンパク質のマイムトープとは、このようなDer HMW-mapタンパク質の活性（例えば、Der HMW-mapタンパク質に対する免疫応答を誘導するために結合する能力）を模擬し得る任意の化合物をいい、これはしばしば、このマイムトープが、Der HMW-mapタンパク質を模擬する構造を有することに起因する。しかし、マイムトープは、そのマイムトープがDer HMW-mapタンパク質を機能的に模擬する限り、Der HMW-mapタンパク質に類似した構造を有する必要はないことに留意されるべきである。マイムトープは、以下であり得るが、これらに限定されない：分解に対するその感受性を減少するように改変されたペプチド；抗イデオタイプ抗体および/または触媒性抗体、あるいはそれらのフラグメント；単離されたタンパク質の非タンパク質様免疫原性部分（例えば、糖質構造）；合成または天然の有機分子または無機分子（核酸を含む）；および/または任意の他のペプチド模擬化合物。本発明のマイムトープは、本発明のDer HMW-mapタンパク質に関してコンピューターにより生成される構造を使用して設計され得る。マイムトープはまた、分子（例えば、オリゴヌクレオチド、ペプチドまたは他の有機分子）の無作為サンプルを生成し、そしてこのようなサンプルを、対応する結合パートナー（例えば、抗Der HMW-mapタンパク質抗体）を使用してアフィニティークロマトグラフィー技術によりスクリーニングすることによって獲得され得る。マイムトープはまた、例えば、合理的薬物設計によって獲得され得る。合理的薬物設計手順では、本発明の化合物の三次元構造を、例えば、核磁気共鳴（NMR）またはX線結晶学によって分析し得る。次いで、この三次元構造を使用して、例えば、コンピューターモデリングによって潜在的なマイムトープの構造を予測し得る。次いで、この予測されたマイムトープ構造を、例えば、化学合成、組換えDNA技術によってか、または天然の供給源

30

40

50

からマイムトープを単離することによって、生成し得る。Der HMW-mapタンパク質のマイムトープの特定の例としては、抗イディオタイプ抗体、SelextTM技術を使用して生成されるオリゴヌクレオチド、ペプチドライブラリーの無作為スクリーニングによって同定されるペプチド、およびファージディスプレイ技術によって同定されるタンパク質が挙げられる。好ましいマイムトープは、本発明のDer HMW-mapタンパク質に対して、特に、免疫応答を誘導するDer HMW-mapタンパク質のエピトープに対して、構造的および/または機能的に類似したペプチド模擬化合物である。

【0050】

本発明はまた、本発明のDer HMW-mapタンパク質のムテインも包含する。本明細書中で使用される場合、ムテインとは、所望のアミノ酸残基が置換または除去された、Der HMW-mapタンパク質の特定のホモログをいう。本発明の好ましいムテインとしては、そのムテインを治療用量で動物に投与した場合に、その動物によるアナフィラキシー反応を減少するようにアミノ酸残基が変化された、Der HMW-mapタンパク質ホモログが挙げられる。本発明のより好ましいムテインとしては、Der HMW-mapタンパク質の1つ以上のシステイン残基が置換または除去された、Der HMW-mapタンパク質ホモログが挙げられる。ムテインを生成するための方法は、当業者に公知であり、そしてそのような方法は、本明細書中に開示されている。好ましくは、ムテインは、組換え技術を使用して生成される。

10

【0051】

本発明の別の実施形態は、Der HMW-map核酸分子を含む、単離された核酸分子である。このような核酸分子の識別的な特徴は、今までに記載されている。本発明の核酸分子は、単離された天然のDer HMW-map遺伝子またはそのホモログを包含し得、この後者は、以下により詳細に記載される。本発明の核酸分子は、1つ以上の調節領域、全長コード領域もしくは部分的コード領域、またはこれらの組み合わせを含み得る。本発明の核酸分子の最小サイズは、別の核酸分子の相補配列との安定なハイブリッドの形成（すなわち、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でのハイブリダイゼーション）を可能にするに十分な、サイズである。

20

【0052】

本発明に従うと、単離された核酸分子は、その天然環境から取り出された（すなわち、ヒトによる操作を受けた）核酸分子であり、そしてこの単離された核酸分子は、DNA、RNA、またはDNAもしくはRNAのいずれかの誘導體を含み得る。このように、「単離された」とは、その核酸分子が精製された程度を反映しない。本発明の単離されたDer HMW-map核酸分子またはそのホモログは、その天然供給源から単離され得るし、あるいは組換えDNA技術（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅またはクローニング）または化学合成を使用して生成され得る。単離されたDer HMW-map核酸分子およびそのホモログとしては、例えば、天然の対立遺伝子改変体、ならびに本発明のDer HMW-mapタンパク質をコードする能力を実質的に妨げないような様式でヌクレオチドの挿入、欠失、置換、および/または逆位によって改変された核酸分子が挙げられ得る。

30

【0053】

Der HMW-map核酸分子ホモログは、当業者に公知の多数の方法（例えば、Sambrookら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Labs Press；Sambrookら（同書）を、参照のこと）を使用して、生成され得る。例えば、種々の技術を使用して核酸分子が改変され得、このような種々の技術としては、古典的変異誘発技術および組換えDNA技術（例えば、部位特異的変異誘発、化学的処理、制限酵素切断、核酸フラグメントの連結、PCR増幅、オリゴヌクレオチド混合物の合成、および核酸分子混合物を「構築」するための混合物群の連結、ならびにこれらの組み合わせ）が挙げられるが、これらに限定されない。核酸分子ホモログは、Der HMW-map核酸分子とのハイブリダイゼーションによってか、またはこの核酸分子によりコードされる

40

50

タンパク質の機能（例えば、Der HMW-mapタンパク質の少なくとも1つのエピトープに対する免疫応答を惹起する能力、またはDer HMW-map活性をもたらす能力）をスクリーニングすることによって、選択され得る。

【0054】

対立遺伝子改変体は、代表的には、その改変体が比較されている遺伝子によりコードされるタンパク質の活性と類似する活性を有する、タンパク質をコードする。対立遺伝子改変体はまた、その遺伝子の5'非翻訳領域または3'非翻訳領域（例えば、調節制御領域）中に変化を含み得る。対立遺伝子改変体は、当業者に周知であり、そして所定のチリダニにおいて見出されると予測される。なぜなら、そのゲノムは、二倍体であり、そして/または2つ以上のチリダニの群の間にあるからである。本発明はまた、実験室での操作に起因する改変体（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応増幅の間に生成される改変体であるが、これに限定されない）も含む。

10

【0055】

本発明の単離された核酸分子は、少なくとも1つの本発明のDer HMW-mapタンパク質をコードする、核酸配列を含み得、このようなタンパク質の例は、本明細書中に開示される。句「核酸分子」は、物理的な核酸分子を主に指し、そして句「核酸配列」は、その核酸分子に関するヌクレオチドの配列を主に指すが、この2つの句は、互換可能に使用され得、特に、Der HMW-mapタンパク質をコードすることができる核酸分子または核酸配列に関して、互換可能に使用され得る。

【0056】

本発明の好ましい核酸分子は、動物に投与された場合、Der HMW-mapアレルゲンにより引き起こされるアレルギー反応からその動物を脱感作することができる。以下により詳細に開示されるように、このような核酸分子は、アンチセンスRNA、三重らせんを形成できる分子、リボザイム、または他の核酸ベース薬物化合物であり得るし、またはそれらをコードし得る。さらなる実施形態において、本発明の核酸分子は、脱感作タンパク質（例えば、本発明のDer HMW-mapタンパク質）をコードし得、この核酸分子は、例えば、直接注入によって（すなわち、DNA試薬として）か、またはビヒクル（例えば、組換えウイルス試薬または組換え細胞試薬）中で、その動物に送達される。

20

【0057】

本発明の1つの実施形態は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でDer HMW-map遺伝子にハイブリダイズする、単離された核酸分子である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、本明細書中に記載される標準的ハイブリダイゼーション条件を指す。本発明の好ましい核酸分子は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号18、配列番号21、配列番号23、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号38、配列番号41、および/または配列番号44を含むアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子とハイブリダイズする、単離された核酸分子を含む。本発明のより好ましい核酸分子は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号18、配列番号21、配列番号23、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号38、配列番号41、および/または配列番号44を含むアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列の相補体とハイブリダイズする、単離された核酸分子を含む。

30

40

【0058】

本発明のより好ましい核酸分子は、少なくとも約150ヌクレオチドを含む核酸分子からなる群より選択される単離された核酸分子を含み、ここで少なくとも約150ヌクレオチ

50

ドを含むこの核酸分子は、1×SSCおよび0%ホルムアミドを含む溶液において、温度約50にて、配列番号14、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号22、配列番号34、配列番号36、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号42、配列番号43、配列番号45の核酸配列、および/または配列番号33のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列、ならびにそれらの相補体からなる群より選択される核酸配列に、ハイブリダイズする。

【0059】

本発明はまた、本明細書中に開示される任意の核酸分子のフラグメントをも包含する。本発明に従うと、フラグメントは、そのサイズが、本発明の配列番号により同定される配列より小さい長さ、本明細書中で規定されるようなオリゴヌクレオチドの最小サイズとの間の範囲であり得る、任意の核酸分子または核酸配列を含み得る。例えば、本発明のフラグメントのサイズは、長さが約1752ヌクレオチド未満でありかつ11ヌクレオチドよりは大きい、任意のサイズであり得る。

10

【0060】

本発明の1つの実施形態において、好ましいDer HMW-map核酸分子は、単離された核酸分子を含み、この単離された核酸分子は、少なくとも約50ヌクレオチドまたは少なくとも約150ヌクレオチドであり、かつこの単離された核酸分子は、約40%以下の塩基対ミスマッチを好ましくは許容する条件下で、より好ましくは、約35%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下で、より好ましくは、約30%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下で、より好ましくは、約25%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下で、より好ましくは、約20%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下で、より好ましくは、約15%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下で、より好ましくは、約10%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下で、そしてなおより好ましくは、約5%以下の塩基対ミスマッチを許容する条件下で、配列番号14、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号22、配列番号34、配列番号36、配列番号37、配列番号40、配列番号42、配列番号43、配列番号45の核酸配列、および配列番号33のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列、ならびにそれらの相補体からなる群より選択される核酸配列に、ハイブリダイズする。

20

【0061】

本発明の別の実施形態は、少なくとも約150塩基対を含む核酸分子を含み、ここでこの核酸分子は、1×SSCおよび0%ホルムアミドを含む溶液において、温度約50にて、配列番号14、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号22、配列番号34、配列番号36、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号42、配列番号43、配列番号45の核酸配列、および/または配列番号33のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列、ならびにそれらの相補体からなる群より選択される核酸配列に、ハイブリダイズする。本発明のさらなる好ましい核酸分子は、少なくとも約150塩基対を含む単離された核酸分子のフラグメントを含み、ここでこの核酸分子は、1×SSCおよび0%ホルムアミドを含む溶液において、温度約50にて、配列番号14、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号22、配列番号34、配列番号36、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号42、配列番号43、配列番号45の核酸配列、および配列番号33のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列、ならびにそれらの相補体からなる群より選択される核酸配列に、ハイブリダイズする。

30

40

【0062】

本発明のさらなる好ましいDer HMW-map核酸分子は、少なくとも約50ヌクレオチドまたは少なくとも約150ヌクレオチドである単離された核酸分子を含み、この単離された核酸分子は、配列番号14、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号22、配列番号34、配列番号36、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号42、配列番号43、配列番号45の核酸配列、および配列番号33のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列、ならびにそれらの相補体か

50

らなる群より選択される核酸配列と、好ましくは少なくとも約60%同一であり、より好ましくは少なくとも約65%同一であり、より好ましくは少なくとも約70%同一であり、より好ましくは少なくとも約75%同一であり、より好ましくは少なくとも約80%同一であり、より好ましくは少なくとも約85%同一であり、より好ましくは少なくとも約90%同一であり、そしてなおより好ましくは少なくとも約95%同一である、核酸配列を含む。このような核酸分子のいずれかのフラグメントもまた、好ましい。同一性パーセントは、プログラムDNA S i s V e r s i o n 2 . 1内において、デフォルトパラメータを使用して最大一致によるC o m p a r e機能を使用して、決定され得る。

【0063】

本発明の1つの実施形態は、核酸分子n D e r f 9 8 _{1 7 5 2}、n D e r f 9 8 _{1 6 6 5}、およびn D e r f 9 8 _{1 6 0 8}、n D e r p 9 8 _{1 6 2 1}、n D e r p 9 8 _{1 5 2 7}、n D e r p 9 8 _{1 4 7 0}、および/もしくはn D e r f 6 0 _{5 1 0}、またはこれらの核酸分子の対立遺伝子改変体の、すべてまたは一部を含む、核酸分子である。本発明の別の好ましい核酸分子は、配列番号14、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号22、配列番号34、配列番号36、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号42、配列番号43、配列番号45の核酸配列、および/または配列番号33のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列、ならびにこれらの核酸配列を有する核酸分子の対立遺伝子改変体、およびこれらの核酸配列を有する核酸分子のホモログの、少なくとも一部を含み；好ましくは、このようなホモログは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号18、配列番号21、配列番号23、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号38、配列番号41、および/または配列番号44のアミノ酸配列を有するタンパク質に対して、免疫応答を惹起する少なくとも1つのエピトープをコードする核酸分子をコードするか、またはその核酸分子と相補的である。このような核酸分子は、上記配列番号に含まれるヌクレオチドに加えて、ヌクレオチドを含み得、そのヌクレオチドは、例えば、全長遺伝子、全長コード領域、融合タンパク質をコードする核酸分子、または多価防御化合物をコードする核酸分子であるが、これらに限定されない。

【0064】

1つの実施形態において、本発明のD e r H M W - m a p核酸分子は、P D e r f 9 8 _{5 5 5}、P D e r p 9 8 _{5 0 9}、および/またはP D e r f 6 0 _{1 7 0}と、少なくとも約45%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約55%、なおより好ましくは少なくとも約60%、なおより好ましくは少なくとも約65%、なおより好ましくは少なくとも約70%、なおより好ましくは少なくとも約75%、なおより好ましくは少なくとも約80%、なおより好ましくは少なくとも約85%、なおより好ましくは少なくとも約90%、そしてなおより好ましくは少なくとも約95%同一である、タンパク質をコードする。なおより好ましいのは、P D e r f 9 8 _{5 5 5}、P D e r f 9 8 _{5 3 6}、P D e r p 9 8 _{5 0 9}、P D e r p 9 8 _{4 9 0}、および/もしくはP D e r f 6 0 _{1 7 0}をコードする核酸分子、ならびに/またはこのような核酸分子の対立遺伝子改変体である。

【0065】

別の実施形態において、本発明のD e r H M W - m a p核酸分子は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号18、配列番号21、配列番号23、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号38、配列番号41、および/または配列番号44と、少なくとも約45%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約55%、なおより好ましくは少なくとも約60%、なおより好ましくは少なくとも約65%、なおより好ましくは少なくとも約70%、な

および好ましくは少なくとも約75%、なおより好ましくは少なくとも約80%、なおより好ましくは少なくとも約85%、なおより好ましくは少なくとも約90%、そしてなおより好ましくは少なくとも約95%同一である、アミノ酸配列を有するタンパク質をコードする。本発明はまた、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号18、配列番号21、配列番号23、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号38、配列番号41、および/または配列番号44の少なくとも一部を有するタンパク質をコードするDer HMW-map核酸分子、ならびにこれらの配列を有するタンパク質をコードするDer HMW-map核酸分子の対立遺伝子改変体(発現される細胞のコドン使用頻度特性に適合するように改変された、核酸分子を含む)も、包含する。

10

【0066】

別の実施形態において、好ましいDer HMW-map核酸分子は、少なくとも約35アミノ酸長、好ましくは少なくとも約50アミノ酸長、より好ましくは少なくとも約100アミノ酸長、より好ましくは少なくとも約200アミノ酸長、なおより好ましくは少なくとも約250アミノ酸長を含む、Der HMW-mapタンパク質をコードする。

【0067】

本発明の特定のDer HMW-map核酸分子の核酸配列を知ることにより、当業者は、例えば、(a)それらの核酸分子のコピーを作製し得、(b)そのような核酸分子の少なくとも一部を含む核酸分子(例えば、全長遺伝子、全長コード領域、調節制御配列、短縮コード領域を含む、核酸分子)を得ることができ、そして(c)他のDer HMW-map核酸分子を得ることができる。このような核酸分子は、種々の方法で得ることができ、そのような方法としては、適切な発現ライブラリーを、本発明の抗体を用いてスクリーニングすること;適切なライブラリーをスクリーニングするために本発明のオリゴヌクレオチドプローブを使用する、従来のクローニング技術;および本発明のオリゴヌクレオチドプライマーを使用する、適切なライブラリーもしくはDNAのPCR増幅が、挙げられる。核酸分子をスクリーニングまたは増幅するための好ましいライブラリーとしては、*Dermatophagoides farinae*ライブラリー、および/または*Dermatophagoides pteronyssius*ライブラリー(例えば、本明細書中に実施例にて開示される、ライブラリー)が挙げられる。遺伝子をクローニングおよび増幅するための技術は、例えば、Sambrookら(同書)に開示されている。

20

30

【0068】

本発明はまた、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、本発明の他の核酸分子(好ましくは、より長い他の核酸分子)(例えば、Der HMW-map核酸分子を含む核酸分子、または他のDer HMW-map核酸分子を含む核酸分子)の相補的領域とハイブリダイズすることができる、オリゴヌクレオチドである核酸分子を包含する。本発明のオリゴヌクレオチドは、RNAでも、DNAでも、またはいずれかの誘導體でも、あり得る。このようなオリゴヌクレオチドの最小サイズは、オリゴヌクレオチドと、本発明の核酸分子上の相補的配列と間での、安定なハイブリッドの形成に必要なサイズである。本発明の好ましいオリゴヌクレオチドは、好ましくは約200ヌクレオチド、より好ましくは約150ヌクレオチド、そしてなおより好ましくは約100ヌクレオチドの最大サイズを有する。本発明は、例えば、核酸分子を同定するためのプローブとして、使用され得るオリゴヌクレオチドを包含する。

40

【0069】

本発明の1つの実施形態は、組換えベクターを包含し、その組換えベクターは、本発明の少なくとも1つの単離された核酸分子を、宿主細胞中にその核酸分子を送達することができる任意のベクター中に挿入された状態で、含む。そのようなベクターは、異種核酸配列を含み、その異種核酸配列は、天然では本発明の核酸分子に近接して見出されず、かつ好ましくは、その本発明の核酸分子が由来する種以外の種に由来する、核酸配列である。そ

50

のベクターは、RNAまたはDNAのいずれかであり得、原核生物性または真核生物性のいずれかであり得、そして代表的には、ウイルスまたはプラスミドである。組換えベクターは、本発明の *Der* HMW-map 核酸分子のクローニング、配列決定、および/または他の操作において、使用され得る。

【0070】

1つの型の組換えベクター（本明細書中において、組換え分子と呼ばれる）は、発現ベクターに作動可能に連結された、本発明の核酸分子を含む。句「作動可能に連結された」とは、宿主細胞中に形質転換された場合に核酸分子が発現されることができ、発現ベクター中にその核酸分子が挿入されていることを指す。本明細書中で使用される場合、発現ベクターは、宿主細胞を形質転換することができ、かつ特定の核酸分子の発現をもたらすことができる、DNAベクターまたはRNAベクターである。好ましくは、その発現ベクターはまた、その宿主細胞中で複製することもできる。発現ベクターは、原核生物性または真核生物性のいずれかであり得、そして発現ベクターは、代表的には、ウイルスまたはプラスミドである。本発明の発現ベクターとしては、本発明の組換え細胞（細菌細胞、真菌細胞、内寄生生物細胞、昆虫細胞、他の動物細胞、ならびに植物細胞を含む）において機能する（すなわち、遺伝子発現を指向する）、任意のベクターが挙げられる。本発明の好ましい発現ベクターは、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞において、そしてより好ましくは、本明細書中に開示される細胞型において、遺伝子発現を指向し得る。

【0071】

特に、本発明の発現ベクターは、調節配列（例えば、転写制御配列、翻訳制御配列、複製起点、および組換え細胞と適合性でありかつ本発明の核酸分子の発現を制御する他の調節配列）を含む。特に、本発明の組換え分子は、転写制御配列を含む。転写制御配列は、転写の開始、伸長、および終結を制御する、配列である。特に重要な転写制御配列は、転写開始を制御する配列（例えば、プロモーター配列、エンハンサー配列、オペレーター配列、およびリプレッサー配列）である。適切な転写制御配列としては、本発明の組換え細胞の少なくとも1つにおいて機能し得る、任意の転写制御配列が挙げられる。種々のこのような転写制御配列が、当業者に公知である。好ましい転写制御配列としては、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞において機能する配列が挙げられ、例えば、*tac*プロモーター、*lac*プロモーター、*trp*プロモーター、*trc*プロモーター、*oxy-pro*プロモーター、*omp/lpp*プロモーター、*rrnB*プロモーター、バクテリオファージプロモーター（例えば、 P_L プロモーターおよび P_R プロモーター、およびこのようなプロモーターを含む融合物）、バクテリオファージT7プロモーター、T7*lac*プロモーター、バクテリオファージT3プロモーター、バクテリオファージSP6プロモーター、バクテリオファージSP01プロモーター、メタロチオネインプロモーター、接合因子プロモーター、*Pichia*アルコールオキシダーゼプロモーター、アルファウイルスサブゲノムプロモーター（例えば、シンドビスウイルスサブゲノムプロモーター）、抗生物質耐性遺伝子プロモーター、バキュロウイルスプロモーター、*Heliothis zae*昆虫ウイルスプロモーター、ワクシニアウイルスプロモーター、ヘルペスウイルスプロモーター、アライグマボックスウイルスプロモーター、他のボックスウイルスプロモーター、アデノウイルスプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター（例えば、中初期プロモーター）、シミアンウイルス40プロモーター、レトロウイルスプロモーター、アクチンプロモーター、レトロウイルス長末端反復プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、熱ショックプロモーター、リン酸および硝酸転写制御配列、ならびに原核生物細胞または真核生物細胞において遺伝子発現を制御することができる他の配列が挙げられるが、これらに限定されない。さらなる適切な転写制御配列としては、組織特異的プロモーターおよび組織特異的エンハンサー、ならびにリンホカイン誘導性プロモーター（例えば、インターフェロンまたはインターロイキンによって誘導される、プロモーター）が、挙げられる。本発明の転写制御配列としてはまた、イヌまたはネコと天然に関連がある、天然に存在する転写制御配列が挙げられ得る。

10

20

30

40

50

【0072】

本発明の組換えベクター中に含むために適切かつ好ましい核酸分子は、本明細書中に開示されるような核酸分子である。組換えベクター中、特に組換え分子中に含むために好ましい核酸分子としては、nDerf98₁₇₅₂、nDerf98₁₆₆₅、nDerf98₁₆₀₈、nDerp98₁₆₂₁、nDerp98₁₅₂₇、nDerp98₁₄₇₀、およびnDerf605₁₀が、挙げられる。

【0073】

本発明の組換え分子はまた、(a)発現される本発明のDer HMW-mapタンパク質が、そのタンパク質を産生する細胞から分泌されることができるよう、分泌シグナル(すなわち、シグナルセグメント核酸配列)を含み得、そして/または(b)融合タンパク質として本発明の核酸分子の発現をもたらす、融合配列を含み得る。適切なシグナルセグメントの例としては、本発明のタンパク質の分泌を指向することができる、任意のシグナルセグメントが挙げられる。好ましいシグナルセグメントとしては、組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)シグナルセグメント、インターフェロンシグナルセグメント、インターロイキンシグナルセグメント、成長ホルモンシグナルセグメント、組織適合性シグナルセグメントおよびウイルスエンベロープ糖タンパク質シグナルセグメント、ならびに天然のシグナルセグメントが、挙げられるが、これらに限定されない。融合セグメント核酸によりコードされる適切な融合セグメントは、本明細書中に開示される。さらに、本発明の核酸分子は、コードされるタンパク質をプロテオソームへと指向する、融合セグメント(例えば、ユビキチン融合セグメント)に、連結され得る。組換え分子はまた、本発明の核酸分子の核酸配列の周囲および/または内部に、介在配列および/または非翻訳配列を含み得る。

【0074】

本発明の別の実施形態は、本発明の1つ以上の組換え分子で形質転換された宿主細胞を含む、組換え細胞を包含する。細胞中への核酸分子の形質転換は、核酸分子をその細胞中に挿入し得る任意の方法によって、達成され得る。形質転換技術としては、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着、およびプロトプラスト融合が挙げられるが、これらに限定されない。組換え細胞は、単細胞のままであり得るし、または組織、器官、もしくは多細胞生物へと成長し得る。本発明の形質転換された核酸分子は、その核酸分子が発現される能力が維持されるような様式で、形質転換された(すなわち、組換え)細胞の染色体外にあるままであり得るし、またはその細胞の染色体中の1つ以上の部位に組み込み得る。細胞を形質転換するための好ましい核酸分子としては、本明細書中に開示されるDer HMW-map核酸分子が挙げられる。細胞を形質転換するための特に好ましい核酸分子としては、nDerf98₁₇₅₂、nDerf98₁₆₆₅、nDerf98₁₆₀₈、nDerp98₁₆₂₁、nDerp98₁₅₂₇、nDerp98₁₄₇₀、およびnDerf605₁₀が、挙げられる。

【0075】

形質転換するために適切な宿主細胞としては、本発明の核酸分子で形質転換され得る任意の細胞が挙げられる。宿主細胞は、形質転換されていない細胞であり得るか、または少なくとも1つの核酸分子(例えば、本発明の1以上のタンパク質および/または多価ワクチンの産生に有用な他のタンパク質をコードする核酸分子)で既に形質転換されている細胞であり得るかのいずれかである。本発明の宿主細胞は、本発明のDer HMW-mapタンパク質を内因的(すなわち、天然で)産生し得るか、または本発明の少なくとも1つの核酸分子で形質転換された後にこのようなタンパク質を産生し得るかのいずれかである。本発明の宿主細胞は、本発明の少なくとも1つのタンパク質を産生し得る任意の細胞であり得、そしてこれらには、細菌細胞、真菌細胞(酵母を含む)、他の昆虫細胞、他の動物細胞および植物細胞が挙げられる。好ましい宿主細胞としては、細菌細胞、ミコプラズマ細胞、酵母細胞、寄生生物細胞、昆虫細胞および哺乳動物細胞が挙げられる。より好ましい宿主細胞としては、Salmonella、Escherichia、Bacil

lus、Listeria、Saccharomyces、Spodoptera、Mycobacteria、Trichoplusia、BHK（乳児ハムスター腎臓）細胞、MDCK細胞（イヌヘルペスウイルス培養のための正常なイヌ腎臓細胞株）、CRFK細胞（ネコヘルペスウイルス培養のための正常なネコ腎臓細胞株）、CV-1細胞（例えば、アライグマポックスウイルスを培養するために使用される、アフリカザル腎臓細胞株）、COS（例えば、COS-7）細胞、およびVero細胞が挙げられる。特に好ましい宿主細胞としては、Escherichia coli（E. coli K-12誘導株を含む）；Salmonella typhi；Salmonella typhimurium（UK-1x3987およびSR-11x4072のような弱毒化株を含む）；Spodoptera frugiperda；Trichoplusia ni；BHK細胞；MDCK細胞；CRFK細胞；CV-1細胞；COS細胞；Vero細胞および非腫瘍形成性マウス筋芽細胞G8細胞（例えば、ATCC CRL1246）である。さらなる適切な哺乳動物細胞宿主としては、他の腎臓細胞株、他の線維芽細胞株（例えば、ヒト、マウス、またはニワトリの胚線維芽細胞株）、骨髄腫細胞株、チャイニーズハムスター卵巣細胞、マウスNIH/3T3細胞、LMTK³¹細胞および/またはHeLa細胞が挙げられる。

【0076】

組換え細胞は、好ましくは、宿主細胞を1以上の組換え分子で形質転換することによって生成され、各組換え分子は、1以上の転写制御配列を含む発現ベクターに作動可能に連結された、本発明の1以上の核酸分子を含む。句「作動可能に連結される」とは、核酸分子を、その核酸分子が宿主細胞内に形質転換された場合に発現され得るような様式で、発現ベクター内に挿入することをいう。

【0077】

本発明の組換え分子は、任意の転写制御配列のうちの少なくとも1つに作動可能に連結された、上記の任意の核酸分子うちの少なくとも1つを含み得る分子であり、その転写制御配列は、形質転換される細胞においてその核酸分子の発現を効果的に調節し得る。これらの例を、本明細書中に開示する。

【0078】

本発明の組換え細胞としては、本発明の任意のDer HMW-map核酸分子のうちの少なくとも1つで形質転換された任意の細胞が挙げられる。細胞を形質転換するために適切かつ好ましいDer HMW-map核酸分子ならびに適切かつ好ましい組換え分子を、本明細書中に開示する。

【0079】

組換えDNA技術は、例えば、宿主細胞内の核酸分子のコピー数、それらの核酸分子が転写される効率、その得られた転写物が翻訳される効率、および翻訳後修飾の効率を操作することによって、形質転換された核酸分子の発現を改善するために、使用され得る。本発明の核酸分子の発現を増加するために有用な組換え技術としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：高コピー数プラスミドへの核酸分子の作動可能な連結、1以上の宿主細胞染色体内への核酸分子の組み込み、プラスミドへのベクター安定性配列の付加、転写制御シグナル（例えば、プロモーター、オペレーター、エンハンサー）の置換または改変、翻訳制御シグナル（例えば、リボソーム結合部位、シャイン-ダルガノ配列）の置換または改変、宿主細胞のコドン使用頻度に対応させるような本発明の核酸分子の改変、転写物を不安定化させる配列の欠失、および発酵中の組換え酵素産生から組換え細胞増殖を時間的に切り離す制御シグナルの使用。本発明の発現させる組換えタンパク質の活性は、このようなタンパク質をコードする核酸分子のフラグメント化、改変または誘導体化によって改善され得る。

【0080】

本発明の単離されたDer HMW-mapタンパク質は、種々の様式で産生され得、これらには、天然のタンパク質の産生および回収、組換えタンパク質の産生および回収、およびこれらのタンパク質の化学合成が挙げられる。1つの実施形態において、本発明の単

離されたタンパク質は、タンパク質を産生するのに効果的な条件下でそのタンパク質を発現し得る細胞を培養し、そしてそのタンパク質を回収することによって、産生される。培養するために好ましい細胞は、本発明の組換え細胞である。効果的な培養条件としては、タンパク質産生を可能にする、効果的な培地条件、バイオリクター条件、温度条件、pH条件および酸素条件が挙げられるが、これらに限定されない。効果的な培地とは、細胞が本発明の Der HMW-map タンパク質を産生するように培養される、任意の培地をいう。このような培地は、代表的に、同化可能な炭素源、窒素源およびリン酸源、ならびに適切な塩、ミネラル、金属および他の栄養素（例えば、ビタミン）を有する水性培地を含む。本発明の細胞は、従来の発酵バイオリクター、振盪フラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュ、およびペトリプレートにおいて培養され得る。培養は、組換え細胞に適切な温度、pHおよび酸素含量で行われ得る。このような培養条件は、当業者の技術の範囲内である。

10

【0081】

産生のために使用されるベクターおよび宿主系に依存して、本発明の得られるタンパク質は、組換え細胞内に残ったままであり得るか；発酵培地中に分泌され得るか；2つの細胞膜間の空間（例えば、E. coliのペリプラズム空間）に分泌され得るか；あるいは細胞またはウイルスの膜の外側表面上に保持され得るかの、いずれかである。句「タンパク質を回収する」、ならびに同様の句は、タンパク質を含む発酵培地全体を回収することをいい、そして分離または精製のさらなる工程を含む必要はない。本発明のタンパク質は、種々の標準的なタンパク質精製技術（例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ろ過、電気泳動、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、コンカナバリンAクロマトグラフィー、等電点電気泳動および差次的可溶化が挙げられるが、これらに限定されない）を使用して精製され得る。本発明のタンパク質は、好ましくは、「実質的に純粋な」形態で回収され得る。本明細書中で使用される場合、「実質的に純粋（な）」とは、治療組成物または診断剤としてのタンパク質の効果的な使用を可能にする純度をいう。例えば、動物のための治療組成物は、実質的な毒性を示すべきでなく、そして好ましくは、処置される動物を脱感作し得るべきである。

20

【0082】

本発明はまた、本発明の Der HMW-map タンパク質またはそのミメトープ（mimetope）に選択的に結合する単離された（すなわち、それらの天然環境から取り出された）抗体（すなわち、抗 Der HMW-map タンパク質抗体）を包含する。本明細書中で使用される場合、用語、Der HMW-map に「選択的に結合する」とは、本発明の抗体が、本発明の特定化されたタンパク質またはそのミメトープに優先的に結合する能力をいう。結合は、当該分野で標準的な種々の方法（酵素免疫アッセイ（例えば、ELISA）、イムノプロットアッセイなどを含む；例えば、Sambrookら、同書、を参照のこと）を使用して測定され得る。抗 Der HMW-map タンパク質抗体は、好ましくは、動物において免疫応答を誘導する Der HMW-map タンパク質の部分に選択的に結合する。

30

【0083】

本発明の単離された抗体としては、体液（例えば、血清が挙げられるが、これに限定されない）中の抗体、または種々の程度に精製された抗体が挙げられ得る。本発明の抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得る。このような抗体の機能的等価物（例えば、抗体フラグメントおよび遺伝子操作された抗体（1より多いエピトープに結合し得る、単鎖抗体またはキメラ抗体を含む）もまた、本発明に含まれる。

40

【0084】

本発明の抗体を産生するための好ましい方法は、（a）本発明のタンパク質、ペプチドまたはそのミメトープの有効量を動物に投与して、抗体を産生する工程；および（b）それらの抗体を回収する工程、を包含する。別の方法において、本発明の抗体は、本発明の Der HMW-map タンパク質を産生するために先に開示したような技術を使用して、

50

組換え的に産生される。定義されるタンパク質またはミメトープに対して惹起された抗体が有利であり得る。なぜなら、そのような抗体は、治療組成物中で使用する場合に、さもなくば診断アッセイにおける干渉または副作用を生じ得る他の物質に対する抗体が、実質的に混入されていないからである。

【0085】

本発明の抗体は、本発明の範囲内の種々の潜在的用途を有する。例えば、このような抗体は、(a) ダニアレルゲン(特に、Der HMW-mapタンパク質)を検出するためのツールとして；(b) 発現ライブラリーをスクリーニングするためのツールとして；および/または(c) タンパク質と他の混入物との混合物から本発明の所望のタンパク質を回収するために、使用され得る。本発明の抗体はまた、例えば、Der HMW-mapに特異的に結合するIgEへのDer HMW-mapタンパク質の結合を阻害し、免疫複合体形成を妨げ、それによって、ダニアレルゲンに対する過敏性応答を減少するために、使用され得る。 10

【0086】

本発明のDer HMW-mapタンパク質は、キメラ分子中に含まれ得、このキメラ分子は、動物において免疫応答を誘導するDer HMW-mapタンパク質の少なくとも一部、および第2の分子を含み、この第2の分子は、基質に結合されていないDer HMW-mapタンパク質と本質的に同じ様式でそのDer HMW-mapタンパク質の部分がIgEに結合し得るような様式で、そのキメラ分子が基質に結合されるのを可能にする。適切な第2の分子の例としては、免疫グロブリン分子の一部、または基質に固定化され得る適切な結合パートナーを有する別のリガンドが挙げられる(例えば、ビオチンおよびアビジン、または金属結合タンパク質および金属(例えば、His)、または糖結合タンパク質および糖(例えば、マルトース))。 20

【0087】

本発明のDer HMW-mapタンパク質は、処方物中に含まれ得、本明細書中で、Der HMW-mapタンパク質処方物と称する。例えば、Der HMW-mapタンパク質は、そのDer HMW-mapタンパク質が可溶化される緩衝液、および/またはキャリアと合わせられ得る。適切な緩衝液およびキャリアは、当業者に公知である。適切な緩衝液の例としては、Der HMW-mapタンパク質が、Der HMW-mapタンパク質に特異的に結合する抗体に選択的に結合するように機能し得る、任意の緩衝液(例えば、リン酸緩衝化生理食塩水、水、生理食塩水、リン酸緩衝液、重炭酸緩衝液、HEPES緩衝液(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸緩衝化生理食塩水)、TES緩衝液(Tris-EDTA緩衝化生理食塩水)、Tris緩衝液およびTAE緩衝液(Tris-酢酸-EDTA)が挙げられるが、これらに限定されない)が挙げられる。キャリアの例としては、ポリマーマトリクス、トキシイド、および血清アルブミン(例えば、ウシ血清アルブミン)が挙げられるが、これらに限定されない。キャリアは、Der HMW-mapタンパク質に特異的に結合する抗体に選択的に結合するDer HMW-mapタンパク質の能力を実質的に干渉しないような様式で、Der HMW-mapタンパク質と混合され得るかまたはDer HMW-mapタンパク質に結合体化(すなわち、付着)され得る。 30 40

【0088】

本発明のDer HMW-mapタンパク質は、Der HMW-mapタンパク質を含む細胞によって産生され得る。好ましいDer HMW-mapタンパク質保有細胞としては、本発明のDer HMW-mapタンパク質をコードする核酸分子を含む組換え細胞が挙げられる。

【0089】

さらに、本発明のDer HMW-mapタンパク質処方物は、Der HMW-mapタンパク質のみならず、アレルギーに対する動物の脱感作、あるいはダニアレルゲン病原の予防または処置において有用な、1以上のさらなる抗原または抗体を含み得る。本明細書中で使用される場合、抗原とは、抗体によって選択的に結合され得る、任意の分子をい 50

う。本明細書中で使用される場合、アレルゲンとは、動物におけるアレルギー応答に關与する抗体の産生を刺激し得る、任意の抗原をいう。本明細書中で使用される場合、第2の分子への第1の分子の選択的結合とは、第1の分子が第3の分子へ結合する能力と比較して、その第1の分子が第2の分子に優先的に結合（例えば、より高い親和性、より高いアビディティを有する）する能力をいう。この第1の分子は、必ずしも第2の分子の天然のリガンドである必要はない。本発明のアレルゲンは、好ましくは、ダニ由来であり、そしてダニ関連アレルゲン（他の昆虫アレルゲンおよび植物アレルゲンを含むが、これらに限定されない）である。

【0090】

本発明に従って、実質的に任意の物質が、抗原として作用し得、そして抗体応答を誘発し得る（すなわち、エピトープとして機能し得る）。例えば、抗体は、糖質エピトープ（タンパク質に付加されている、サッカリドおよび/またはポリサッカリド（いわゆる、グリコシル化タンパク質））に結合して惹起され得る。しかし、サッカリドおよび/またはポリサッカリドは、タンパク質が存在することなく、単独で抗原として作用し得る。糖質部分の末端の糖、および内部の糖が、エピトープとして作用し得る。ポリサッカリドは、分枝鎖として存在し得、この場合、エピトープは、順番が連続しないが空間的に隣接する糖を有し得る。哺乳動物タンパク質において通常見られない、非通常の、昆虫特異的な糖は、昆虫の核酸分子由来の糖タンパク質に存在し得、そしてこれらの非通常の糖は、哺乳動物免疫系によって認識されるエピトープを含み得る。

【0091】

本発明の1つの実施形態は、ダニに対してアレルギー性である動物のIgEに結合し得るか、ダニアレルゲンに対して動物を脱感作し得るか、Bリンパ球応答を刺激し得るか、そして/またはTリンパ球応答を刺激し得る非タンパク質エピトープを含む、試薬である。このようなエピトープ（本明細書中でDer NPエピトープと呼ばれる）は、本発明のDer HMW-mapタンパク質の部分として存在し得るか、または本発明のDer HMW-mapタンパク質から単離され得る。このようなエピトープは、例えば、実施例1に従って産生されたD. farinae HMW-map組成物中に含まれるタンパク質上に存在する。本発明のDer NPエピトープは、その天然の供給源から単離され得るか、または合成的に産生され得る。このようなエピトープは、キャリアまたは他の分子に連結され得るが、その必ずしもその必要はない。Der NPエピトープは、以下の識別される特徴のうち少なくとも1つを有する：(a) そのエピトープは、ペプチドの脱離に対して耐性である；(b) そのエピトープは、プロテイナーゼK消化に対して耐性である；および(c) そのエピトープは、グリコシル化されたタンパク質を検出するように設計された試験に対して反応性である。好ましいDer NPエピトープは、このような識別される特徴の全てを有する。Der NPエピトープは、ダニに対してアレルギー性のイヌまたはネコのIgEに選択的に結合し得る。理論に束縛されないが、Der NPエピトープは、N結合型グリカンを含まないと考えられている。このようなエピトープの構造的特徴の同定は、当業者によって決定され得る。1つの実施形態において、Der NPエピトープに選択的に結合する単離された抗体が提供される。本発明はまた、Der NPエピトープの誘導体（すなわち、このようなエピトープの活性を模倣する（例えば、Der NPエピトープのミメトープである）、ネイティブ（すなわち、天然で見られる）Der Npエピトープに対して惹起された抗体に結合し得る、化合物）を包含する。

【0092】

本発明のDer NPエピトープを含む試薬は、本発明に従って種々の様式で使用され得る。このような試薬は、脱感作化合物であり得るか、またはダニアレルギーの感受性または感度について試験するための検出試薬であり得る。1つの実施形態において、本発明の治療組成物は、Der NPエピトープを含む試薬を含む。別の実施形態において、本発明のアッセイキットは、Der NPエピトープを含む試薬を備える。本発明の1つの実施形態は、ダニに対するアレルギー応答に対して感受性であるかまたはダニに対するアレ

ルギー応答を有する動物を同定する方法である。このような方法は、Der NPエピトープを含む試薬を動物の抗体と接触させる工程、およびその試薬と抗体との間の免疫複合体の形成を決定する工程を包含し、この免疫複合体の形成は、その動物が、そのアレルギー応答に感受性であるかまたはそのアレルギー応答を有することを示す。本発明の別の実施形態は、ダニに対するアレルギー応答に対して宿主動物を脱感作するための方法である。このような方法は、その動物に、脱感作化合物としてDer NPエピトープを含む試薬を含む治療組成物を投与する工程を包含する。

【0093】

本発明の別の実施形態は、Der NPエピトープを欠くDer HMW-mapタンパク質である。理論に束縛されないが、このようなタンパク質は、より良好な脱感作化合物である。なぜなら、このようなタンパク質は、IgEに結合する能力が減少されていることが予測されるからである。このようなタンパク質は、例えば、ネイティブDer HMW-mapタンパク質からDer NPエピトープを除去することによってか、またはこのタンパク質を組換え的に（例えば、E.coliにおいて）産生することによって、産生され得る。

10

【0094】

本発明の1つの実施形態は、動物がDer HMW-mapタンパク質に対して過敏性であるか否かを検出し得る、インビボ試験である。本発明のインビボ過敏性試験は、ダニアレルゲンに対して感受性であるかまたはダニアレルゲンに対するアレルギーを有する動物を同定するために、特に有用である。本発明の適切なインビボ過敏性試験は、皮膚試験であり得るが、これに限定されず、この皮膚試験は、Der HMW-mapタンパク質またはそのミメトープを含む有効量の処方物を投与（例えば、皮内注射または表面スクラッチ）する工程を包含する。本発明の皮膚試験を行うための方法は、当業者に公知であり、そして本明細書中に簡単に開示される。

20

【0095】

インビボ皮膚試験において使用するための適切な処方物は、Der HMW-mapタンパク質、Der HMW-mapタンパク質のホモログおよび/またはDer HMW-mapタンパク質のミメトープを含む。

【0096】

本発明の皮膚試験における使用のためのDer HMW-mapタンパク質タンパク質処方物の適切な量は、その試験に使用される処方物のアレルゲン性および生成物が送達される部位に依存して、広範に変化し得る。本発明の皮膚試験における使用のためのDer HMW-mapタンパク質処方物の適切な量としては、反応（例えば、その処方物に対するアレルギー反応から生じる検出可能な膨疹または硬化（硬度））を形成し得る量が挙げられる。本発明の皮膚試験における使用のためのDer HMW-mapタンパク質の好ましい量は、約 1×10^{-8} マイクログラム (μg) ~ 約 $100 \mu\text{g}$ 、より好ましくは、約 $1 \times 10^{-7} \mu\text{g}$ ~ 約 $10 \mu\text{g}$ 、そしてさらにより好ましくは、約 $1 \times 10^{-6} \mu\text{g}$ ~ 約 $1 \mu\text{g}$ のDer HMW-mapタンパク質の範囲にある。このような量は、投与されるタンパク質のアレルゲン性に依存して変化することが、当業者に理解される。

30

【0097】

本発明に従って、本発明のDer HMW-mapタンパク質は、免疫増強物質（例えば、以下に詳細に定義されるような、本発明のキャリアまたはアジュバント）と合わされ得る。しかし、本発明の新しい局面は、本発明のDer HMW-mapタンパク質が、特に、イヌにおいて、免疫増強物質の非存在下で過敏性応答を誘導し得ることである。

40

【0098】

本発明の皮膚試験はさらに、コントロール溶液を動物に投与する工程を包含する。コントロール溶液としては、ネガティブコントロール溶液および/またはポジティブコントロール溶液が挙げられ得る。本発明のポジティブコントロール溶液は、動物に投与された場合に過敏性応答を誘導することが公知の少なくとも1つの化合物の有効量を含む。ポジティブコントロール溶液としての使用のための好ましい化合物としては、ヒスタミンが挙げら

50

れるが、これに限定されない。本発明のネガティブコントロール溶液は、動物に投与された場合に過敏性応答を誘導しないことが公知の溶液を含み得る。それ自体で、ネガティブコントロール溶液は、過敏性応答を本質的に誘導し得ない化合物を有する溶液を含み得るか、または処方物を調製するために使用される緩衝液（例えば、生理食塩水）を単に有する溶液を含み得る。好ましいネガティブコントロール溶液の例は、フェノレート化リン酸緩衝化生理食塩水（Greer Laboratories, Inc., Lenoir, NCから入手可能）である。

【0099】

本発明の1以上の処方物に対する動物の過敏性は、動物への1以上の実験サンプルおよびコントロールサンプルの投与から生じる反応を測定し（例えば、膨疹、硬化または硬度；当業者に公知の技術を使用して）、そして実験サンプルに対する反応を1以上のコントロール溶液の投与から生じる反応と比較することによって、評価され得る。皮内注射のための好ましいデバイスとしては、個々のシリンジが挙げられる。スクラッチのための好ましいデバイスとしては、一時に多くのサンプルの投与を可能にするデバイスが挙げられる。動物の過敏性は、本発明の処方物の投与から生じる反応が、ネガティブコントロールの投与から生じる反応よりも大きいか否かを決定することによってか、および/またはその処方物の投与から生じる反応が、ポジティブコントロール溶液の投与から生じる反応と少なくともおおよそ同じサイズであるか否かを決定することによって、評価され得る。それ自体で、実験サンプルが、動物へのポジティブコントロールサンプルの投与によって生じた膨疹のサイズより大きいかまたはそれに等しい反応を生じる場合、その動物は、その実験サンプルに対して過敏性である。反対に、実験サンプルが、動物へのネガティブコントロールサンプルの投与によって生じた反応に類似する反応を生じる場合、その動物は、その実験サンプルに対して過敏症ではない。

10

20

【0100】

動物の過敏症の評価のための好ましい膨疹サイズは、約16mm～約8mm、より好ましくは、約15mm～約9mm、そしてさらにより好ましくは、約14mm～約10mmの範囲の直径である。

【0101】

好ましくは、動物が本発明の処方物に対する即時型過敏性応答を生じる能力またはその過敏性応答を生じる能力がないことは、サンプルの投与後約2分～約30分で、より好ましくは、サンプルの投与後約10分～約25分で、そしてさらにより好ましくは、サンプルの投与後約15分で、膨疹サイズを測定することによって決定される。

30

【0102】

好ましくは、動物が本発明の処方物に対する遅延型過敏性応答を生じる能力およびその過敏性応答を生じる能力がないことは、サンプルの投与後約18時間～約30時間で、より好ましくは、サンプルの投与後約20時間～約28時間で、そしてさらにより好ましくは、サンプルの投与後約24時間で、硬化および/または紅斑を測定することによって決定される。遅延型過敏性応答はまた、他の技術を使用して（例えば、当業者に公知の技術を使用して、上記に直接規定した期間の間の投与部位での細胞浸潤の程度を決定することによって）測定され得る。

40

【0103】

好ましい実施形態において、本発明の皮膚試験は、Der HMW-mapタンパク質を含む有効量の処方物を動物に所定の部位で皮内注射する工程、および有効量のコントロール溶液を同じ動物に異なる部位で皮内注射する工程を包含する。多くの部位で複数のサンプルを同時に送達し得る（好ましくは、多くの処方物の同時の評価を可能にする）デバイスを使用することは、当業者の範囲内である。皮膚試験に使用するための好ましいDer HMW-mapタンパク質は、全長タンパク質を含む。好ましいポジティブコントロールサンプルは、ヒスタミンを含むサンプルであり得る。好ましいネガティブコントロールサンプルは、希釈剤を含むサンプルであり得る。

【0104】

50

本発明の皮膚試験を使用してDer HMW-mapタンパク質に対する過敏性について試験するために適切かつ好ましい動物は、本明細書中に開示される。本発明の皮膚試験で試験するために特に好ましい動物としては、ヒト、イヌ、ネコおよびウマが挙げられ、ヒト、イヌおよびネコが、さらにより好ましい。本明細書中で使用される場合、イヌとは、イヌ科の任意のメンバーをいい、これらには、家庭内のイヌ、野生のイヌおよび動物園のイヌが含まれる。イヌの例としては、家庭内のイヌ、野生のイヌ、キツネ、オオカミ、ジャッカルおよびコヨーテが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中で使用される場合、ネコとは、ネコ科の任意のメンバーをいい、これらには、家庭内のネコ、野生のネコおよび動物園のネコが含まれる。ネコの例としては、家庭内のネコ、ライオン、トラ、ヒョウ(leopard)、ヒョウ(panther)、ピューマ、ボブキャット、オオヤマネコ、ジャガー、チーターおよびサーバルが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中で使用される場合、ウマとは、ウマ科の任意のメンバーをいい、これらには、ウマ、ロバ、ラバおよびシマウマが挙げられる。

10

【0105】

本発明の1つの実施形態は、Der HMW-mapタンパク質に結合する抗体(本明細書中で抗Der HMW-map抗体といわれる)をインピトロで検出する方法である。この方法は、以下の工程を包含する:(a)単離されたHMW-mapタンパク質と推定抗Der HMW-map抗体含有組成物とを、Der HMW-mapタンパク質:抗体複合体を形成するに適切な条件下で接触させる工程;および(b)このDer HMW-mapタンパク質:抗体複合体を検出することにより、上記抗体の存在を検出する工程。このようなDer HMW-mapタンパク質:抗体複合体の存在は、動物が、ダニアルゲンに対する抗体を生成していることを示す。検出するための好ましい抗Der HMW-map抗体としては、IgEアイソタイプまたはIgGアイソタイプを有する抗体が挙げられる。検出するための好ましい抗Der HMW-map抗体としては、ネコ抗体、イヌ抗体、ウマ抗体、およびヒト抗体が挙げられ、ネコ、イヌおよびヒト抗体が特に好ましい。

20

【0106】

本明細書中で用いられる場合、用語「接触する(接触させる)」は、この場合、推定抗体含有組成物とDer HMW-mapタンパク質とを合わせるまたは混合することをいう。Der HMW-mapタンパク質と抗体との間の複合体の形成は、測定され得る(すなわち、検出され得る)安定な複合体を形成するために、Der HMW-mapタンパク質がこの抗体に選択的に結合する能力をいう。本明細書中で用いられる場合、用語、抗体に選択的に結合するとは、Der HMW-mapタンパク質に特異的に結合しない他の抗体に実質的に結合することなく、本発明のDer HMW-mapタンパク質が抗体に優先的に結合する能力をいう。Der HMW-mapタンパク質と抗体との間の結合は、複合体を形成するに適切な条件下でもたらされる;このような条件(例えば、適切な濃度、緩衝液、温度、反応時間)ならびにこのような条件を最適化する方法は、当業者に公知であり、例が本明細書中に開示される。複合体形成条件の例はまた、例えば、Sambrook et al., (同書)に開示される。

30

【0107】

本明細書中で用いられる場合、用語「複合体形成を検出する」とは、任意の複合体が形成されたか否かを決定すること(すなわち、複合体の存在(すなわち、実在)をアッセイすること)をいう。複合体が形成されると、形成された複合体の量が決定されるが、必ずしも必要ではない。Der HMW-mapタンパク質と組成物中の抗体との間の複合体形成、または選択的結合が、当該分野で標準的な種々の方法(例えば、Sambrook et al. (同書)を参照のこと)を用いて測定され得る(すなわち、検出、決定され得る)。これらの例は、本明細書中に開示される。

40

【0108】

1つの実施形態において、本発明の方法の推定抗体含有組成物は、動物由来の生物学的サンプルを含む。適切な生物学的サンプルとしては、体液組成物または細胞組成物が挙げら

50

れるが、これらに限定されない。体液とは、動物から集められ得る（すなわち、得られ得る）任意の流体をいい、これらの例としては、血液、血清、血漿、尿、涙、水溶性体液（aqueous humor）、脳脊髄液（CSF）、唾液、リンパ、鼻分泌物、乳汁、および糞便が挙げられるが、これらに限定されない。このような本発明の組成物は、体液中に存在する免疫グロブリンの非IgEまたは非IgGアイソタイプおよび/または他のタンパク質（例えば、アルブミン）の少なくともいくつかを除去するために予め処理され得るが、必ずしも必要ではない。このような除去としては、体液と、レクチンである jacalin または IgA 免疫グロブリンの定常領域に特異的に結合する抗体（すなわち、抗 IgA アイソタイプ抗体）のような物質を接触させて、IgA 抗体を除去すること、および/あるいはこの体液を、例えば、コンカナバリン A または プロテイン G に、それぞれ曝すことにより、IgE 抗体または IgG 抗体を体液の他の成分からアフィニティー精製することが挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態において、組成物は、体液中に含まれる免疫グロブリンを濃縮するために予め処理された、集められた体液を含む。例えば、体液中に含まれる免疫グロブリンは、硫酸アンモニウムを用いて他のタンパク質から沈殿され得る。本発明の好ましい組成物は、血清である。

10

【0109】

別の実施形態において、本発明の方法の抗体含有組成物としては、IgE もしくは IgG を生成する細胞が挙げられる。このような細胞は、細胞の表面に結合した IgE もしくは IgG を有し得るか、そして/あるいは IgE もしくは IgG を分泌し得る。このような細胞の例としては、骨髄腫細胞が挙げられる。IgE もしくは IgG は、細胞の膜に直接結合するか、または細胞の表面に結合した分子（例えば、抗原）に結合するかのいずれかで、細胞の表面に結合され得る。

20

【0110】

複合体は、種々の方法において検出され得、これらの方法としては以下の1以上のアッセイの使用が挙げられるが、これらに限定されない：酵素結合イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、化学発光アッセイ、側流（lateral flow）アッセイ、凝集アッセイ、粒子ベースのアッセイ（例えば、磁性粒子またはプラスチックポリマー（例えば、ラテックスまたはポリスチレンビーズ）のような粒子が挙げられるが、これらに限定されない粒子を用いる）、免疫沈降アッセイ、BioCoreTM アッセイ（例えば、金コロイドを用いる）、および免疫プロットングアッセイ（例えば、ウェスタンブロット）。このようなアッセイは、当業者に周知である。アッセイは、結果がどのように用いられ得るかに依存して、定性的結果または定量的結果を与えるために用いられ得る。例えば、凝集、粒子分離、および免疫沈降のようないくつかのアッセイは、検出可能なマーカーを必要とすることなく、視覚的に観察され得る（例えば、肉眼または濃度計または分光光度計のような機械のいずれかにより）。

30

【0111】

他のアッセイにおいて、検出可能なマーカーの Der HMW-map タンパク質、Der HMW-map タンパク質に結合した抗体、または Der HMW-map タンパク質もしくは Der HMW-map タンパク質に結合した抗体に選択的に結合する試薬（以下により詳細に記載される）への結合体化（すなわち、結合）は、複合体形成の検出を補助する。検出可能なマーカーの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：放射活性標識、酵素、蛍光標識、化学発光標識、色素生成標識またはリガンド。リガンドとは、別の分子に選択的に結合する分子をいう。好ましい検出可能なマーカーとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：フルオレセイン、放射性同位体、ホスファターゼ（例えば、アルカリホスファターゼ）、ビオチン、アビジン、ペルオキシダーゼ（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ）、およびビオチン関連化合物またはアビジン関連化合物（例えば、ストレプトアビジンまたは Pierce, Rockford, IL から市販される ImmunoPure（登録商標）NeutrAvidin）。

40

【0112】

1つの実施形態において、複合体は、推定抗体含有組成物と、検出可能なマーカーに結合

50

体化される Der HMW-map タンパク質とを接触させることにより検出される。Der HMW-map タンパク質に結合体化するための適切な検出マーカーとしては、放射活性標識、蛍光標識、酵素標識、化学発光標識、色素生成標識またはリガンドが挙げられるが、これらに限定されない。検出可能なマーカーは、Der HMW-map タンパク質が検出される抗体に結合する能力をブロックしないように、Der HMW-map タンパク質に結合体化される。

【0113】

別の実施形態において、Der HMW-map タンパク質：抗体複合体は、推定抗体含有組成物と Der HMW-map タンパク質とを接触させ、次いで、この複合体と、指標分子とを接触させることにより検出される。本発明の適切な指標分子としては、Der HMW-map タンパク質または Der HMW-map タンパク質に結合した抗体のいずれかに結合し得る分子が挙げられる。このように、指標分子は、Der HMW-map タンパク質：抗体複合体のどの部分が検出されるかに依存して、例えば、抗原および抗体を含み得る。抗体である好ましい指標分子としては、例えば、抗 IgE 抗体、抗 IgG 抗体、および Der HMW-map タンパク質に結合するが、Der HMW-map タンパク質上の異なるエピトープに結合することが既知の推定抗体含有組成物中で同定された抗体以外の抗体が挙げられる。好ましいレクチンとしては、高マンノース基に結合するレクチンが挙げられる。指標分子自体は、本発明の検出可能なマーカーに結合され得る。例えば、抗体は、ビオチン、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼまたはフルオレセインに結合体化され得る。

【0114】

1つの好ましい実施形態において、Der HMW-map タンパク質：抗体複合体は、この複合体と、IgE 抗体に選択的に結合する指標分子（本明細書中で抗 IgE 試薬といわれる）または IgG 抗体に選択的に結合する指標分子（本明細書中で抗 IgG 試薬といわれる）とを接触させることにより検出される。このような抗 IgE または抗 IgG 抗体の例としては、抗アイソタイプ抗体である 2 次抗体（例えば、IgE もしくは IgG の定常領域に選択的に結合する抗体）、抗体結合細菌表面タンパク質（例えば、プロテイン A またはプロテイン G）、抗体結合細胞（例えば、B 細胞、T 細胞、ナチュラルキラー細胞、多形核白血球細胞、単球またはマクロファージ細胞）、抗体結合真核生物細胞表面タンパク質（例えば、Fc レセプター）、および抗体結合補体タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい指標分子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗ネコ IgE 抗体、抗ネコ IgG 抗体、抗イヌ IgE 抗体、抗イヌ IgG 抗体、抗ヒト IgE 抗体、および抗ヒト IgG 抗体。本明細書中で用いられる場合、抗 IgE 抗体または抗 IgG 抗体は、完全な抗体のみならず、IgE もしくは IgG 重鎖定常領域に選択的に結合し得るその任意のサブユニットもしくは一部もまた含み得る。例えば、抗 IgE 試薬または抗 IgG 試薬としては、Fab フラグメントまたは F(ab')₂ フラグメントが挙げられ、これらはともに、Janeway et al., Immunobiology, the Immune System in Health and Disease, Garland Publishing, Inc., NY, 1996 に詳細に記載される。

【0115】

別の好ましい実施形態において、Der HMW-map タンパク質：抗体複合体は、この複合体と、推定抗体含有組成物中の抗体が Der HMW-map タンパク質に結合するエピトープ以外の異なるエピトープで、Der HMW-map タンパク質に選択的に結合する指標分子とを接触させることにより検出される。

【0116】

1つの実施形態において、複合体は、溶液中で形成され、検出され得る。別の実施形態において、複合体が形成され、ここで、この複合体の 1 以上のメンバーが基材に固定化（例えば、基材上にコーティング）される。固定化技術は、当業者に公知である。適切な基材材料としては、プラスチック、硝子、ゲル、セルロイド、紙、PVDF（ポリ-ビニリデ

ン・フルオリド)、ナイロン、ニトロセルロース、および粒子物質(例えば、ラテックス、ポリスチレン、ナイロン、ニトロセルロース、アガロースおよび磁性樹脂)が挙げられるが、これらに限定されない。基材材料の適切な形状としては、ウェル(例えば、マイクロタイターディッシュウェル)、プレート、ディップスティック、ビーズ、側流装置、膜、フィルター、管、ディッシュ、セルロイド型マトリックス、磁性粒子、および他の粒子物質が挙げられるが、これらに限定されない。特に好ましい基材は、ELISAプレート、ディップスティック、ラジオイムノアッセイプレート、アガロースビーズ、プラスチックビーズ、ラテックスビーズ、イムノプロット膜およびイムノプロットペーパーを含む。1つの実施形態において、基材(例えば、粒子物質)としては、検出可能なマーカを含み得る。

10

【0117】

Der HMW-mapタンパク質に結合する抗体を検出するための好ましい方法は、免疫吸着アッセイである。本発明の免疫吸着アッセイは、捕捉分子および指標分子を含む。本発明の捕捉分子は、IgEもしくはIgGが基材に固定化される様式で、IgEもしくはIgGに結合する。このように、捕捉分子は、好ましくは、本発明の基材に固定化され、その後、推定IgE含有組成物または推定IgG含有組成物に捕捉分子が曝される。本発明の指標分子は、捕捉分子に結合したIgEもしくはIgGの存在を検出する。このように、指標分子は、好ましくは、推定IgE含有組成物または推定IgG含有組成物に捕捉分子を曝す前に、捕捉分子と同じ基材に固定化されない。

20

【0118】

好ましい免疫吸着アッセイ法は、以下のいずれかの工程を包含する:(a) Der HMW-mapタンパク質を基材上に固定化した後に、Der HMW-mapタンパク質と、推定IgE含有組成物もしくは推定IgG含有組成物とを接触させて、Der HMW-mapタンパク質-固定化基材を形成する工程;および(b) Der HMW-mapタンパク質と、推定IgE含有組成物または推定IgG含有組成物を接触させて、推定IgE含有組成物結合基材または推定IgG含有組成物結合基材を形成する前に、推定IgE含有組成物または推定IgG含有組成物を基材に結合させる工程。好ましくは、基材としては、コーティングしていない基材、Der HMW-mapタンパク質固定化基材、抗IgE抗体固定化基材、抗IgG抗体固定化基材が挙げられる。

30

【0119】

本発明の捕捉分子および指標分子はともに、IgE、IgGまたはDer HMW-mapタンパク質に結合し得る。好ましくは、捕捉分子は、指標分子と異なるIgE、IgGまたはDer HMW-mapタンパク質の領域に結合し、それにより、捕捉分子が、指標分子と同時にIgE、IgGまたはDer HMW-mapタンパク質に同時に結合することを可能にする。捕捉分子または指標分子としての試薬の使用は、この分子がIgE、IgGまたはDer HMW-mapタンパク質に曝された場合に、基材に固定化されているか否かに依存する。例えば、本発明のDer HMW-mapタンパク質は、Der HMW-mapタンパク質が基材に結合している場合に捕捉分子として用いられる。あるいは、Der HMW-mapタンパク質は、Der HMW-mapタンパク質が基材に結合していない場合に指標分子として用いられる。捕捉分子または指標分子としての使用に適切な分子としては、本発明のDer HMW-mapタンパク質、本発明の抗IgE抗体試薬または抗IgG抗体試薬が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0120】

本発明の免疫吸着アッセイは、1以上の層および/または型の指標分子の存在を検出し得る第2の分子または他の結合分子を含み得る。例えば、指標分子に選択的に結合する、タグ化されていない(すなわち、検出可能なマーカに結合体化されていない)二次抗体は、この二次抗体に選択的に結合する、タグ化された(すなわち、検出可能なマーカに結合体化されている)三次抗体に結合され得る。適切な二次抗体、三次抗体および他の二次分子または三次分子は、当業者により選択され得る。本発明の好ましい二次分子としては、抗原、抗IgEイディオタイプ抗体(すなわち、抗IgE抗体に独特のエピトープに結

50

合する抗体)、抗IgEアイソタイプ抗体、抗IgGイデオタイプ抗体(すなわち、抗IgG抗体に独特のエピトープに結合する抗体)、および抗IgGアイソタイプ抗体が挙げられる。好ましい三次分子は、この二次分子の特徴に基づいて当業者により選択され得る。同じストラテジーが引き続き階層に適用される。

【0121】

1つの実施形態において、Der HMW-mapタンパク質は、基材(例えば、マイクロタイターディッシュウェルまたはディップスティック)に固定化されることにより捕捉分子として用いられる。動物から集められる生物学的サンプルは、基材に適用され、そして基材に結合されるDer HMW-mapタンパク質:抗体複合体形成を可能にする(すなわち、サンプル中のIgEもしくはIgGが、基材上に固定化されたDer HMW-mapタンパク質に結合する)に適切な(すなわち、十分な)条件下でインキュベートされる。過剰な非結合物質(すなわち、Der HMW-mapタンパク質に結合していない生物学的サンプル由来の物質)は、存在するならば、基材に結合している抗原:抗体複合体を保持する条件下で基材から除去される。好ましい条件は、一般に、Sambrookら(同書)に開示される。抗原に結合したIgEもしくはIgGに選択的に結合し得る指標分子が基材に添加され、この指標分子とDer HMW-mapタンパク質:抗体複合体との間で複合体を形成するようにインキュベートされる。過剰な指標分子は除去され、発色剤が必要ならば添加され、基材は、分析のために検出デバイスに供される。この実施形態に好ましい指標分子は、Der HMW-mapタンパク質に結合したIgG抗体を検出するための抗IgG抗体、またはDer HMW-mapタンパク質に結合したIgE抗体を検出するための抗IgE抗体である。好ましくは、この抗IgG抗体または抗IgE抗体は、ビオチン、蛍光標識または酵素標識に結合体化される。

【0122】

1つの実施形態において、この抗IgE抗体または抗IgG抗体(すなわち、アイソタイプ特異的抗体またはイデオタイプ特異的抗体)は、基材(例えば、マイクロタイターディッシュウェルまたはディップスティック)上に固定化されることにより捕捉分子として用いられる。動物から集められた生物学的サンプルは、この基材に適用され、この基材に結合した、抗IgE抗体:IgE複合体または抗IgG抗体:IgG複合体それぞれの形成を可能にするに適切な条件下でインキュベートされる。過剰な非結合物質は、存在するならば、基材に結合している抗IgE抗体:IgE複合体または抗IgG抗体:IgG複合体を保持する条件下で基材から除去される。Der HMW-mapタンパク質がこの基材に添加され、Der HMW-mapタンパク質と抗IgE抗体:IgE複合体または抗IgG抗体:IgG複合体との間で複合体の形成を可能にするようにインキュベートされる。好ましくは、Der HMW-mapタンパク質は、検出可能なマーカー(好ましくは、ビオチン、酵素標識または蛍光標識)に結合体化される。過剰なDer HMW-mapタンパク質は除去され、発色剤が必要ならば添加され、この基材は、分析のために検出デバイスに供される。

【0123】

1つの実施形態において、本発明の免疫吸着アッセイは、捕捉分子を利用しない。この実施形態において、動物から集められた生物学的サンプルは、基材(例えば、マイクロタイターディッシュウェルまたはディップスティック)に適用され、基材へのIgEもしくはIgGの結合を可能にするに適切な条件下でインキュベートされる。体液中に存在する任意のIgEもしくはIgGは、基材に固定化される。過剰な非結合物質は、存在するならば、基材へのIgEもしくはIgGの結合を保持する条件下で基材から除去される。Der HMW-mapタンパク質がこの基材に添加され、Der HMW-mapタンパク質とIgEもしくはIgGとの間の複合体の形成を可能にするようにインキュベートされる。好ましくは、Der HMW-mapタンパク質は、検出可能なマーカー(好ましくは、ビオチン、酵素標識または蛍光標識)に結合体化される。過剰なDer HMW-mapタンパク質は除去され、発色剤が必要ならば添加され、この基材は、分析のために検出デバイスに供される。

【0124】

I g EもしくはI g Gを検出するための別の好ましい方法は、側流アッセイであり、この例は、Pronovost et alによる米国特許第5,424,193号(1995年6月13日発行); Imrich et alによる米国特許第5,415,994号(1995年5月16日発行); Miller et alによるWO94/29696(1994年12月22日公開); およびPawlak et alによるWO94/01775(1994年1月20日公開)に開示される。1つの実施形態において、生物学的サンプルは、以下の構成要素を備える側流装置に配置される：(a) 流路を規定する支持体構造；(b) Der HMW-mapタンパク質に結合体化したビーズを含む標識試薬(この標識試薬は、標識ゾーンにおける支持体構造内に注入される)；および(c) I g E結合組成物またはI g G結合組成物を含む捕捉試薬。この捕捉試薬は、標識試薬が、標識ゾーンから捕捉ゾーンへ流れ得る様式で、標識ゾーンに流体接続された捕捉ゾーン内で標識試薬の下流に配置される。この支持体構造は、標識ゾーンから捕捉ゾーンへビーズの流れを妨害しない物質を含む。支持体構造として使用するに適切な材料としては、イオン性(すなわち、陰イオン性または陽イオン性)物質が挙げられる。このような材料の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ニトロセルロース(NC)、P V D F、カルボキシメチルセルロース(CM)。この支持体構造は、流路を規定し、この流路は、側方にあり、ゾーン(すなわち、標識ゾーンおよび捕捉ゾーン)に分けられる。この装置は、流路に沿って位置した、より好ましくは標識試薬の上流に位置したサンプル受容ゾーンをさらに備え得る。この支持体構造中の流路は、捕捉ゾーンの下流、好ましくは流路の端部の支持体構造の一部と、標識ゾーンおよび捕捉ゾーンからの過剰な試薬を吸着し得る吸着剤とを接触させることにより作製される。

【0125】

この実施形態において、生物学的サンプルは、支持体構造の一部を備えるサンプル受容ゾーンに適用される。この標識ゾーンは、サンプルを、流路により下流に方向付けられたサンプル受容ゾーンから受容する。標識ゾーンは、I g EもしくはI g G、またはその両方に結合する標識試薬を含む。好ましい標識試薬は、直接またはリンカーを介してかのおいづれかでプラスチックビーズ基材(例えば、ラテックスビーズ)に結合体化されたDer HMW-mapタンパク質である。この基材はまた、検出可能なマーカ(好ましくは、色素生成マーカ)を含む。代表的には、標識試薬は、乾燥または凍結乾燥することにより支持体構造に注入される。サンプル構造はまた、標識ゾーンの下流にある捕捉ゾーンを備える。この捕捉ゾーンは、流路により下流に方向付けられた標識ゾーンから標識試薬を受容する。この捕捉ゾーンは、捕捉ゾーンにおいてDer HMW-mapタンパク質に複合体化されたI g Eおよび/もしくはI g Gを固定化する捕捉試薬(この場合、上記の抗I g E抗体または抗I g G抗体、またはその両方)を含む。この捕捉試薬は、好ましくは、乾燥または凍結乾燥することにより支持体構造に固定される。この標識試薬は、捕捉ゾーンに蓄積し、この蓄積は、肉眼でまたは光学検出デバイスにより評価される。

【0126】

別の実施形態において、I g EもしくはI g Gを検出するために用いられる側流装置は、以下を備える：(a) 流路を規定する支持体構造；(b) 上記の抗I g E抗体もしくは抗I g G抗体、またはその両方を含む標識試薬(この標識試薬は、標識ゾーンにおける支持体構造内に注入される)；および(c) Der HMW-mapタンパク質を含む捕捉試薬(この捕捉試薬は、標識試薬が、標識ゾーンから捕捉ゾーンへ流れ得る様式で、標識ゾーンに流体接続された捕捉ゾーン内で標識試薬の下流に位置している)。この装置はまた、好ましくは、流路に沿って位置した、好ましくは、標識試薬の上流に位置したサンプル受容ゾーンを備える。この装置はまた、好ましくは、流路の端部に位置した吸着剤を含む。

【0127】

Der HMW-mapタンパク質に過剰に感受性の動物は、体液のサンプルを用いた免疫複合体形成のレベルと、コントロールサンプルを用いた免疫複合体形成のレベルとを比

較することにより同定される。免疫複合体とは、抗体およびDer HMW-mapタンパク質を含む複合体（すなわち、Der HMW-mapタンパク質：抗体複合体）をいう。このように、陽性コントロールサンプルを用いると、免疫複合体が形成され、陰性コントロールサンプルを用いると形成されない。このように、体液サンプルが陽性コントロールサンプルを用いた免疫複合体形成以上の免疫複合体形成を生じる場合、この体液が採取された動物は、基材に結合したDer HMW-mapタンパク質に過剰に感受性である。逆に、体液サンプルが陰性コントロールサンプルを用いた免疫複合体形成に類似の免疫複合体形成を生じる場合、この体液が採取された動物は、基材に結合したDer HMW-mapタンパク質に過剰に感受性ではない。

【0128】

10

2以上の異なる皮膚試験および/またはインビトロ試験が、診断目的で用いられ得ることは、本発明の範囲内である。例えば、動物がDer HMW-mapタンパク質に対して直ぐに過剰反応することは、動物の体液中のDer HMW-mapタンパク質に特異的なIgE抗体を検出し得るインビトロ免疫吸着アッセイを用いて試験され得る。Der HMW-mapタンパク質に対する遅延型過敏症を示す大部分の動物はまた、アレルゲンに対する即時型過敏症を示す一方、アレルゲンに対して遅延型過敏症を示す少数の動物は、このアレルゲンに対する即時型過敏症を示さない。このような場合、IgE特異的インビトロ試験からのネガティブな結果に従って、動物のDer HMW-mapタンパク質に対する遅延型過敏症は、本発明の皮膚試験を用いて試験され得る。

【0129】

20

本発明はまた、開示された検出方法の各々に基づいて、Der HMW-mapタンパク質に特異的に結合する抗体を検出するためのキットを含む。1つの実施形態は、Der HMW-mapタンパク質特異的抗体を検出するためのキットであり、このキットは、Der HMW-mapタンパク質およびIgEおよび/もしくはIgGを検出するための手段を含む。検出の適切な手段は、Der HMW-mapタンパク質またはIgEおよび/もしくはIgGのいずれかに結合する、本明細書中に開示された化合物を含む。本発明の好ましいキットは、本明細書中に開示されたIgEもしくはIgGに選択的に結合し得る抗体および/またはDer HMW-mapタンパク質に結合体化した検出可能なマーカに結合し得る化合物（例えば、検出可能なマーカがビオチンの場合に、アビジン、ストレプトアビジンおよびImmunoPure（登録商標）NeutrAvidin）を含む検出手段を含む。

30

【0130】

本発明の別の好ましいキットは、アレルゲンキットであり、このキットは、Der HMW-mapタンパク質、およびダニアレルゲンと同じ環境中で一般に検出されるアレルゲンを含む。本発明のキットとともに使用するための適切かつ好ましいダニ関連アレルゲンは、本明細書中に開示されるダニ関連アレルゲンが挙げられる。

【0131】

本発明の好ましいキットは、Der HMW-mapタンパク質が基材に固定化されたキットを含む。キットがDer HMW-mapタンパク質および別のアレルゲンを含む場合、このキットは、1以上の組成物を含み、各組成物は、1つのアレルゲンを含む。このように、各アレルゲンは、別々に試験され得る。キットはまた、IgEもしくはIgGのための2以上の診断試薬、または本明細書中に開示される他の化合物を含み得る。側流アッセイ形式に用いられるキットが特に好ましい。側流アッセイキットが1以上の側流アッセイ装置を備え得ることは、本発明の範囲内である。複数の側流装置は、各々の装置の一方の端部で互いに結合され得、それにより、扇様構造が生じ得る。

40

【0132】

本発明の別の局面としては、ダニアレルギーに罹りやすいかまたはダニアレルギーを有する動物を、本発明のDer HMW-mapタンパク質処方物で処置する工程を包含する。本発明に従って、用語処置とは、ダニアレルゲンに対する、動物による過敏応答の調節をいい得る。調節は例えば、動物の過敏応答に関与する細胞の免疫調節を含み得る。免疫

50

調節は、免疫応答に代表的に関与する分子（例えば、抗体、抗原、主要組織適合遺伝子分子（MHC）およびMHC分子と同時に反応する分子）の活性を調節することを含み得る。特に、免疫調節とは、過敏応答に関与する細胞の炎症応答、免疫抑制および免疫寛容化をもたらす、抗原：抗体相互作用の調節をいう。免疫抑制とは、例えば、免疫応答に関与する特定の細胞を殺傷することによって、免疫応答を阻害することをいう。免疫寛容化とは、免疫応答に関与する特定の細胞をアネルギー化（*anergizing*）する（すなわち、抗原に対するT細胞の反応性を減少させる）ことによって、免疫応答を阻害することをいう。

【0133】

本発明の1つの実施形態は、本発明のDer HMW-mapタンパク質に対する免疫応答を阻害し得る脱感作化合物を含む治療組成物である。このような脱感作化合物としては、ブロッキング化合物、寛容原（*toleragen*）および/またはサプレッサー化合物が挙げられる。ブロッキング化合物としては、炎症応答をもたらし得る抗原：抗体相互作用を調節し得る化合物が挙げられ、寛容原は、動物を免疫寛容化し得る化合物であり、そしてサプレッサー化合物は、動物を免疫抑制し得る。本発明の脱感作化合物は、可溶性または膜結合性であり得る。膜結合性脱感作化合物は、生体膜（細胞、リポソーム、平面膜またはミセルを含む）と会合し得る。本発明の可溶性脱感作化合物は、以下の目的に有用である：（1）IgE：抗原媒介性の肥満細胞の脱顆粒をブロックすることによってI型過敏性反応を阻害すること；（2）細胞の補体破壊に至るIgG：抗原複合体形成をブロックすることによってIII型過敏性反応を阻害すること；および（3）マクロファージによるサイトカイン分泌のTヘルパー細胞刺激をブロックすることによってIV型過敏性反応を阻害すること。本発明の膜結合性脱感作化合物は、以下の目的に有用である：（1）細胞の補体破壊に至る、細胞表面でのIgG：抗原複合体形成をブロックすることによってII型過敏性反応を阻害すること；（2）免疫細胞におけるIgGによって調節されるシグナル伝達をブロックすることによってII型過敏性反応を阻害すること；および（3）抗原保有細胞のT細胞傷害性細胞殺傷をブロックすることによってIV型過敏性反応を阻害すること。脱感作化合物の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：本発明のムテイン、ミメトープ（*mimetope*）および抗体、ならびに本発明のタンパク質とIgEとの間の結合を阻害する、本発明の他のインヒビター。

【0134】

本発明の脱感作化合物はまた、脱感作化合物を、Der HMW-mapタンパク質に対する過敏応答に関与する特定の細胞へと標的化し得るリガンド分子に共有結合によって連結され得る。脱感作化合物を連結するために用いられる適切なリガンドとしては、例えば、免疫グロブリン分子、サイトカイン、レクチン、異種アレルゲン、CD8分子または主要組織適合遺伝子分子（例えば、MHCクラスIまたはMHCクラスII分子）の、少なくとも一部が挙げられる。脱感作化合物に連結するための、免疫グロブリン分子の好ましい部分としては、免疫細胞特異的表面分子に結合し得る可変領域、および免疫細胞上のFcレセプターに結合し得る定常領域（特に、IgEの定常領域）が挙げられる。好ましいCD8分子としては、CD8の鎖の少なくとも細胞外機能ドメインが挙げられる。免疫細胞とは、免疫応答に関与する細胞（特に、MHCクラスI分子またはMHCクラスII分子を有する細胞）をいう。好ましい免疫細胞としては、抗原提示細胞、T細胞およびB細胞が挙げられる。

【0135】

1つの実施形態では、本発明の治療組成物は、本発明のDer HMW-mapタンパク質、そのミメトープもしくはムテイン、または本発明のDer HMW-map核酸分子を含む。ダニアレルギーを処置するための本発明の適切な治療組成物は、Der HMW-mapタンパク質、そのミメトープもしくはムテイン、または本発明のDer HMW-map核酸分子を含む。好ましい治療組成物は、以下を含む：ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号1

1、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号18、配列番号21、配列番号23、配列番号24、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号33、配列番号35、配列番号38、配列番号41および配列番号44からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする核酸分子の相補体とハイブリダイズする、単離されたダニアレゲン性タンパク質をコードする核酸分子；ダニアレゲン性タンパク質のミメトープ；ダニアレゲン性タンパク質のムテイン；ならびに以下からなる群より選択される単離された核酸分子：少なくとも約150ヌクレオチドを含む核酸分子であって、ここで、少なくとも約150ヌクレオチドを含む核酸分子は、1×SSCおよび0%ホルムアミドを含む溶液中で、約50の温度で、配列番号14、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号22、配列番号34、配列番号36、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号42、配列番号43、配列番号45からなる群より選択される核酸配列、ならびに配列番号33のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列およびその相補体に対してハイブリダイズする、核酸分子；ならびに少なくとも約150ヌクレオチドを含む、上記の核酸分子のいずれかのフラグメントを含む核酸分子。好ましいDer HMW-mapムテインは、Der HMW-mapタンパク質の少なくとも一部を含み、ここで、適切な数のシステイン残基は、除去されているかまたは非システイン残基で置換されており、その結果、変更されたDer HMW-mapタンパク質は、動物に対して毒性ではない（例えば、アナフィラキシーを引き起こさない）。

【0136】

別の実施形態では、本発明の治療組成物は、動物中で、Der HMW-mapタンパク質へのその核酸分子の発現を可能にする様式でその動物に投与され得る、Der HMW-mapタンパク質をコードする核酸分子を含む。核酸分子は、以下を含むがそれらに限定されない種々の方法で、動物へと送達され得る：(a)裸の（すなわち、ウイルスのコートにも細胞膜にもパッケージングされていない）核酸分子（例えば、例えば、Wolfら、1990, Science 247, 1465-1468に教示されるように、裸のDNA分子またはRNA分子として）を投与すること、または(b)組換えウイルスまたは組換え細胞としてパッケージングされた核酸分子を投与すること（すなわち、核酸分子は、ウイルスビヒクルまたは細胞ビヒクルによって送達される）。

【0137】

本発明の裸の核酸分子としては、本発明の核酸分子が挙げられ、そして好ましくは、好ましくは複製能力、さもなければ増幅能力のある、本発明の組換え分子が挙げられる。本発明の裸の核酸は、例えば、ニシストロン性組換え分子の形態の、例えば、1以上の内部リボゾーム侵入部位を有する、本発明の1以上の核酸分子を含み得る。好ましい裸の核酸分子は、ウイルスゲノムの少なくとも一部（すなわち、ウイルスベクター）を含む。好ましいウイルスベクターとしては、アルファウイルス、ポックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ピコルナウイルスおよびレトロウイルスに基づくウイルスベクターが挙げられ、アルファウイルス（例えば、シンドビスウイルスまたはセムリキウイルス）、種特異的ヘルペスウイルスおよび種特異的ポックスウイルスに基づくウイルスベクターが特に好ましい。タンパク質産生に適切であると開示されている転写制御配列を含め、任意の適切な転写制御配列が用いられ得る。特に好ましい転写制御配列としては、サイトメガロウイルスの前初期（好ましくは、イントロン-Aに関連して）、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復、および組織特異的転写制御配列、ならびにウイルスベクターを用いる場合は、ウイルスベクターに対して内因性である転写制御配列が挙げられる。「強力な」ポリ(A)配列の取り込みもまた好ましい。

【0138】

本発明の裸の核酸分子は、種々の方法によって投与され得る。適切な送達方法としては、例えば、筋肉内注射、皮下注射、皮内注射、皮内乱切、パーティクルボンバードメント、経口適用および鼻適用が挙げられ、筋肉内注射、皮内注射、皮内乱切およびパーティクルボンバードメントが好ましく、そして筋肉内注射がさらにより好ましい。好ましい単一用

量の裸のDNA分子は、当業者によって決定され得るように、投与経路および/または送達方法に依存して、約1ナノグラム (ng) ~ 約1ミリグラム (mg) の範囲にわたる。投与方法の例は、例えば、米国特許第5,204,253号 (Brunerらによる、1993年4月20日発行)、PCT公開番号WO 95/19799 (1995年7月27日公開、McCabeによる) およびPCT公開番号WO 95/05853 (1995年3月2日公開、Carsonらによる) に開示される。本発明の裸のDNA分子は、水性賦形剤 (例えば、リン酸緩衝化生理食塩水) 中に、および/もしくはキャリア (例えば、脂質に基づくビヒクル) を伴って含まれ得るか、または微粒子 (例えば、金粒子) に結合され得る。

【0139】

本発明の組換えウイルスは、ウイルスコート中にパッケージングされ、かつ投与後に動物中で発現され得る、本発明の組換え分子を含む。好ましくは、この組換え分子は、パッケージングが欠損しているか、そして/または弱毒化ウイルスをコードする。アルファウイルス、ボックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ピコルナウイルスおよびレトロウイルスに基づくウイルスを含むがこれらに限定されない、多数の組換えウイルスが用いられ得る。好ましい組換えウイルスは、アルファウイルス (例えば、シンドビスウイルス)、ラクーンボックスウイルス、種特異的ヘルペスウイルスおよび種特異的ボックスウイルスに基づくウイルスである。アルファウイルス組換えウイルスを産生しそして使用するための方法の一例は、PCT公開番号WO 94/17813号 (Xiongらによる、1994年8月18日公開) に開示される。

【0140】

動物に投与される場合、本発明の組換えウイルスは、レシピエント動物内で細胞に感染し、そしてDer HMW-mapタンパク質媒介生物学的応答をその動物内で減少させ得る、タンパク質またはRNA核酸分子の産生を指向する。例えば、本発明のDer HMW-map核酸分子を含む組換えウイルスは、その動物内で、Der HMW-mapタンパク質媒介生物学的応答を減少させるに十分な量のタンパク質またはRNAの産生をもたらすプロトコルに従って投与される。好ましい単回用量の本発明の組換えウイルスは、その動物の体重1キログラムあたり約 1×10^4 ~ 約 1×10^7 ウイルスプラーク形成単位 (pfu) である。投与プロトコルは、タンパク質に基づく組成物について本明細書中に記載された投与プロトコルと類似し、皮下投与経路、筋肉内投与経路、鼻腔内投与経路および経口投与経路が好ましい。

【0141】

本発明の組換え細胞ワクチンは、本発明の少なくとも1つのタンパク質を発現する、本発明の組換え細胞を含む。この実施形態のために好ましい組換え細胞としては、Salmonella、E. coli、Listeria、Mycobacterium、S. frugiperda、酵母 (Saccharomyces cerevisiae および Pichia pastoris を含む)、BHK、CV-1、筋芽細胞G8、COS (例えば、COS-7)、Vero、MDCK および CRFK 組換え細胞が挙げられる。本発明の組換え細胞ワクチンは、種々の方法で投与され得るが、これらは、経口的に (好ましくは、体重1キログラムあたり約 10^8 細胞 ~ 約 10^{12} 細胞の範囲にわたる用量で) 投与され得るという利点を有し得る。投与プロトコルは、タンパク質に基づくワクチンについて本明細書中に記載された投与プロトコルと類似する。組換え細胞ワクチンは、細胞全体、細胞壁が剥がれた細胞または細胞溶解産物を含み得る。

【0142】

本発明の治療組成物が、ダニアレルギーに対して動物を脱感作する効力 (有効性) を、本明細書に記載されるインビボ皮膚試験方法、処置される動物における細胞免疫活性の検出、または、本発明のDer HMW-mapタンパク質に対して特異的に結合するIgEのレベルの決定を用いるがこれに限定されない種々の方法で試験し得る。動物における細胞免疫活性およびIgEレベルを決定する方法は、当業者に公知である。1つの実施形態において治療組成物は、イヌ、ネコ、ウサギ、およびマウスのような動物モデルにおいて

10

20

30

40

50

試験され得、そしてまたヒトにおいて試験され得る。このような技術は、当業者に公知である。

【0143】

本発明の治療組成物とともに使用するための好ましい核酸分子としては、本明細書に開示される任意の Der HMW-map 核酸分子、詳細には、配列番号14、配列番号16、配列番号17、配列番号19、配列番号20、配列番号22、配列番号34、配列番号36、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号42、配列番号43、配列番号45、および/またはアミノ酸配列である配列番号33を含むタンパク質をコードする核酸配列、ならびにそれらの相補体が挙げられる。

【0144】

本発明の治療組成物において有用な組み換え細胞としては、本発明の Der HMW-map タンパク質を含む、本発明の組み換え細胞が挙げられる。本実施形態に好ましい組み換え細胞としては、Salmonella, E. coli, Listeria, Mycobacterium, S. frugiperda、酵母 (Saccharomyces cerevisiae を含む)、BHK、CV-1、筋芽細胞G8、COS (例えば、COS-7)、Vero、MDCK、およびCRFKの組み換え細胞が挙げられる。本発明の組み換え細胞は、種々の方法で投与され得るが、好ましくは体重1kgあたり約 10^8 ~ 約 10^{12} 細胞の範囲の用量で、経口的に投与され得るという利点を有する。投与プロトコールは、タンパク質組成物について本明細書において記載されたプロトコールと同様である。組み換え細胞とは、細胞全体、細胞壁を剥がした細胞、または細胞溶解物を含み得る。

10

20

【0145】

本発明の1つの実施形態は、免疫療法の方法であり、この方法は、本発明の Der HMW-map タンパク質を含む治療組成物の有効量を動物に投与する工程を包含する。適切な治療組成物および投与方法が本明細書において開示されている。本発明によれば、本発明の治療組成物および方法を用いて、ダニアレルゲン病因に関連する症状を予防または緩和し得る。

【0146】

本発明の治療組成物が Der HMW-map タンパク質に対するアレルギー反応をもたらす効力 (有効性) を、Der HMW-map タンパク質媒介免疫を決定するための標準的方法 (即時型過敏、遅延型過敏、抗体依存性細胞傷害性 (ADCC)、免疫複合体活性、分裂促進活性、ヒスタミン放出アッセイ、および Janeway ら (同書) に記載の方法のような他の方法が挙げられるがこれらに限定されない) を用いて試験し得る。

30

【0147】

本発明はまた、本発明の1つ以上の治療用化合物を含む治療組成物を包含する。このような治療用化合物の例としては、例えば、本明細書に開示された他のアレルゲンが挙げられる。

【0148】

本発明の治療組成物は、処置されるべき動物が耐性であり得る賦形剤中に処方され得る。このような賦形剤の例としては、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストラン溶液、ハンクス溶液、および他の生理学的に平衡な塩の水溶液が挙げられる。非水性ビヒクル (例えば、揮発性油、ゴマ油、オレイン酸エチル、またはトリグリセリド) もまた用いられ得る。他の有用な処方物は、増粘剤 (例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストラン) を含む懸濁液を含む。賦形剤はまた、少量の添加物 (例えば、等張性および化学的安定性を増強する物質) を含み得る。緩衝液の例としては、リン酸緩衝液、重炭酸緩衝液、および Tris 緩衝液が挙げられるが、保存剤 (防腐剤) の例としては、チメロサル、o-クレゾール、ホルマリン、およびベンジルアルコールが挙げられる。標準的な処方物は、注射可能な液体か、または注射のための懸濁液もしくは溶液として適切な液体に取り込まれ得る固体のいずれかであり得る。従って、非液体処方物において、賦形剤は、デキストロース、ヒト血清アルブミン、保存剤 (防腐剤) など

40

50

を含み得、投与前に無菌の水または生理食塩水がこれに添加され得る。

【0149】

本発明の1つの実施形態において、治療組成物は、アジュバントを含み得る。アジュバントは、特異的な抗原に対する動物の免疫応答を増強し得る薬剤である。適切なアジュバントとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：サイトカイン、ケモカイン、ならびにサイトカインおよびケモカインの生成を誘導する化合物（例えば、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、コロニー刺激因子（CSF）、Flt-3リガンド、エリスロポエチン（EPO）、インターロイキン2（IL-2）、インターロイキン-3（IL-3）、インターロイキン4（IL-4）、インターロイキン5（IL-5）、インターロイキン6（IL-6）、インターロイキン7（IL-7）、インターロイキン8（IL-8）、インターロイキン10（IL-10）、インターロイキン12（IL-12）、インターフェロン、インターフェロン誘導性因子I（IGIF）、トランスフォーミング成長因子、RANTES（regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted（活性化の際に調節された、正常なT細胞が発現し、そしておそらく分泌した））、マクロファージ炎症性タンパク質（例えば、MIP-1、およびMIP-1）、およびリーシュマニア伸長開始因子（LEIF）；細菌成分（例えば、エンドトキシン、詳細には、スーパー抗原、外毒素および細胞壁成分）；アルミニウムベースの塩；カルシウムベースの塩；シリカ；ポリヌクレオチド；トキソイド；血清タンパク質、ウイルスコート（外殻）タンパク質；ブロックコポリマーアジュバント（例えば、HunterのTitermaxTMアジュバント（VaxcelTM, Inc. Norcross, GA）、Ribiaアジュバント（Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT）；ならびにサポニンおよびそれらの誘導體（例えば、Quil A（Superfos Biosector A/S, Denmark））。本発明のタンパク質アジュバントは、本明細書に記載の方法を用いて、タンパク質自体の形態で、またはこのようなタンパク質をコードする核酸分子の形態で送達され得る。

【0150】

本発明の1つの実施形態において、治療組成物は、キャリアを含み得る。キャリアとしては、処置された動物における治療組成物の半減期を延長する化合物が挙げられる。適切なキャリアとしては、ポリマー性徐放性ビヒクル、生分解性インプラント、リポソーム、細菌、ウイルス、他の細胞、オイル（油）、エステル、およびグリコールが挙げられるがこれらに限定されない。

【0151】

本発明の1つの実施形態は、本発明の組成物を動物に緩徐に放出し得る徐放性処方物である。本明細書において用いる場合、徐放性処方物は、徐放性ビヒクル中に本発明の組成物を含む。適切な徐放性ビヒクルとしては、生体適合性ポリマー、他のポリマー性基質、カプセル、マイクロカプセル、微小粒子、ポーラス調製物、浸透性ポンプ、拡散デバイス、リポソーム、リボスフェア（liposphere）、および経皮送達システムが挙げられるがこれらに限定されない。本発明の他の徐放性処方物としては、動物への投与の際に、その場で（インサイチュで）固体またはゲルを形成する液体が挙げられる。好ましい徐放性処方物は、生分解性（すなわち、生体腐食性）である。

【0152】

本発明の好ましい徐放性処方物は、動物におけるダニアレルギーを減弱するための組成物の治療用量レベルを達成するのに十分な一定速度で、動物の血中に本発明の治療組成物を放出し得る。本明細書において用いる場合、ダニアレルギーとは、ダニアレルゲンが動物と接触するとき生じる細胞応答をいう。例えば、ダニアレルゲンに特異的に結合するIgEは、Fcレセプターに結合するようになり、これが、アレルギーの臨床症状を誘引し得る生物学的メディエーター（例えば、ヒスタミン、プロスタグランジン、およびノマ

10

20

30

40

50

たはプロテアーゼ)の放出を含む、Fc レセプター媒介性の生物学的応答を生じる。この治療組成物は、好ましくは、約1~約12ヶ月におよぶ時間間隔にわたって放出される。本発明の好ましい徐放性処方物は、好ましくは少なくとも約1ヶ月間、より好ましくは少なくとも3ヶ月間、なおより好ましくは少なくとも6ヶ月間、なおより好ましくは少なくとも約9ヶ月間、そしてなおより好ましくは少なくとも約12ヶ月間、処置を及ぼし得る。

【0153】

本発明の治療組成物は、タンパク質分解を生じない従来方法(例えば、濾過)によって滅菌され得るか、そして/または凍結乾燥され得る。

【0154】

本発明の治療組成物は、本明細書において記載されるように、ダニアレルギーに対して感受性の任意の動物に対して投与され得る。有効な様式で本発明の治療組成物を投与する受容可能なプロトコールは、個々の用量サイズ、用量の回数、用量投与の頻度、および投与の様式によって変化し得る。このようなプロトコールの決定は、当業者によって達成され得る。有効な用量とは、ダニアレルゲンに対する過敏性に対して動物を処置し得る用量をいう。有効用量は、例えば、用いられる治療組成物、ならびにレシピエント動物のサイズおよびタイプに依存して変化し得る。ダニアレルゲンに対して動物を免疫調節する有効用量は、ダニアレルゲンに対する動物による過敏性応答を緩和し得る時間を超えて投与された用量を含む。例えば、第一の寛容化用量は、過敏性の動物に投与されたときに生じる過敏性応答が最小である、本発明の治療組成物の量を含み得る。第二の寛容化用量は、同じ治療組成物の第一の用量よりも多い量を含み得る。有効な寛容化用量は、動物がダニアレルゲンに対する曝露に対する過敏性応答を有さないように、この動物を寛容化するのに必要な治療組成物の漸増する濃度を含み得る。動物を脱感作するために有効な用量は、その動物の環境に存在するダニアレルゲンに対する曝露に対して過敏性応答を有することから動物をブロックするのに十分な、本発明の治療組成物の濃度を含み得る。有効な脱感作用量は、過敏性動物に投与されたときに生じる過敏性応答が最小である、治療組成物の濃度を有する反復用量を含み得る。

【0155】

適切な単一用量は、適切な時間間隔を超えて、1回以上投与された場合、ダニアレルゲンに対する過敏性に対して動物を処置し得る用量である。例えば、ダニアレルゲン、またはミメトープ(mimetope)治療組成物の好ましい単回用量は、動物の体重1キログラムあたり、この治療組成物の約0.5ng~約1gである。治療組成物でのさらなる処置は、もとの投与の後、約1日~1年で投与され得る。治療組成物でのさらなる処置は好ましくは、この動物がダニアレルゲンに対する過敏性応答からもはや防御されていない場合、投与される。特定の投与用量およびスケジュールは、上記に考察されたパラメーターに基づいて、当業者によって開発され得る。投与の様式としては、皮下経路、皮内経路、静脈内経路、経鼻経路、経口経路、経皮経路、および筋肉内経路が挙げられ得るがこれらに限定されない。

【0156】

本発明の治療組成物は、ダニアレルゲンに対する動物の過敏性を改変し得る他の化合物と組み合わせて用いられ得る。例えば、動物は、全身剤または抗炎症性剤(例えば、抗ヒスタミン、抗ステロイド試薬、抗炎症性試薬、およびIgEからIgGへの免疫グロブリン重鎖クラスの切り替えを駆動する試薬)などによって、過敏性応答に関与する細胞の機能を改変し得る化合物(この化合物はアレルギー反応を減弱する)を用いて処置され得る。過敏性応答に関与する細胞の機能を改変するために有用な適切な化合物としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない:抗ヒスタミン、クロモリンナトリウム、テオフィリン、サイクロスポリンA、アドレナリン、コルチゾン、細胞シグナル伝達を調節し得る化合物、アデノシン3',5'-サイクリックホスフェート(cAMP)活性を調節し得る化合物、およびIgE活性をブロックする化合物(例えば、IgE由来のペプチドもしくはIgE特異的Fcレセプター、IgE由来のペプチドもしくはIgE特異的Fcレセブ

10

20

30

40

50

ターに特異的な抗体、またはFcレセプターに対するIgEの結合をブロックし得る抗体)。

【0157】

本発明の組成物は、ダニアレルゲン過敏性を有するかまたは、それに対して過敏な任意の動物に対して投与され得る。処置するのが好ましい動物としては、哺乳動物および鳥類(ネコ、イヌ、ウマ、ヒト、および他のペット、労役動物、および/または経済的食用動物を含む)が挙げられる。防御するのに特に好ましい動物は、ネコおよびイヌである。

【0158】

本発明の別の局面は、本発明の処方物を用いて、ダニアレルゲンに対する過敏症を受け易いか、もしくはダニアレルゲンに対する過敏症を有する動物のための処置を処方するための方法を含む。ダニアレルゲン過敏症に対する処置を処方するための好ましい方法は、例えば、(1)本発明のダニアレルゲンまたはそのミメトープ(mimetope)を含む有効量の処方物(適切かつ好ましい処方物が、本明細書中に開示される)を動物の1つ目の部位に皮内注射する工程；(2)有効量のコントロール溶液をこの動物の第2の部位に皮内注射する工程；(3)この処方物の注射から生じる膨疹サイズとコントロール溶液の注射から生じる膨疹サイズとを測定して、比較することによって、この動物がダニアレルゲン過敏症を有するか否かを評価する工程；ならびに(4)ダニアレルゲン過敏症に対する処置を処方する工程、を包含する。

10

【0159】

ダニアレルゲン過敏症に対する処置を処方するための代替的な好ましい方法は、(1)試験される動物から得られた体液サンプルの第1の部分を、ダニアレルゲンまたはそのミメトープを含む有効量の処方物(適切かつ好ましい処方物が、本明細書中に開示される)と接触させ、第1の免疫複合体溶液を形成する工程；(2)陽性コントロール抗体と接触させて、第2の免疫複合体溶液を形成する工程；(3)第1の免疫複合体溶液および第2の免疫複合体溶液の中の免疫複合体形成の量を測定および比較することによって、この動物がダニアレルゲン過敏症を有するか否かを評価する工程；ならびに(4)ダニアレルゲン過敏症に対する処置を処方する工程を包含する。本明細書中に開示されるダニアレルゲン処方物を用いて、アレルギーに対する処置を処方するために類似の方法が使用され得ることに、注意すべきである。

20

【0160】

本発明の別の局面は、本発明の処方物を用いて、ダニアレルゲン過敏症を受け易いか、もしくはダニアレルゲンに対する過敏症を有する動物をモニタリングするための方法を含む。本発明のインビボ試験およびインビトロ試験は、ダニアレルゲン過敏症に対する任意の処置の前および後に、ダニアレルゲン過敏症について動物を試験するために使用され得る。ダニアレルゲン過敏症の処置をモニターするための好ましい方法(これはまた、他のアレルギーの処置をモニターするためにも適用され得る)は、(1)ダニアレルゲンまたはそのミメトープを含む有効量の処方物(適切かつ好ましい処方物は、本明細書中に開示される)を動物の1つ目の部位に皮内注射する工程；(2)有効量のコントロール溶液をこの動物の第2の部位に皮内注射する工程；ならびに(3)この処方物の注射から生じる膨疹サイズとコントロール溶液の注射から生じる膨疹サイズとを測定および比較することによって、この動物がダニアレルゲンに対して脱感作されるか否かを決定する工程を包含する。

30

40

【0161】

ダニアレルゲン過敏症に対する処置をモニターするための代替的な好ましい方法(これはまた、他のアレルギーの処置をモニターするためにも適用され得る)は、(1)試験される動物から得られた体液サンプルの第1の部分を、ダニアレルゲンまたはそのミメトープを含む有効量の処方物(適切かつ好ましい処方物が、本明細書中に開示される)と接触させ、第1の免疫複合体溶液を形成する工程；(2)陽性コントロール抗体と接触させて、第2の免疫複合体溶液を形成する工程；ならびに(3)第1の免疫複合体溶液および第2の免疫複合体溶液の中の免疫複合体形成の量を測定および比較することによって、この動

50

物がダニアレルゲンに対して脱感作されるか否かを決定する工程を包含する。

【0162】

本発明はまた、ダニアレルゲンまたはそのミメトープに選択的に結合し得る抗体を含む。このような抗体は、本明細書において、抗ダニアレルゲン抗体と称される。本明細書中に使用される場合、用語「選択的に結合する」とは、このような抗体がダニアレルゲンまたはそのミメトープに優先的に結合する能力をいう。特に、本発明は、Der HMW-mapタンパク質に選択的に結合し得る抗体を含む。結合は、免疫ブロットアッセイ、免疫沈降アッセイ、酵素免疫アッセイ（例えば、ELISA）、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光抗体アッセイおよび免疫電子顕微鏡を含む当業者に公知の種々の方法を用いて、測定され得る；例えば、Sambrookら（同書）を参照のこと。

10

【0163】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかであり得る。本発明の抗体は、機能的等価物（例えば、抗体を得るために使用されるタンパク質またはミメトープの少なくとも1つのエピトープに選択的に結合し得る、抗体フラグメントおよび遺伝子操作された抗体（単鎖抗体を含む））を含む。好ましい抗体は、Der HMW-mapタンパク質またはそのミメトープに反応して惹起される。抗体が惹起されるより好ましいDer HMW-mapタンパク質は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号18、配列番号21、配列番号23、配列番号24、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号33、配列番号35、配列番号38、配列番号41、および/もしくは配列番号44のアミノ酸配列、またはこれらのホモログを有するタンパク質の少なくとも一部を含む。好ましくは、本発明の抗体は、本発明のDer HMW-mapタンパク質に対して約 10^3 M^{-1} ~ 約 10^{12} M^{-1} の単一部位結合親和性を有する。

20

【0164】

本発明の抗体を産生するための好ましい方法は、Der HMW-mapタンパク質またはそのミメトープの有効量を動物に投与して、抗体を生成する工程、およびその抗体を回収する工程を包含する。規定された生成物またはミメトープに対して惹起された抗体は、利点を有し得る。なぜなら、このような抗体は、さもなければ診断アッセイにおける妨害、または治療組成物中で使用された場合の副作用を生じ得る、他の物質に対する抗体を、

30

【0165】

本発明の抗体は、種々の潜在的な用途（これらは、本発明の範囲内である）を有する。例えば、このような抗体は、（a）ワクチンとして使用されて、動物を受動的に免疫して、その動物をダニアレルゲン過敏症から保護し得、（b）試験キットにおける陽性コントロールとして使用され得、そして/または（c）タンパク質および他の夾雑物の混合物から所望のダニアレルゲンを回収するための手段として使用され得る。

【0166】

以下の実施例は、例示目的のために提供され、そして本発明の範囲を限定することを意図しない。

40

【0167】

（実施例）

本実施例は、当業者に公知であると考えられる、多数の分子生物学的技術、微生物学的技術、免疫学的技術および生化学的技術を含むことに、注意すべきである。このような技術の開示は、例えば、Sambrookら（同書）および関連する参考文献中に見出され得る。

【0168】

（実施例1）

本実施例は、ダニアレルゲンに対してアレルギー性であることが既知であるイヌ由来のIgEに結合する、高分子量タンパク質の同定を記載する。

50

【0169】

約5.5グラム(g)の凍結湿潤 *Dermataphagooides farinae* (Derf)ダニ(Bayer Allergy, Spokane, WAから入手可能である)を、30mlのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)または0.1M Tris-HCl (pH8) (各々、完全なプロテアーゼインヒビター(Boehringer Mannheim, Indianapolis, INから入手可能である)を含む)のいずれかの中で、丸底ガラスホモジナイザーでホモジナイズし、Derf粗抽出物を得た。得られる上清を収集し、そして各々を16,000×gで約30分間の遠心分離によって、Centriprep 30濃縮器(Amicon, Beverly, MAから入手可能である)中で濃縮した。濃縮した上清を、それぞれ、PBSまたは0.1M Tris-HCl (pH8)中、分離Sephacryl S-100カラム(2.7×70cm; Pharmacia, Piscataway, NJから入手可能である)に適用した。各カラムから排除された画分をプールした。PBSを用いた場合、画分を10mM Tris-HCl (pH8)に対して透析した。画分を、分離Q-Sepharoseカラム(2.5×5cm; Pharmaciaから入手可能である)に適用した。0.1M Tris-HCl (pH8)を含む画分を使用した場合、Q-Sepharoseカラムを10mM Tris-HCl (pH8)中で予備平衡させた。各カラムを、約45mlの10mM Tris-HCl (pH8)、次いで0.1M Tris-HCl (pH8)、次いで0.2M Tris-HCl (pH8)、次いで0.3M Tris-HCl (pH8)、次いで0.4M Tris-HCl (pH8)、そして次いで、0.5M Tris-HCl (pH8)を用いて連続的に溶出した。画分を、各溶出工程から収集した。各画分を、ダニアレゲンに対するアレルギー性が既知であるイヌから単離したイヌ血清(本明細書中、ダニアレルギー性イヌの抗血清またはダニアレルギー性抗血清と称する)中に存在するIgE抗体に結合するタンパク質の存在について、ウエスタンブロットによって分析した。詳細には、画分中に含まれるタンパク質を、12% Tris-グリシン SDS-PAGEによって分解し、次いで、ニトロセルロース上にブロットした。このブロットを、標準的な緩衝液を用いて1:20で希釈した、ダニアレゲンに対してアレルギー性であることが公知のイヌから得られた血清プールと共にインキュベートした。このブロットを、インキュベートし、次いで、標準的な手順を用いて洗浄した。次いで、このブロットを、マウスモノクローナル抗イヌIgE抗体DEI38(1mg/ml; 1:1000希釈)と共にインキュベートした。このブロットをインキュベートし、次いで標準的な手順を用いて洗浄した。次いで、このブロットを、西洋ワサビベルオキシダーゼに結合体化したロバ抗マウスIgG抗体(1:1000希釈; Jackson Labs, Maineから入手可能である)と共にインキュベートした。このブロットに結合したHRP結合体化抗体の存在を、標準的な技術を用いて検出した。約70kDのタンパク質を、0.2M Tris-HCl (pH8)画分中で同定し、約98kDのタンパク質および約109kDのタンパク質を、0.3M Tris-HCl (pH8)画分中で同定した。

【0170】

0.3M Tris-HCl (pH8)を用いて溶出した上記の画分を、Centriprep 30濃縮器中で濃縮し、次いで、20mM Na-Ac (pH5.6)中で希釈した。次いで、溶出した画分を、PolyCat A HPLC陽イオン交換カラム(PolyLC, Columbia, MDから入手可能である)に適用した。このカラムを、約10mlの20mM Na-Ac (pH5.6)を用いて溶出し、次いで、20mM Na-Ac (pH5.6)緩衝液中の0~0.5M 直線勾配のNaClの約45mlを流速約1ml/分で用いて溶出した。画分を、溶出手順から収集し、そして上記のダニアレルギー性抗血清およびウエスタンブロットプロトコルを用いて高分子量タンパク質の存在についてアッセイした。高分子量タンパク質を含む画分をプールした。トリフルオロ酢酸(TFA)を、約0.05%の濃度に添加した。この溶液を、80% 溶媒Aおよび20% 溶媒Bで予備平衡させたTSK-Gel TMS-250 Cl逆相カラム(TO

s o H a a s , M o n t g o m e r y v i l l e , P A から市販)に適用した。溶媒 A は、水中に約 0.05% T F A を含み、そして溶媒 B は、水中の 90% アセトニトリル中に約 0.05% T F A を含む。このカラムを、約 5 ml の 20% 溶媒 B を用いて溶出し、次いで、約 20% ~ 約 70% 直線勾配の溶媒 B 36 ml を 0.6 ml / 分の流速にて用いて溶出した。このカラムから溶出されたタンパク質を、12% T r i s - グリシン P A G E によって分解した。このゲルを、クマシーブルーを用いて染色した。染色したゲルを、図 1 に示す。レーン 1 は、M a r k - 12 タンパク質分子量マーカー (N o v e x , S a n D i e g o , C A から入手可能である) を含み、レーン 2 は、逆相カラムから溶出されたタンパク質を含み、そしてレーン 3 は、S e e B l u e^{T M} タンパク質分子量マーカー (N o v e x から入手可能である) を含む。2 つの主要なタンパク質を、溶出物中で同定した。このタンパク質の分子量を、B i o R a d^{T M} M u l t i - A n a l y s t^{T M} / P C I m a g e S y s t e m (B i o R a d C o r p . から入手可能である) を用いて決定した。図 1 のレーン 2 の中のより高い分子量のタンパク質を、約 109 k D であると決定し、本明細書中においてダニアレルゲンタンパク質 A (m a p A) と称する。図 1 のレーン 2 の中のより低い分子量のタンパク質を、約 98 k D であると決定し、本明細書中においてダニアレルゲンタンパク質 B (m a p B) と称する。合わせたタンパク質の純度は、85% 純度よりも高く、すなわち、15% 未満の不純物であった。この精製された溶出物を、本明細書中において D . f a r i n a e 高分子量 m a p (H M W - m a p) 組成物と称する。

10

【0171】

20

(実施例 2)

本実施例は、D . f a r i n a e H M W - m a p 組成物中のタンパク質の N 末端配列決定を記載する。

【0172】

実施例 1 において上記のようにして得た 0.3 M T r i s - H C l (p H 8) 画分中に含まれるタンパク質を、12% T r i s - グリシンポリアクリルアミド - S D S ゲルを用いた S D S - P A G E によって分離し、続いてクマシー染色をした。タンパク質を、P V D F 上にプロットさせ、クマシー R - 250 で染色し、標準的な手順を用いて脱色した。約 98 k D のバンドおよび約 109 k D のバンドに対応するタンパク質を切り出し、そして当業者に公知の技術を用いて別々に N 末端アミノ酸配列決定に供した。約 14 アミノ酸の部分的な N 末端アミノ酸配列を、両方のタンパク質について推定し、そしてこれらの配列が同一であると決定した。N 末端アミノ酸配列を、アミノ酸配列: S e r I l e L y s A r g A s p H i s A s n A s p T y r S e r L y s A s n P r o M e t を有する配列番号 1 として本明細書中に示す。

30

【0173】

D . f a r i n a e H M W - m a p 組成物中のタンパク質をまた、タンパク質分解性切断に供して、内部アミノ酸配列データを得た。詳細には、この D . f a r i n a e H M W - m a p 組成物を、当該分野で標準的な方法を使用して、エンドプロテイナーゼ A s p - N (B o e h r i n g e r M a n n h e i m B i o c h e m i c a , I n d i a n a p o l i s , I N から入手可能である) を用いて切断した。次いで、消化したタンパク質を、S t o n e ら、E n z y m a t i c D i g e s t i o n o f P r o t e i n s a n d H P L C P e p t i d e I s o l a t i o n (A P r a c t i c a l G u i d e t o P r o t e i n a n d P e p t i d e P u r i f i c a t i o n f o r M i c r o s e q u e n c i n g , P T M a t s u d a i r a 編, A c a d e m i c P r e s s , S a n D i e g o , C A .) によって記載される方法を用いて、H P L C によって分離した。12 個のタンパク質分解性フラグメントを単離し、これらを、本明細書中において m a p (1)、m a p (2)、m a p (3)、m a p (4)、m a p (5)、m a p (6)、m a p (7)、m a p (8)、m a p (9)、m a p (10)、m a p (11) および m a p (12) と称する。

40

【0174】

50

map (1) の N 末端部分アミノ酸配列を、 Asp Tyr Glu Tyr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ala Pro Leu Tyr Lys Arg Pro であると決定し、配列番号 2 とも称する。map (2) の N 末端部分アミノ酸配列を、 Asp Ile Pro His Pro Thr Asn Ile His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Ser Val Asn Gly Gly であると決定し、配列番号 3 とも称する。map (3) の N 末端部分アミノ酸配列を、 Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser Pro Pro Gly Phe Ile Val Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser であると決定し、配列番号 4 とも称する。map (4) の N 末端部分アミノ酸配列を、 Asp Glu Lys Asn Ser Phe Glu Cys Ile Leu Gly Pro であると決定し、配列番号 5 とも称する。map (5) の N 末端部分アミノ酸配列を、 Asp Ala Phe Glu Pro His Gly Tyr Leu Leu Thr Ala Ala Val Ser Pro Gly Lys であると決定し、配列番号 6 とも称する。map (6) の N 末端部分アミノ酸配列を、 Asp Lys Gln Asn Tyr Leu Ala Leu Val Arg Glu Leu Lys であると決定し、配列番号 7 とも称する。map (7) の N 末端部分アミノ酸配列を、 Asp Met Ala Gln Asn Tyr Lys Tyr Arg Gln Gln Phe Ile Gln Ser Val Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg Gln であると決定し、配列番号 8 とも称する。map (8) の N 末端部分アミノ酸配列を、 Asp Glu Xaa Asn Val Met Xaa Tyr Val Leu Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg であると決定し、配列番号 9 とも称する (ここで、Xaa は、任意のアミノ酸を示す)。map (9) の N 末端部分アミノ酸配列を、 Asp Lys Leu Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Xaa Ser Ile Glu であると決定し、配列番号 10 とも称する (ここで、Xaa は、任意のアミノ酸を示す)。map (10) の N 末端部分アミノ酸配列を、 Asp Ile Pro His Pro Thr Asn Ile His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Ser Val Asn Gly であると決定し、配列番号 11 とも称する。map (11) の N 末端部分アミノ酸配列を、 Asp Tyr Ala Lys Asn Pro Lys Arg Ile Val Cys Ile Val Gly Thr Glu Gly Val Leu Ser であると決定し、配列番号 12 とも称する。map (12) の N 末端部分アミノ酸配列を、 Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser Pro Pro Gly He Ile Val Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser であると決定し、配列番号 13 とも称する。map (1)、map (2)、map (3)、map (4)、map (5)、map (6)、map (7)、map (8)、map (9)、map (10)、map (11)、map (12) および map (13) についてのアミノ酸配列は、map A タンパク質および map B タンパク質の混合物から生成されたので、これらの配列は、シグナルタンパク質の部分的な配列を必ずしも表さない。

【 0 1 7 5 】

(実施例 3)

本実施例は、ダニアレルゲンに対するアレルギー性が既知であるイヌ由来の I g E に結合する 70 k D タンパク質の精製を記載する。

【 0 1 7 6 】

0 . 2 M Tris - HCl (pH 8) を用いて溶出した実施例 1 に記載の上記画分を、Centriprep 30 濃縮器中で濃縮し、次いで、20 mM Na - Ac (pH 5 . 6) で溶出した。次いで、希釈したタンパク質を、PolyCat A HPLC 陽イオン交換カラムに適用した。このカラムを、約 10 ml の 20 mM Na - Ac (pH 5 . 6) を用いて溶出し、次いで、20 mM Na - Ac (pH 5 . 6) 緩衝液中の 0 ~ 0

5 Mの直線勾配のNaClの約45 mlを流速約1 ml /分で用いて溶出した。画分を、溶出手順から収集し、そして上記のダニアレルギー性抗血清およびウエスタンブロットプロトコルを用いて70 kDタンパク質の存在についてアッセイした。この70 kDタンパク質を含む画分をプールした。トリフルオロ酢酸(TFA)を、約0.05%の濃度に添加した。この溶液を、80% 溶媒Aおよび20% 溶媒Bで予備平衡させたTSK - Gel TMS - 250 Cl逆相カラムに適用した。溶媒Aは、水中に約0.05% TFAを含み、そして溶媒Bは、水中の90%アセトニトリル中に約0.05% TFAを含む。このカラムを、約3 mlの20% 溶媒Bを用いて溶出し、次いで、約20% ~ 約70%の直線勾配の溶媒B 36 mlを0.6 ml /分の流速にて用いて溶出した。90%より高い純度の約70 kDタンパク質を得た。この約70 kDタンパク質を、本明細書中においてmapCと称する。 10

【0177】

この70 kDタンパク質(mapC)に対応するSDS - PAGE上の領域のN末端配列を、実施例2に記載されるように得た。約21アミノ酸のN末端アミノ酸配列を、80% 信頼水準で推定し、そしてこれは本明細書中において配列番号33として表され、これは、以下: Gln Ser Arg Asp Arg Asn Asp Lys Pro Tyr Xaa Ile Val Lys Lys Lys Lys Lys Ala Leu Aspのアミノ酸配列を有する。

【0178】

(実施例4)

本実施例は、ダニアレゲンに対するアレルギー性が既知であるイヌから単離されたイヌ血清中のイヌIgEに対する、D. farinae HMW - map組成物(すなわち、mapAおよびmapBを含む)の結合を記載する。 20

【0179】

Immulon IIマイクロタイタープレートの複数ウェルを、CBC緩衝液中で希釈した約100ナノグラム/ウェル(ng/ウェル)のD. farinae HMW - map組成物(これは、実施例1の上記の方法に従って単離した)を用いてコーティングした。このプレートを、4で一晚インキュベートした。インキュベーション後、このD. farinae HMW - map組成物含有溶液を、プレートから除去し、そしてこのプレートをプロット乾燥させた(blotted dry)。次いで、このプレートを、0.05% Tween - 20を有するリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中に含まれる4.0% 胎仔ウシ血清(PBSTFCs)を約200 μl /ウェルで用いて、室温で約1時間ブロックした。次いで、このプレートを、自動洗浄器(Dynatech, Chantilly, VAから入手可能である)を使用して、PBS中の0.05% Tween - 20(PBST)を用いて4回洗浄した。皮内の皮膚試験においてダニアレゲンに対する感受性が既知である異なるイヌから単離した血清サンプルの、PBSTFCs中1:10希釈の約100 μl(1ウェル当たり)を、このプレートに添加した。血清のネガティブコントロール群もまた、遮断設備にて惹起された6匹のイヌ由来の血清(Harlan Bioproducts, Indianapolis, INから入手可能である)の組合わせを含むプレートに、添加した。いくつかのウェルは、イヌ血清を受けず、故に、バックグラウンドの結合レベルが、決定され得た。このプレートを室温で約1時間インキュベートし、ついで、PBSTを用いて4回洗浄した。PBSTFCs中に含まれる40 μg/ml ビオチン化ヒトFcR鎖タンパク質(Frankら、WO 98/23964(1997年11月24日公開)に記載されるように生成される)の1:4000希釈の約100 μl(1ウェル当たり)を、添加した。このプレートを室温にて約1時間インキュベートし、次いで、PBSTを用いて4回洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化した約0.25 μg/ml ストレプトアビジン(KirkegaardおよびPerry Laboratories(KPL)、Gaithersburg, MDから入手可能; PBST中で希釈)の約100 μlを、実験サンプルまたはコントロールサンプルを受けた各ウェルに添加した。次いで、このプレートを室温にて1時間インキュ 30 40 50

ベートし、P B S Tを用いて4回洗浄した。室温に予め温めておいた約100 μ lのT M B基質(K P Lから入手可能である)を各ウェルに添加した。次いで、このプレートを、室温にて約10分間インキュベートし、次いで、約100 μ l / ウェルの停止溶液(K P Lから入手可能である)を添加した。ウェルの光学密度(O . D .)を、停止溶液を添加した10分以内に、S p e c t r a m a x M i c r o t i t e r P l a t e (M o l e c u l a r D e v i c e s I n c . から入手可能である)読み取り機で450nmにて読み取った。

【0180】

ネガティブコントロールサンプルのウェルおよびバックグラウンドのウェルを用いて得たO . D . 読み取りは、0 O . D . であった。26匹のダニアレゲン感受性のイヌのうち5匹由来の血清は、約2,000 O . D . と約3,200 O . D . との間のO . D . 読み取りを生成した。他3匹のダニアレゲン感受性のイヌ由来の血清は、約1,000 O . D . と2,000 O . D . との間のO . D . 読み取りを生成した。他3匹のダニアレゲン感受性のイヌ由来の血清は、約500 O . D . と1,000 O . D . との間のO . D . 読み取りを生じた。他7匹のダニアレゲン感受性のイヌ由来の血清は、約200 O . D . と500 O . D . との間のO . D . 読み取りを生じた。他6匹のダニアレゲン感受性のイヌ由来の活性は、500 O . D . 未満のO . D . 読み取りを生成した。従って、これらの結果は、ダニアレゲンに対して感受性であることが既知のイヌ由来の血清が、本発明のm a p A タンパク質およびm a p B タンパク質に特異的に結合するI g E 抗体を含むことを示す。

10

20

【0181】

(実施例5)

本実施例は、ダニアレゲンに対するアレルギー性が既知のイヌから単離されたイヌ血清中のイヌI g E に対する、70kD D . f a r i n a e タンパク質の結合を記載する。

【0182】

I m m u l o n I I マイクロタイタープレートの複数ウェルを、C B C 緩衝液中で希釈した約100ng / ウェルの70kD D . f a r i n a e タンパク質(本明細書中においてm a p C と称する)(このタンパク質は、実施例1および3の上記のような方法に従った単離した)を用いてコーティングした。このプレートを、4で一晩インキュベートした。このプレートを、実施例4に記載される方法を用いてブロックおよび洗浄した。皮内の皮膚試験においてダニアレゲンに対する感受性が既知である異なるイヌから単離した血清サンプルの、P B S T F C S 中1 : 10希釈の約100 μ l (1ウェル当たり)を、このプレートに添加した。ネガティブコントロールサンプルもまた、S P F 血清サンプル(遮断設備にて維持され、ゆえにダニアレゲンに決して曝されなかったイヌ由来の血清)を含むプレートに添加した。いくつかのウェルは、イヌ血清を受けず、ゆえに、バックグラウンドの結合レベルが、決定され得た。このプレートを室温で約1時間インキュベートし、次いで、P B S Tを用いて4回洗浄した。次いで、ビオチン化ヒトF c R 鎖タンパク質を添加し、そして実施例4に記載される方法を用いてプレートに結合したI g E の存在を検出した。

30

【0183】

ネガティブコントロールサンプルのウェルおよびバックグラウンドのウェルを用いて得たO . D . 読み取りは、0 O . D . であった。26匹のダニアレゲン感受性のイヌのうち3匹由来の血清は、約1,500 O . D . と約2,700 O . D . との間のO . D . 読み取りを生成した。他5匹のダニアレゲン感受性のイヌ由来の血清は、約800 O . D . と約1,500 O . D . との間のO . D . 読み取りを生成した。他4匹のダニアレゲン感受性のイヌ由来の血清は、約500 O . D . と約800 O . D . との間のO . D . 読み取りを生じた。他6匹のダニアレゲン感受性のイヌ由来の血清は、約200 O . D . と約500 O . D . との間のO . D . 読み取りを生じた。他8匹のダニアレゲン感受性のイヌ由来の活性は、500 O . D . 未満のO . D . 読み取りを生成した。従って、これらの結果は、ダニアレゲンに対して感受性であることが既知のイヌ由来の血清が、本発明の

40

50

map Cタンパク質に特異的に結合するIgE抗体を含むことを示す。

【0184】

(実施例6)

本実施例は、ダニアレゲンに対して過敏であることをインビトロで試験することによって示される、ネコから単離されたネコ血清中のネコIgEに対する、map Aタンパク質、map Bタンパク質、またはmap Cタンパク質の結合を記載する。

【0185】

Immulon IIマイクロタイタープレートの複数ウェルを、約100ng/ウェルのD. farinae HMW-map組成物(実施例1の上記の方法に従って単離した)および70kD D. farinaeタンパク質(実施例3の上記の方法に従って単離した)を用いてコーティングした。このプレートの他のウェルを、400ng/ウェルの全Dermatophagoides pteronyssius抽出物(Greer Laboratories, Inc., Lenoir, NCから入手可能;使用前に8倍に濃縮する)または全D. farinae抽出物(Miles, Inc., Elkhart, INから入手可能である)を用いてコーティングした。全サンプルを、CBC緩衝液で希釈した。このプレートを、4で一晚インキュベートした。このプレートを、実施例4に記載の方法を用いてブロックおよび洗浄した。インビトロアレゲン試験においてダニアレゲンに対して感受性であることが既知である異なるネコから単離した血清サンプルの、PBSTFCs中1:10希釈の約100μl(1ウェルあたり)を、このプレートに添加した。7匹のコントロールネコ(#15、#16、#17、#18、#19、#20、および#21)(これらは、インビトロ試験によってダニアレゲン粉末(dust)に対して感受性でないことが示されている)由来の血清もまた、試験した。いくつかのウェルは、ネコ血清を受けず、従って、バックグラウンドの結合レベルが、決定され得る。このプレートを室温にて約1時間インキュベートし、ついで、PBSTを用いて4回洗浄した。次いで、ビオチン化ヒトFcR鎖タンパク質を添加し、そして実施例4に記載される方法を用いてプレートに結合したIgEの存在を検出した。

10

20

【0186】

結果を、以下の表1に示す。全ての値は、O.D.値の1,000倍を示す。HDMは、(血清学的試験(すなわち、全てのD. farinae抽出物に対するELISA)によって)粉末(dust)家ダニのアレゲンに感受性なネコをいう。

30

(表1)

【0187】

【表1】

ネコの 番号	HDM	全 <i>Der p</i>	全 <i>Der f</i>	mapAおよびmapB	mapC
1	+	54	173	211	400
2	+	437	454	245	352
3	+	96	88	17	36
4	+	35	179	278	758
5	+	123	23	0	0
6	+	2	10	0	0
7	+	84	321	439	445
8	+	125	333	611	599
9	+	2459	2737	1613	507
10	+	17	0	0	0
11	+	146	347	243	586
12	+	31	100	102	223
13	+	56	171	267	292
14	+	121	146	163	185
15	-	0	0	0	8
16	-	0	0	0	0
17	-	0	0	0	0
18	-	0	0	0	0
19	-	0	0	0	0
20	-	0	0	0	0
21	-	23	0	0	0

10

20

これらの結果は、ダニアレゲンに感受性であることが既知のネコの数匹からの血清が、本発明のmapAタンパク質、mapBタンパク質またはmapCタンパク質に特異的に結合するIgE抗体を含むことを示す。さらに、mapAタンパク質、mapBタンパク質またはmapCタンパク質に結合するIgEを含むいくつかの血清はまた、全てのD. pteronyssius抽出物に結合するIgE抗体を含む。コントロール血清は、本発明のmapAタンパク質、mapBタンパク質またはmapCタンパク質のいずれかに結合するIgE抗体を含まなかった。

【0188】

(実施例7)

本実施例は、イヌにおいて高感受性応答を誘導するD. farinae HMW-map組成物の能力を例証する。

【0189】

実施例1に記載されるD. farinae HMW-map組成物が粉末ダニアレルギー応答に感受性である動物においてアレルギー応答を誘導し得るか否かを決定するために、粉末ダニアレルギーに対する臨床的兆候を活性に示すイヌ(本明細書中、アトピー性イヌという)に対して、皮膚試験を実施した。正常なイヌは、ダニアレルギーの症状を示さないがダニアレルギー応答に感受性であり得るイヌを含む。各イヌ(すなわち、4匹の正常イヌおよび4匹のアトピー性イヌ)を、外側胸部/腹部領域で剃毛し、その領域中の異なる部位に、実施例1に記載される方法によって分離された約1:50,000希釈のD. farinae粗抽出物を用いて約2μgの精製したD. farinae HMW-map組成物および/またはコントロール溶液(すなわち、ネガティブコントロールとしての生理食塩水、およびポジティブコントロールとしての1:1000希釈のヒスタミン)とともに皮内注射した。4匹の正常イヌ全ておよび4匹のアトピー性イヌ全てが、D. farinae全抽出物を受けた。正常イヌの3匹およびアトピー性イヌの2匹は、D. farinae HMW-map組成物を受けた。8匹のイヌ全てが、ネガティブコントロールサンプルおよびポジティブコントロールサンプルの両方を受けた。注射当たりの総容量は、50マイクロリットル(μl)であり、生理食塩水中に希釈された組成物およびコントロールを有した。これらの注射を、単回の注射として投与した。

30

40

50

【0190】

全ての注射部位を、15分時のミリメートル(mm)で客観的に測定し、そしてコントロールサンプルと比較した場合に(+)または(-)のいずれかでスコア付けした。客観的スコア付けを、Ohio State University, Columbus, OHのAndrew Hillier, D.V.M.によって実施した。結果を、表2に示す。

(表2)

【0191】

【表2】

	正常 イヌ1	正常 イヌ2	正常 イヌ3	正常 イヌ4	アトピー 性イヌ1	アトピー 性イヌ2	アトピー 性イヌ3	アトピー 性イヌ4
全抽出物	+	+	+	-	+	+	-	-
HMW map	+	+	-	n/a	+	-	n/a	n/a
ネガティブ コントロール	-	-	-	-	-	-	-	-
ヒスタミン	+	+	+	+	+	+	+	+

n/a = 適用し得ない

これらの結果は、D. farinae HMW-map組成物がアトピー性イヌを含むイヌにおいて即時高感受性応答を誘導し得たことを示す。従って、HMW-map組成物は、アトピー性イヌを含むイヌにおいて高感受性応答を誘導するために十分アレルギー性である。

【0192】

表3は、以下の実験の結果を記載する。HMW-map組成物に対するIgEを、以下の3群のイヌの血清においてELISAを使用して測定した：D. farinaeアレルギー性のイヌ(HDM-AD)、(他のアレルゲンに対して)アトピー性であるがHDMアレルギー性ではないイヌ(AD)、およびナイーブなイヌ。3群のイヌをまた、D. farinae全抽出物およびHMW-map組成物に対する皮内皮膚試験によって試験した。

【0193】

(表3. D. farinaeアレルギー性のイヌ、アトピー性であるがHDM-アレルギー性ではないイヌおよびナイーブなイヌにおける、D. farinae全抽出物およびHMW-map組成物についての皮膚試験およびELISAデータ)

【0194】

【表3A】

イヌ	臨床状態	Df IDST 1:50,000	Df ELISA	HMW-map IDST 1ug	HMW-map ELISA
1	HDM-AD	+	1968	+	2876
2	HDM-AD	+	407	-	954
3	HDM-AD	+	3921	+	3465
4	HDM-AD	+	153	+	198
5	HDM-AD	+	1712	+	997
6	HDM-AD	+	1833	+	2006
7	HDM-AD	+	4200	+	4200
8	HDM-AD	+	2851	+	3559
9	HDM-AD	+	122	+	209
10	HDM-AD	+	1627	+	566
11	HDM-AD	+	1185	+	1307
12	HDM-AD	+	308	+	101
13	HDM-AD	+	341	+	433
14	AD	-	1	-	0

10

【 0 1 9 5 】

【 表 3 B 】

(表3 続き)

20

イヌ	臨床状態	Df IDST 1:50,000	Df ELISA	HMW-map IDST 1ug	HMW-map ELISA
15	AD	-	8	-	2
16	AD	ND	66	ND	87
17	正常	-	24	-	40
18	正常	-	53	ND	369
19	正常	-	37	-	21
20	SPFビーグル	ND	0	ND	0
21	SPFビーグル	ND	6	ND	1

30

D . f a r i n a e 全抽出物に対して E L I S A によってポジティブであった全てのイヌはまた、H M W - m a p 組成物アレルゲンに対してもポジティブであった。D . f a r i n a e 全抽出物に対して E L I S A によってネガティブであった 8 匹のイヌについて、8 匹中 7 匹がまた、H M W - m a p 組成物に対してもネガティブであった。

【 0 1 9 6 】

(実施例 8)

本実施例は、本発明の D e r H M W - m a p 組成物をコードする核酸分子の単離を記載する。

【 0 1 9 7 】

40

D e r H M W - m a p 組成物核酸分子を、以下のように同定しそして単離した。

【 0 1 9 8 】

(A . D e r m a t o p h a g o i d e s f a r i n a e c D N A ライブラリーの調製)

D e r m a t o p h a g o i d e s f a r i n a e c D N A ライブラリーを、以下のように調製した。総 RNA を、約 2 g の瞬間凍結しかつ破碎した粉末家ダニから、C h o m z y n s k i ら、1987、A n a l . B i o c h e m . 162, 156 - 159 によって記載されるものと類似の酸 - グアニジウム - フェノール - クロロホルム法を使用して抽出した。ポリ A⁺ 選択された RNA を、製造業者によって推奨される方法に従って、m R N A P u r i f i c a t i o n K i t (P h a r m a c i a B i o t e c h , N

50

ewark, NJから入手可能)を使用するオリゴ-dTセルロースクロマトグラフィーによって総RNA調製物から分離した。cDNAライブラリーを、StratageneのZAP-cDNA Synthesis Kitプロトコルを使用して、Uni-ZAPTM X Rベクター(Stratageneから入手可能)中に構築した。約5 μ gのポリA⁺RNAを使用して、*Dermatophagoides farinae* cDNAライブラリーを生成した。

【0199】

(B. PCRプライマーの調製)

さらなるN末端アミノ酸配列分析を、実施例2に上記した方法に従って実施した。34アミノ酸のN末端アミノ酸部分配列を推測し、そして以下のアミノ酸配列を有する配列番号24によって示す： 10

【0200】

【化1】

Ser Ile Lys Arg Asp His Asn Asp Tyr Ser Lys Asn Pro Met Met

Ile Val Xaa Tyr Tyr Gly Gly Ser Ser Gly Tyr Gln Ser Xaa Lys Arg Xaa Xaa Thr

(ここで、「Xaa」は、任意のアミノ酸残基を示す)。配列番号4のアミノ酸配列(実施例2に上記した)および配列番号24を使用して、合成オリゴヌクレオチドプライマーを設計した。以下のヌクレオチド配列：

【0201】

【化2】

5' AAA CGT GAT CAT AAY GAT TAY TCN AAR AAY C 3'

を有する配列番号24由来のセンスプライマーDerf1(配列番号25と称する)(ここで、YはCまたはTを示し、RはAまたはGを示し、そしてNはA、C、TまたはGを示す)、または以下のヌクレオチド配列：

【0202】

【化3】

5' AAA CGT GAT CAT AAY GAT TAY AGY AAR AAY C 3'

を有する配列番号4由来のセンスプライマーDerf2(配列番号26と称する)を、以下のヌクレオチド配列：

【0203】

【化4】

5' CCT TCT TCA CCN ACR ATC AAN CC 3'

を有する配列番号4由来のアンチセンスプライマーDerf3(配列番号27と称する)、または以下のヌクレオチド配列：

【0204】

【化5】

5' CCT TCT TCA CCN ACR ATG AAN CC 3'

を有する配列番号24由来のアンチセンスプライマーDerf4(配列番号28と称する)と組合わせて使用した。

【0205】

次いで、前述のプライマーを使用して、Derf cDNAライブラリーを、標準的ポリメラーゼ連鎖反応増幅(PCR)技術を用いてスクリーニングした。これらのプライマーにハイブリダイズするcDNAを同定する試み全てが、失敗した。

【0206】

(C. 抗Der HMW-map組成物抗体を使用するD. *farinae* cDNAラ 50

イブラリーの免疫スクリーニング)

PCR法を使用したcDNAクローン単離の試みが失敗したので、本発明者らは、以下のように生成した抗血清を使用して*D. farinae* cDNAライブラリーをスクリーニングした。実施例1に上記した方法に従って単離したタンパク質を抗原の供給源として使用して、本明細書中で抗Der HMW-map組成物抗体といわれるウサギポリクローナル抗体を生成した。ウサギポリクローナル抗体の調製を、標準的技術を使用して実施した。

【0207】

約7.5mlの*Escherichia coli* (XL1 Blue、O.D.₆₀₀ = 0.5)を、*Dermatophagoides farinae* ZAP-cDNAライブラリー(1.8×10⁹ pfu/ml)からの3.0×10⁴ pfuのファージとともに37℃で15分間インキュベートし、30mlのLuria-Bertani(LB)培地アガープレート(150mm)にプレートした。このプレートを、37℃で一晩インキュベートした。次いで、各プレートを、IPTG(10mM)処理したニトロセルロースフィルターで37℃で約4時間オーバーレイした。次いで、このフィルターを取り外し、0.1% Tweenを含むTris緩衝化生理食塩水(pH7.5)(TBST)で5分間洗浄した。このフィルターを、TBST中に1%脱脂粉乳、1%BSA、2%ヤギ血清および0.15%ゼラチンを調製した溶液で、室温にて2時間ブロックした。次いで、フィルターを、1:1000希釈の抗Der HMW-map組成物抗体を含む上記のブロッキング溶液とともに4℃で一晩インキュベートした。次いで、この混合物を、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化したロバ抗ウサギIgG抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PNより入手可能)とともに、室温で2時間インキュベートした。全てのフィルターを、各インキュベーションの間に、TBST中に含まれたブロッキング溶液で洗浄(1洗浄あたり3×15分)した。次いで、全てのフィルターを、Tris緩衝化生理食塩水(pH7.5)で室温にて5分間の最後の洗浄に付した。免疫複合体化プラークを、顕色化溶液(Kirkegaard & Perry LaboratoriesからのTMB Peroxidase Substrate/TMB Peroxidase Solution/TMB Membrane Enhancerを1/1/0.1の容量比で)にこのフィルターを浸して着色反応を生成することによって同定した。123プラークを同定し、50プラークをさらに、上記と同様な免疫スクリーニング条件下で2回以上精製した。

【0208】

(D. 精製したファージプラグのPCRスクリーニング)

次いで、前出の免疫スクリーニング研究において同定したファージプラグをさらに、8B項で上記したプライマーを使用するPCR増幅によって分析した。配列番号25、配列番号26、配列番号27および配列番号28によって同定された4つのプライマーの混合物を使用して、50プラークからのDNAを増幅した。PCR増幅を、標準的技術を使用して行った。得られたPCR増幅産物の1つは、約700ヌクレオチドのフラグメントを構成した。このPCR産物を、Invitrogen, Corp., TATMクローニングベクター(Invitrogen, Corp.によって提供される手順)にクローニングし、標準的技術を使用するDNA配列分析に供した。700bpのPCR産物中にコードされる配列を含むことを決定された、精製したファージ由来のファージミドを回収し、標準的技術を使用するDNA配列分析に供した。

【0209】

約1752ヌクレオチド挿入物を含むクローンを単離し、本明細書中でnDerf98₁₇₅₂と呼ぶ。核酸配列を、標準的技術を使用してnDerf98₁₇₅₂から得て、核酸配列配列番号14を有するコード鎖および核酸配列配列番号16を有する相補鎖から構成されるnDerf98₁₇₅₂と呼ばれる*Dermatophagoides farinae*核酸分子を得た。配列番号14の翻訳は、nDerf98₁₇₅₂核酸分子がアミノ酸配列配列番号15を有する全長fleatタンパク質の約555アミノ酸(本明細書

中でP D e r f 9 8 _{5 5 5}と呼ぶ)をコードすることを示唆する。ここで、開始コドンは、配列番号14のヌクレオチド1~ヌクレオチド3にわたり、終止コドンは、配列番号14のヌクレオチド1666~ヌクレオチド1668にわたるオープンリーディングフレームが予想される。P D e r f 9 8 _{5 5 5}のアミノ酸配列は、核酸配列配列番号17を有するコード鎖および核酸配列配列番号19を有する相補鎖を有する核酸分子n D e r f 9 8 _{1 6 6 5}によってコードされる。配列番号18としても示されるP D e r f 9 8 _{5 5 5}は、推定分子量約63.2 kDおよび推定pI約5.33を有する。配列番号15の分析は、およそそのアミノ酸1~およそそのアミノ酸19にわたるシグナルペプチドの存在を示唆する。P D e r f 9 8 _{5 3 6}と本明細書中で示される、提唱した成熟タンパク質は、約536アミノ酸を含み、この配列は、配列番号21として本明細書中に示され、そして、配列番号20(コード鎖)および配列番号22(相補鎖)によって示される、n D e r f 9 8 _{1 6 0 8}と本明細書中で示される核酸分子によってコードされる。f l e a P D e r f 9 8 _{5 3 6}のアミノ酸配列(すなわち、配列番号21)は、P D e r f 9 8 _{5 3 6}が推定分子量61.2 kDおよび推定pI約5.26を有することを予測する。

【0210】

アミノ酸配列配列番号15とGenBankに報告されたアミノ酸配列との比較は、配列番号15がAnopheles gambiae由来のキチナーゼタンパク質(GenBank登録番号2654602)に最大の相同性(すなわち、約42%の同一性)を示したことを示す。核酸配列配列番号17とGenBankに報告された核酸配列との比較は、配列番号17が、配列番号17とChelonus sp. venomキチナーゼmRNA(GenBank登録番号U10422)との間で最大の相同性(すなわち、約58%の同一性)を示したことを示す。

【0211】

(実施例9)

本実施例は、ダニアレゲンに対してアレルギー性であることが既知のイヌ由来のIgEに結合する60 kDタンパク質の精製、およびこの60 kDタンパク質由来の部分アミノ酸配列を記載する。

【0212】

(A. 60 kDタンパク質の精製)

D. farinae抽出物を調製し、実施例1に上記された方法に従ってSephacryl S-100カラムで分画した。排除ピーク(画分29~35)後の画分を、Sephaacryl S-100カラムから回収し、そしてプールした。次いで、プールした画分を、10 mM Tris-HCl (pH 8)で1:1に希釈し、Q-sepharoseカラムに適用して実施例1で上記した方法を使用して画分を得た。0.4 M Tris-HClで溶出した画分を濃縮し、実施例1で上記した方法を使用してTMS 250逆相HPLCカラムによってさらに精製した。この各文中のタンパク質を、実施例1において12%ゲルでのタンパク質分離について記載した同様の方法を使用して、14% Tris-グリシンSDS-PAGEによって分離した。染色したゲルを、図2に示す。約50% B(90%アセトニトリル中0.05% TA)で溶出した、約90%の純度の約60 kDの分子量を有するタンパク質を同定した(図2、レーン4)。示した60 kDタンパク質の分子量を、BioRad Multi-Analyst/PC Version 1.1プログラムおよびMark-12タンパク質分子量マーカーを使用して、56.11 kDであると見積もった。約60 kDタンパク質は、本明細書中でmapDタンパク質という。

【0213】

(B. 60 kDタンパク質より得たN末端部分配列および内部配列)

上記のパートAから溶出したタンパク質を、PVDF上にプロットし、これを、Coomassie R-250で染色し、標準的手順を使用して脱色した。約60 kDのバンドに対応するタンパク質を抽出し、当業者に公知の技術を使用するN末端アミノ酸配列決定に供した。約25アミノ酸のN末端アミノ酸部分配列を、このタンパク質について推定し

、配列番号 23 として本明細書中で示されるアミノ酸配列を、以下：

【0214】

【化6】

Xaa Leu Glu Pro Lys Thr Val Cys Tyr Tyr Glu Ser Trp Val His His Arg Gln Gly

Glu Gly Lys Met Asp Pro

であると推定した（ここで、Xaa は任意のアミノ酸をいう）。

【0215】

この 60kd の領域に対応するタンパク質をまた、内部アミノ酸配列データを得るために、蛋白質分解切断に供した。60kd タンパク質の消化および逆相クロマトグラフィーを、実施例 1 に記載したように実施した。4 つの蛋白質分解フラグメントを、単離および配列決定し、これらを、本明細書中で map (13)、map (14)、map (15) および map (16) という。

【0216】

map (13) の N 末端部分アミノ酸配列を、以下：

【0217】

【化7】

Gln Tyr Gly Val Thr Gln Ala Val Val Thr Gln Pro Ala

として決定し、これをまた、配列番号 29 と示した。map (14) の N 末端部分アミノ酸配列を、以下：

【0218】

【化8】

Asp Glu Leu Leu Met Lys Ser Gly Pro Gly Pro

として決定し、これをまた、配列番号 30 と示した。map (15) の N 末端部分アミノ酸配列を、以下：

【0219】

【化9】

Asp Met Glu His Phe

Thr Gln His Lys Gly Asn Ala Lys Ala Met Ile Ala Val Gly Gly Ser Thr Met Ser

として決定し、これをまた、配列番号 31 と示した。map (16) の N 末端部分アミノ酸配列を、以下：

【0220】

【化10】

Asp Ala Asn Glu Glu Ala Arg Ser Gln Leu Pro Glu Thr Ala Met Val

Leu Ile Lys Ser Gln

として決定し、これをまた、配列番号 32 と示した。

【0221】

（実施例 10）

本実施例は、D. farinae 60kD (map D) アレルゲンの一部をコードする核酸分子の単離および配列決定を記載する。

【0222】

実施例 8 で先に記載したように、D. farinae ライブラリーを調製した。D. farinae 60kD タンパク質（配列番号 23）について推定される N 末端アミノ酸配列より、縮重合成オリゴヌクレオチドプライマーを設計した：配列番号 23 の約 3 ~ 約 11 のアミノ酸残基に対応するセンスプライマーであるプライマー 1 は、配列番号 46 とし

10

20

30

40

50

ても識別される配列：

【0223】

【化11】

5' GAACCAAAA CHGTNTGYTA YTAYG 3'

を有し、ここで、Hは、AまたはCまたはTを示し、Nは、AまたはCまたはGまたはTを示し、そしてYは、CまたはTを示す。D. farinaeライブラリー由来のフラグメントのPCR増幅を、標準的技術を使用して行った。配列番号46（プライマー1）、および配列番号47として示されるM13順方向ユニバーサルプライマー：

【0224】

【化12】

5'GTAAAACGACG GCCAGT 3'

の組合わせを使用して、PCR増幅産物を生成した。

【0225】

第二の入れ子（nested）PCR反応を、第一のPCR反応の産物に対して行った。60kDタンパク質内部アミノ酸配列（配列番号31）のおよそのアミノ酸残基1～アミノ酸残基10にわたる領域に対応する、合成オリゴヌクレオチドを合成した。このプライマー（プライマー2）は、配列番号48として示される以下の核酸配列：

【0226】

【化13】

5' GATATGGAAC ATTTYACHCA ACAYAARGG 3'

を有し、ここで、Rは、AまたはGを示す。プライマー2（配列番号48）、および配列番号49として示されるT7標準プライマー：

【0227】

【化14】

5' GTAATACGAC TCACTATAGG GC 3'

の組合わせを使用して、PCR増幅産物を生成した。生じたPCR産物を、標準的技術を使用するDNA配列分析に供した。

【0228】

このPCR産物を配列決定し、510ヌクレオチドを含むことを見出し、これは、nDerf60₅₁₀として識別される。nDerf60₅₁₀のコード鎖のヌクレオチド配列を、本明細書中で配列番号43として示し、そしてその相補体を、配列番号45として示す。配列番号43の翻訳は、nDerf60₅₁₀が、配列番号44に示されるアミノ酸配列を有する約170アミノ酸の部分D. farinae 60kDタンパク質（本明細書中でPDerf60₁₇₀と呼ぶ）をコードすることを示唆する。ここで、開始コドンは配列番号43のおよそのヌクレオチド1～およそのヌクレオチド3にわたり、終止コドンは、配列番号43のおよそのヌクレオチド508～およそのヌクレオチド510にわたるオープンリーディングフレームを推定する。PDerf60₁₇₀は、推定分子量約19.2kDおよび推定pI約6.51を有する。

【0229】

核酸分子nDerf60₅₁₀をプローブとして使用して、全長D. farinae 60kDタンパク質またはより大きな部分のD. farinae 60kDタンパク質に対応するタンパク質をコードする核酸分子を単離した。実施例8の上記に示した手順を使用して、標準的技術を使用して³²Pで放射標識した核酸配列番号43を用いて、全D. farinaeライブラリーをスクリーニングした。6×SSC、5×Denhardt溶液、0.5% SDS、100mg/ml ssDNA中で55にて約36時間、ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを、2×SSC、0.2% SDS中で55

10

20

30

40

50

にて1洗浄あたり30分間3回洗浄した後、0.2×SSC、0.2% SDS中で約30分間最終洗浄した。

【0230】

PCR増幅を、最初のファージプラグに対して行った。配列番号46として示されるプライマー1、および配列番号49として示されるT7標準プライマーをプライマーとして使用して、PCR産物を生成した。この1.6キロベースのPCR産物を予備的配列分析することによって、これがPDerf60全長タンパク質をコードする完全配列を含む核酸配列を示すことが示された。

【0231】

配列番号44のアミノ酸配列PDerf60₁₇₀とGenBankに報告されたアミノ酸配列との比較は、PDerf60₁₇₀がAphanodidium album.由来のキチナーゼタンパク質前駆体(GenBank登録番号P32470)と最も高い相同性(すなわち約39%の同一性)を示したことを示す。核酸配列配列番号43は、GenBankに提出された配列のいずれにも顕著な相同性を示さなかった。

【0232】

(実施例11)

本実施例は、Dermatophagoides pteronyssius 98kDアレルゲンタンパク質をコードする核酸分子の単離を記載する。

【0233】

D. farinae HMW-map組成物をコードする32-P標識したcDNAを用いるハイブリダイゼーションによって、D. farinae 98kDアレルゲン(mapB)に高い相同性を有する核酸分子を、D. pteronyssius cDNAライブラリーより単離した。

【0234】

D. pteronyssius cDNAライブラリーを、以下のように調製した。総RNAを、約2gのD. pteronyssiusダニから、Chomzynskiら、1987、Anal. Biochem. 162: pp156-159によって記載される酸-グアニジウム-フェノール-クロロホルム法を使用して抽出した。ポリA+選択されたRNAを、製造業者によって推奨される方法に従って、mRNA Purification Kit (Pharmacia, Newark, NJから入手可能)を使用するオリゴ-dTセルロースクロマトグラフィーによって、総RNA調製物から分離した。全D. pteronyssius cDNAライブラリーを、StratageneのZAP-cDNA Synthesis Kitプロトコルを使用して、-Uni-ZAPTM XRベクター(Stratagene, La Jolla, CAから入手可能)中に構築した。約5ミリグラム(mg)のポリA+RNAを使用して、D. pteronyssius cDNAライブラリーを生成した。

【0235】

cDNA Synthesis Kit (Stratageneより入手可能)に記載されるプロトコルの改変を使用して、32P-標識した、D. farinae 97kD MapBアレルゲン(すなわち、配列番号17)をコードするcDNAで、全D. pteronyssius cDNAライブラリーを二連のプラークリフト(plaque lift)を使用してスクリーニングした。ハイブリダイゼーションを、6×SSC(処方について、Sambrookら、同書を参照のこと)、5×Denhardt溶液(処方について、Sambrookら、同書を参照のこと)、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)(Sigmaより入手可能)、および100mg/mlの一本鎖DNA(Sigmaより入手可能)中で、55にて約36時間行った。2×SSC、0.2% SDS中で55にてフィルターを3回洗浄し(1洗浄あたり約30分間)、続いて、0.2×SSC、0.2% SDS中で55にて約30分間フィルターを最終洗浄した。D. pteronyssius 97kDアレルゲン(mapB)をコードする、D. pteronyssius核酸分子のプラーク精製したクローンを、ZAP-cDNA Sy

nthesis Kit (Stratageneより入手可能)に記載されるインビボ切除プロトコルに従って、ExAssistTMヘルパーファージおよびSOLRTM E.coliを用いて二本鎖組換え分子に変換した。D. pteronyssiusクローンを含むプラスミドを、標準的技術を使用するDNA配列分析に供した。DNA配列分析(分子量および等電点(pI)の決定を含む)を、GCTMプログラムを使用して行った。

【0236】

約1621ヌクレオチド挿入物を含むクローンを単離した。これは、本明細書中でnDerp98₁₆₂₁と呼ぶ、配列番号34として示されるコード鎖および配列番号36として示される相補鎖を有する全長コード領域を含む。明白な開始コドンおよび終止コドンは、それぞれ配列番号34のヌクレオチド14~ヌクレオチド16、およびヌクレオチド1541~ヌクレオチド1543にわたる。推定のポリアデニル化シグナル(5' AATAA3')は、配列番号34のヌクレオチド1584~ヌクレオチド1589にわたる領域に位置する。

10

【0237】

配列番号34の翻訳は、配列番号35として示されるアミノ酸配列であり、PDerp98₅₀₉として示される、約509アミノ酸のタンパク質を生じる。PDerp98₅₀₉をコードするコード領域からなる核酸分子は、本明細書中でnDerp98₁₅₂₇として呼ばれ、その核酸配列は、配列番号37(コード鎖)および配列番号39(相補鎖)として示される。本明細書中で配列番号38としても示されるPDerp98₅₀₉のアミノ酸配列は、推定分子量約58.9kDおよび推定pI約5.61を有する。PDerp98₅₀₉の分析は、およそそのアミノ酸1~およそそのアミノ酸19にわたるシグナルペプチドの存在を示唆する。提唱した成熟タンパク質(本明細書中でPDerp98₄₉₀として示される)は、約490アミノ酸を含み、そして本明細書中で配列番号41として示される。PDerp98₄₉₀のアミノ酸配列によって、このタンパク質が、推定分子量約56.8kDおよび推定pI約5.49、ならびに2つのアスパラギン連結グリコシル化部位(それぞれ、およそそのアミノ酸115~およそそのアミノ酸117、およびおよそそのアミノ酸240~アミノ酸242に伸展する)を有することを予想する。PDerp98₄₉₀をコードする核酸分子は、配列番号40によって示されるコード鎖および配列番号42によって示される相補鎖を有するnDerp98₁₄₇₀として公知である。

20

30

【0238】

BLAST検索を、以前に記載されるように実施した。PDerp98₅₀₉(配列番号35)は、Manduca sextaキチナーゼ(SwissProt登録番号p36362)とアミノ酸レベルで最も高い相同性を示し、約34%の同一性を有した。nDerp98₁₆₂₁(配列番号34)は、Chelonus sp.キチナーゼ(登録番号U10422)に核酸レベルで最も高い相同性を示し、約49%の同一性を有した。D. farinaeの98kDのアレルゲンタンパク質についてのコード領域に対応するcDNA領域と、D. pteronyssiusの98kDのアレルゲンタンパク質についてのコード領域に対応するcDNA領域との比較は、約84%の同一性を示す。

【0239】

(実施例14)

本実施例は、D. farinae HMW-map組成物の、ダニアレルゲンに対してアレルギー性であることが公知の、ヒトから単離されたヒト血清中のヒトIgEへの結合を示す。

40

【0240】

RAS^Tすなわちラスト法(radio-allergo-absorbent test)と呼ばれる技術を使用した。なぜなら、ヒト血清中に存在するヒトIgEの量が非常に低いためである。RAS^Tを、本質的に、Aalberse, RCら(1981)J. Allergy Clin Immunol. 68:356~364頁において記載されるように実施した。単位IU/mlを計算するために、標準曲線を、Derp2に対する十分

50

に特徴付けられたキメラヒト/マウスIgEモノクローナル抗体(ヒトIgE/モノクローナル抗Derp2、Schuurmanら(1997) J Allergy Clin Immunol. 99:545~550頁の手順に従う)のいくつかの希釈物を用いてRASTを行なうことによって導き出した。

【0241】

手短に言うと、50 μ gのHMW-map組成物(実施例1に記載されるように精製した)を、製造業者のプロトコルに従って、50mgのCNBr活性型Sephrose 4B(Pharmacia, Piscataway, NJより入手可能)に結合させた。ヒト血清を、全ダニD. farinae抽出物についてポジティブなRASTに基づいて選択し(全部で17個の異なるサンプル)、ポジティブなRAST数は、1IU/mlより大きい。2つのネガティブ(0.3IU未満)コントロール血清もまた含んだ。 10

【0242】

各々の個体の血清サンプルを試験するために、0.5mgのD. farinae HMW-map組成物結合Sephroseを、総容量300 μ lのPBS-T(0.1%容量/容量Tween-20(Sigmaより入手可能)を添加したリン酸緩衝化生理食塩水)中50 μ lの血清と共にインキュベートした。インキュベーションは、振盪しながら27 $^{\circ}$ Cで一晩行なった。インキュベーション後、結合したSephroseをPBS-Tで5回洗浄した。総容量750 μ l中(4.5%(v/v)ウシ血清および0.5%(v/v)ヒツジ血清を含むPBS-T中で希釈した)放射性標識した(125 I-ヨウ素)ヒツジ抗ヒトIgE(標準的な放射ヨウ素化標識プロトコルによって作製された)を添加し、そして27 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。インキュベーション後、結合したSephroseを、PBS-Tで4回洗浄し、そしてカウンターでカウントしてHMW-map組成物結合Sephroseに結合した放射性標識したヒツジ抗ヒトIgEの量を決定した。結果を表4に示す。 20

【0243】

(表4. D. farinae由来のHMW-map組成物へのヒトIgEの結合)

【0244】

【表4】

血清番号	RAST, D. farinae 全抽出物, IU	RAST, HMW-map 組成物, IU
1445	>100	48
1456	>100	42
1458	21.1	0.5
1460	14.1	2.5
1463	37.6	0.1
1464	37.2	2.0
1465	14.5	0.7
1466	89.9	7.7
1468	>100	19.9
1471	31.9	0.8
1491	23.8	1.0
1496	25.3	3.6
1505	5.1	0.2
1523	1.0	<0.1
1529	1.2	0.7
1530 (コントロール)	0.2	<0.1
1531 (コントロール)	0.1	<0.1

10

20

30

40

50

D. farinae 全ダニ抽出物に対して感受性を示した患者の約75% (15人中11人)は、HMW-map 組成物抗原に対して感受性であり、このことは、HMW-map 組成物抗原が、D. farinae 感受性ヒトに対する主要な抗原であることを示す。HMW-map 組成物に対する感受性は、0.5 IU以上のRASTとして規定された。

【0245】

(実施例15)

本実施例は、実施例1に記載されるD. farinae HMW-map 組成物が糖タンパク質を含むことを実証する。

【0246】

実施例1に従って調製された約5.4 µgのD. farinae HMW-map 組成物を、SDS PAGEに適用し、そして電気泳動を標準的な技術に従って行なった。このタンパク質を、標準的な技術に従ってニトロセルロース膜にプロットし、そして糖タンパク質を、製造業者のプロトコルを使用して、DIG^TM グリシン検出キット (Boehringer Mannheim, Indianapolis, INより入手可能) を使用して検出した。HMW-map 領域に対応する領域は、キットを用いて陽性反応を示し、このことは、HMW-map 組成物が糖タンパク質を含むことを示す。

【0247】

(実施例16)

本実施例は、D. farinae HMW-map 組成物が、化学的手段および酵素的手段の両方によって、アミノ酸残基が取り除かれる場合でさえ、アレルゲンとしてのその特徴を保持することを示す。この結果は、主なエピトープが、HMW-map 組成物上のN連結グリコシル化部位またはO連結グリコシル化部位に結合した多糖を含む、炭水化物エピトープであり得ることを示唆する。

【0248】

(A. 化学的手段によるタンパク質除去 (タンパク質の除去))

12 µg (マイクログラム) のHMW-map 組成物 (実施例1に記載されるように精製

された)を、100 μ l(マイクロリットル)の蒸留した脱イオン水中に溶解した。この混合物に、5 μ lの10M(モラー)NaOHおよび3.8mg(ミリグラム)NaBH₄(Sigmaより入手可能)を添加して、0.5M NaOHおよび1M NaBH₄の最終濃度を得た。この反応混合物を、50で30分間加熱し、次いで冷却し、そして100 μ lのアセトンを添加した。この混合物に、十分な量(すなわち、約150 μ l)のDowex 50(H⁺)(Pharmaciaより入手可能)を添加して、わずかに酸性の溶液を作製した。Dowex 50は、タンパク質を吸収および除去し、上清に任意の糖部分を残す。この混合物を、マイクロ遠心分離機で遠心分離し、そして100 μ lの水で3回洗浄した。遠心分離からの上清を合わせて、乾燥するまで蒸発させて、メタノール:HCl溶液(1000:1 v/v)で5回洗浄し、各洗浄後、乾燥するまで蒸発させて塩を取り除く。この混合物を、100 μ lの水に溶解し、そして一部(20 μ l)を標準的な技術を使用するSDS-PAGEによって分析し、そしてクマシーブルー染色および銀染色の両方を使用して、化学的に処理されたサンプル中のタンパク質の量を決定した。クマシーブルー染色および銀染色のいずれによってもタンパク質は検出されず、このことは、タンパク質の除去を示す。タンパク質上の任意の糖部分は、これらの条件によって影響されなかった。

【0249】

各サンプルからの残渣の残りを、実施例4に記載されるように、ELISA分析に供した。手短に言うと、100ngのHMW-map組成物の除去サンプルまたは非除去サンプルのいずれかをImmulonプレートにコーティングし、そしてD. farinae感受性イヌ血清プール、D. farinae感受性ネコ血清プール、および(ELISAによって測定される場合)D. farinae感受性または非感受性のいずれかである種々の別々のイヌ血清を用いて、ELISAを、実施例4に記載されるように実行した。結果を表5に示す。

【0250】

(表5. HMW-map組成物および除去HMW-map組成物(これは、炭水化物のみである)に対するイヌ血清およびネコ血清の反応性)

【0251】

【表5】

使用した血清	除去 HMW-map OD(炭水化物抗原)	未処理 HMW-map 組成物, OD X 10 ⁻³
D. farinae イヌプール	1233	1931
D. farinae ネコプール	2837	3115
イヌ 1621A	15	0
イヌ 1621C	24	21
イヌ 1621S	59	420
イヌ 1626C	23	214
イヌ SPF-2	16	0

表5からの結果は、除去HMW-map組成物サンプルが、D. farinae HMW-map組成物に感受性であるイヌ血清およびネコ血清由来のIgEを結合する能力をまだ保持することを示し、このことは、タンパク質に結合したグリカンが、HMW-map組成物アレルゲンタンパク質の主要なエピトープを構成することを示す。

【0252】

(B. 酵素的手段によるタンパク質除去)

14 μ gのHMW-map組成物(実施例1に記載されるように精製した)を、1 μ gエンドプロテイナーゼK(Sigmaより入手可能)で消化して、分子のタンパク質部分を除去する。消化反応を、56で24時間行ない、その後、反応物中のエンドプロテ

ナーゼを、煮沸水中で10分間熱変性させた。

【0253】

この反応物の一部を、標準的な技術を使用するSDS-PAGEによって分析し、そしてクマシーブルー染色および銀染色の両方を使用して、酵素的に消化したサンプル中のタンパク質の存在を検出した。HMW-map組成物は、クマシーブルー染色および銀染色のいずれによっても検出されず、このことは、HMW-map組成物の除去を示す。タンパク質上のグリコシル化部位を介して結合したグリカンはいずれも、これらの条件によって影響されなかった。

【0254】

酵素的に消化した反応物の残りを、実施例4に記載される様式で、ELISAによって試験した。手短に言うと、100ngのHMW-map組成物のプロテイナーゼK消化サンプルまたはプロテイナーゼK未消化サンプルのいずれかをImmulonプレートにコーティングし、そしてELISAを、(ELISAによって測定される場合)D.farinae感受性または非感受性のいずれかである種々の別々のイヌ血清を用いて、実施例4に記載されるように実行した。結果を表6に示す。

10

【0255】

(表6.HMW-map組成物およびエンドプロテイナーゼK消化HMW-map組成物に対するイヌ血清の反応性)

【0256】

【表6】

20

イヌ番号	<i>D. farinae</i> 感受性? ¹	OD ₅₅₀ : HMW-map 組成物でコーティングしたウェル	OD ₅₅₀ : プロテイナーゼK消化HMW-mapでコーティングしたウェル
1	はい	120	122
2	はい	1637	1561
3	はい	858	383
4	はい	914	509
5	はい	277	227
6	はい	2891	2636
7	いいえ	10	11
8	はい	4056	3880
9	はい	1920	1626
10	はい	472	432
11	はい	328	213
12	はい	2913	2530
13	はい	1232	984
14	はい	3153	2355
15	いいえ	6	46
16	はい	860	339
17	はい	2429	750
18	はい	1194	351
19	はい	2655	1443
20	はい	3285	1207
21	はい	2636	1240
22	はい	1097	848
23	はい	1621	1408
24	はい	2113	1592
25	はい	1169	408
26	はい	4200	4200
27	はい	4200	4200
28	はい	3222	2932
29	はい	2468	2118
30	はい	3339	2454
31	いいえ	0	4

¹ 別々の実験での ELISA による

表 6 からの結果は、プロテイナーゼ K 消化 HMW-map 組成物サンプルが、*D. farinae* HMW-map 組成物に感受性であるイヌ血清およびネコ血清由来の IgE を結合する能力をまだ保持することを示し、このことは、タンパク質に結合したグリカンが、HMW-map 組成物上の主要なエピトープを構成することを示唆する。

【0257】

(実施例 17)

本実施例は、HMW-map 組成物から N 連結グリカンを除去する試みを記載する。

【0258】

HMW-map 組成物 (2 μg) (実施例 1 におけるように精製された) を、製造業者の指示に従って、N-グリコシダーゼ F (Boehringer-Mannheim より入手可能) を用いて消化した。消化物を、SDS-PAGE によって分析し、そして標準的

10

20

30

50

なプロトコルに従って染色した。2 μ g Fetuin (Sigmaより入手可能)を、ポジティブなN連結グリコシル化タンパク質コントロールとして使用した。SDS-PAGEの分析は、インタクトなmap Bタンパク質および消化したmap Bタンパク質の分子量の間に見かけの差異は存在しないことを示した。ポジティブコントロールのfetuinは、N-グリコシダーゼFでの消化後に分子量の減少を示さなかった。この結果は、HMW-map組成物上にN連結グリカンが存在しないこと、またはHMW-map組成物上に小さいサイズのNグリカンのみが存在することを示す。

【0259】

(実施例18)

本実施例は、全長Dermatophagoides farinaeの60kDアレルゲンをコードする核酸分子の単離および配列決定を記載する。 10

【0260】

この核酸分子を、実施例10に記載されるDermatophagoides farinaeの60kDアレルゲンの一部をコードする³²P-標識されたcDNAとハイブリダイズする能力によって、Dermatophagoides farinaeのcDNAライブラリーから単離した。

【0261】

Dermatophagoides farinae cDNAライブラリーを、以下のように調製した。全RNAを、Chomzynskiら、1987、Anal. Biochem. 162, 156~159によって記載される方法に類似の、酸グアニジニウム-フェノール-クロロホルム法を用いて、約2グラムのD. farinaeダニから抽出した。ポリA⁺選択したRNAを、製造者によって推奨される方法に従って、mRNA精製キット(Pharmacia Biotech, Newark, NJから入手可能)を用いて、オリゴdTセルロースクロマトグラフィーによって、全RNA調製物から分離した。全ダニcDNAライブラリーを、StratageneのZAP-cDNA Synthesis Kitプロトコルを用いて、lambda-Uni-ZAPTM XRベクター(Stratageneから入手可能)中に構築した。約5 μ gのポリA⁺ RNAを使用して、D. farinae cDNAライブラリーを生成した。 20

【0262】

cDNA Synthesis Kit中に記載されるプロトコルの改変を用いて、³²P-標識されたcDNA nDerf60₅₁₀を有する複数のブランクリフトを用いて、全ダニcDNAライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションを、6 x SSC、5 x Denhardt溶液、0.5% SDS、100 mg/mlのssDNAで、52 で18時間行った。フィルターを、各洗浄あたり、2 x SSC、0.2%のSDS中、55 で30分で、2回洗浄した後、約0.2 x SSCを用いる以外は同じ緩衝液中で、30分間最終の洗浄を行った。D. farinaeの60kDアレルゲンをコードする核酸分子のブランク精製クローンを、ZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratageneから入手可能)中に記載されるインビボでの切り出しプロトコルに従って、ExAssistTM ヘルパーファージおよびSOLRTM E. coliを用いて、二本鎖組換え分子へと変換し、これを本明細書中において、nDerf60₄₅₅として示す。二本鎖プラスミドDNAを、アルカリ溶解プロトコル(例えば、Sambrookら、前出に記載される)を用いて調製した。 30

【0263】

(実施例19)

本実施例は、本発明のD. farinae核酸分子の配列決定を記載する。 40

【0264】

nDerf60₁₄₅₅を含むプラスミドを、Sangerジデオキシ鎖停止法によって、Ampli Taq DNAポリメラーゼ、FS(Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CTから入手可能)を用いたPRISMTM Ready Dye Terminator Cycle Sequencing Kitを 50

用いて、配列決定した。PCR伸長を、GeneAmpTM PCR System 9600 (Perkin-Elmerから入手可能)中で行った。過剰の色素ターミネーターを、製造者の標準的なプロトコルに従って、CentriflexTM Gel Filtration Cartridge (Advanced Genetics Technologies Corporation, Gaithersburg, MDから入手可能)を用いて、伸長産物から除去した。サンプルを、ABIプロトコルに従って再懸濁し、そして、Perkin-Elmer ABI PRISMTM 377 Automated DNA Sequencerにかけた。配列の編集およびオープンリーディングフレームの決定を含むDNA配列分析を、GCGTM プログラム (Genetics Computer Group, Madison, WIから入手可能)を用いて行った。分子量および当電点 (pI) の決定を含むタンパク質配列分析を、GCGTM プログラムを用いて行った。

【0265】

完全なnDerf60₁₄₅₅ 核酸分子の約1455ヌクレオチドコンセンサス配列を決定した；2つの相補鎖の配列が、配列番号50 (コード鎖) および配列番号52 (相補鎖) として存在する。この2つの相補的な鎖の配列を、配列番号50 (コード鎖) および配列番号52 (相補鎖) として示す。nDerf60₁₄₅₅ 配列は、全長のコード領域を含む。明らかな開始コドンおよび停止コドン範囲は、それぞれ、配列番号50の14~16および1400~1402のヌクレオチドにわたる。推定ポリアデニル化シグナル (5' AATAA A3') は、配列番号50のヌクレオチド約1408~1413にわたる領域内に配置される。

【0266】

配列番号50の翻訳は、PDerf60₄₆₂ と示される、462アミノ酸のタンパク質を生じ、このアミノ酸配列は、配列番号51に示される。PDerf60₄₆₂ をコードするコード領域からなる核酸分子は、本明細書中で、nDerf60₁₃₈₆ といひ、この核酸配列は、配列番号53 (コード鎖) および配列番号54 (相補鎖) に示される。PDerf60₄₆₂ のアミノ酸配列 (すなわち、配列番号51) は、PDerf60₄₆₂ が、約52.1kDの推定分子量を有し、約5.73の推定PIを有することを予測する。配列番号51の分析は、アミノ酸1~アミノ酸25にわたるアミノ酸の範囲によってコードされるシグナルペプチドの存在を示唆する。提唱された成熟タンパク質は、本明細書中でPDerf60₄₃₇ と示され、このタンパク質は、本明細書中で配列番号56と示される約437アミノ酸を含む。PDerf60₄₃₇ のアミノ酸配列 (すなわち、配列番号56) は、PDerf60₄₆₂ が、約50.0kDの推定分子量を有し、約5.61の推定PI、およびアミノ酸313~アミノ酸315にわたる1つの推定アスパラギン連結グリコシル化部位を有することを予測する。この成熟タンパク質をコードする核酸分子を、配列番号55と示し、その逆位相補体を、配列番号57と示す。

【0267】

BLASTp検索を、以下に従って行った：Altschulら, (1990), J. Mol. Biol. 215: 403~410; およびAltschulら, (1997), Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402。タンパク質検索を、配列番号51を用いて行い、この配列番号51は、キチナーゼ分子に対して有意な相同性を示した。アミノ酸レベルでの相同性検索のスコア一致が最も高いのは、PIR受託番号A53918: Chelonus spキチナーゼ前駆体であり、これは、配列番号51と約32%同一であった。ヌクレオチドレベルで、この検索を、配列番号53を用いて行い、この配列番号53は、データベース中の任意の配列と有意な類似性を示さなかった。配列分析を、上述のようにGCG GAPプログラムを用いて行った。

【0268】

(実施例20)

本実施例は、D. farinae HMW-map組成物 (これは、Derf 15ともいわれる) の特徴付けをさらに記載する。

10

20

30

40

50

【0269】

実施例8の核酸分子nDerf98₁₇₅₂を、適切な発現ベクターに挿入し、E.coliおよびP.pastors中で発現させた。得られたタンパク質(PDerf98₅₅)が、E.coliまたはP.pastoris中で発現される場合、実施例4に記載されるように産生した、感作されたイヌ血清は、組換えタンパク質を認識できなかった。このことは、実施例1のネイティブなD.farinae HMW-map組成物(これはまた、ネイティブなDerf15ともいう)が使用される場合に得られる陽性の結果と対照的である;実施例4を参照のこと。

【0270】

E.coli中で発現されるタンパク質の非反応性は、実施例16に示される結果と一致し、この結果は、ネイティブなHMWアレルゲンが、アミノ酸が除去された後でさえ、アレルゲンとしての特性を保持していることを示した。 10

【0271】

これらの結果を全て合わせると、主要なエピトープは、分子または他の二次的改変のいくつかの炭化水素領域であることが示唆される。

【0272】

ネイティブなDerf15タンパク質の抗原性は、過ヨウ素酸処理の後に失われず;一般的に、炭化水素エピトープは、さらなる基でさらに置換されたエピトープ、またはジェミナルでないヒドロキシル基を有する珍しい糖を有するエピトープを除いて、過ヨウ素酸塩によって破壊される。 20

【0273】

ネイティブなDerf15抗原を、炭化水素含量に関して分析した。炭化水素の実質的な量が見い出された(約30重量%)。特に、約2.8重量%の抗原から構成されるマンノース;ガラクトース約23.2%;グルコース約4.3%(グリコシル残基の存在は、グルコースがしばしば糖タンパク質を含むため、仮の値であるとみなされなければならない);そして検出可能なレベルでのHexNAc;さらなる観察により、HexNAcがGlcNAcおよびGalNAcであることが明らかとなった。

【0274】

ネイティブなDerf15タンパク質を、NaBH₄存在下にて塩基で処理して、P-4サイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。Derf15中に存在するO-連結オリゴ糖によって、このカラムが役に立たないことを見い出した。この結果は、非常に大きなO-連結オリゴ糖、またはオリゴ糖上のサルフェートのような酸性基の存在のいずれかと一致する。サルフェートの存在または非存在をより直接的に決定するための試みは、あいまいな結果を与えた。 30

【0275】

Derf15を、pH4、pH5、およびpH7で、37にて一晩処理した。次いで、得られたサンプルを、このタンパク質に対する抗体またはDerf15と反応性であることが公知のイヌ血清でプローブした。pH5およびpH7で処理したサンプルにおいて、イヌ抗血清エピトープの全てが破壊されたが、pH4で処理されたサンプルにおいて、いくらか活性が残った。抗Derf15抗体は、脱グリコシル化が起こったかのように、全てのpHで、Derf15の分子量が減少したことを示し、pH4では元の物質がいくらか残っている。この変化が、Derf15タンパク質による自己触媒であったかまたは化学的に生じたか否かは、知られていない;理論に縛られないが、エピトープの喪失がこのような温和な条件下で生じるため、自己触媒作用が起こったと考えられる。 40

【0276】

(実施例21)

本実施例は、ネコ血清中のネコIgEに対する、いくつかのイエダニ(HDM)アレルゲンの結合を記載する。

【0277】

イエダニに対するネコのIgE応答のアレルゲンプロフィールは、イヌのものとは異なっ 50

ているようである。Heska's Veterinary Diagnostic Laboratories (VDL) に2000年1月に提出されたネコ血清に対するIgE試験の結果の検査は、全てのアレルゲン特異的なIgE陽性のネコの40%が、抗HDM IgEを有したことを示した。これらのネコの全ては、D. farinaeおよびD. pteronyssinusの両方に対して陽性であった。D. farinaeに関して陽性であることが公知の88の血清を、Derf1、Derf2、Derf15、および60kDアレルゲンの高度に精製された調製物に対して、ELISAによってアッセイした。このアッセイにおいて、32%のネコが、Derf1について陽性であり、42%が、Derf2について陽性であり、68%がDerf15について陽性であり、そして86%が、60kDアレルゲンについて陽性であった。

10

【0278】

本発明の種々の実施形態が詳細に記載されているが、これらの実施形態の改変および適応が、当業者に思い浮かぶことは、明らかである。しかし、このような改変および適応が、添付の特許請求の範囲に記載されるような、本発明の範囲内であることが明らかに理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】**【図1】**

図1は、12% Tris - グリシン SDS - PAGEにより分離された高分子量のDerfタンパク質を示す。

【図2】

図2は、14% Tris - グリシン SDS - PAGEにより分離された約60kDのDerfタンパク質を示す。

20

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

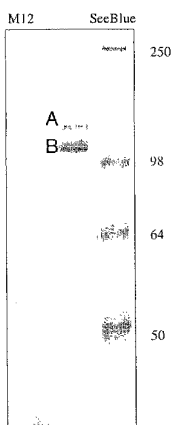
(10) International Publication Number
WO 02/22807 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/00 [US/US]; 2625 Silver Creek Drive, Fort Collins, CO 80525 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/28730
- (22) International Filing Date: 14 September 2001 (14.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/662,293 14 September 2000 (14.09.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): HESKA CORPORATION [US/US]; 1613 Prospect Parkway, Fort Collins, CO 80525 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): MCCALL, Catherine, A. [GB/US]; 709 Pleasant Street, Boulder, CO 80302 (US). HUNTER, Shirley, Wu [US/US]; 2325 Tanglewood Drive, Fort Collins, CO 80525 (US). WEBER, Eric, R.
- (74) Agents: VERSER, Carol, Talkington et al.; Heska Corporation, 1613 Prospect Parkway, Fort Collins, CO 80525 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL DERMATOPHAGOIDES NUCLEIC ACID MOLECULES, PROTEINS AND USES THEREOF

WO 02/22807 A2



(57) Abstract: The present invention relates to high molecular weight *Dermatophagoides* proteins, nucleic acid molecules encoding such proteins, and therapeutic and diagnostic reagents derived from such proteins.

WO 02/22807 A2

**Declarations under Rule 4.17:**

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(iii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC,

EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-1-

NOVEL DERMATOPHAGOIDES NUCLEIC ACID MOLECULES,
PROTEINS AND USES THEREOF

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to high molecular weight *Dermatophagoides*
5 proteins, nucleic acid molecules and therapeutic and diagnostic reagents derived from
such proteins.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Immunoglobulin E (IgE) mediated allergic symptoms afflict many animals.
IgE antibody production in an animal can induce pathogenic IgE responses including,
10 for example, atopic disease, asthma and rhinitis. Allergens are proteins or peptides
characterized by their ability to induce a pathogenic IgE response in susceptible
individuals.

House dust mite (e.g., *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides*
pteronyssinus; *Der f* and *Der p*, respectively) allergens are major causative agents
15 associated with IgE-mediated pathogenesis. Previous investigators have identified two
major groups of dust mite allergens in humans, group I (*Der f* I and *Der p* I, Mr
25,000) and group 2 (*Der f* II and *Der p* II, Mr 14,000); reviewed in Chapman, et al.,
Allergy, vol. 52, pp.37-379, 1997. Prior investigators have disclosed nucleotide and/or
amino acid sequences for: *Der f* I, *Der f* II, *Der p* I and *Der p* II, U.S. Patent No.
20 5,552,142, to Thomas et al., issued September 3, 1996, U.S. Patent No. 5,460,977, to
Ando et al., issued October 24, 1995, PCT Patent Publication No. WO 95/28424, by
Chen et al., published October 26, 1995, U.S. Patent No. 5,433,948, to Thomas et al.,
issued July 18, 1995, PCT Patent Publication No. WO 93/08279, by Garmen et al.,
published March 4, 1993, or Chapman, *ibid.*; *Der p* III, PCT Patent Publication No.
25 WO 95/15976, by Thomas et al., published June 15, 1995; *Der p* VII, PCT Patent
Publication No. WO 94/20614, by Thomas et al., published September 15, 1994; a 40-
kilodalton (kd) *Der f* allergen, U.S. Patent No. 5,405,758, to Oka et al., issued April
11, 1995, U.S. Patent No. 5,314,991, to Oka et al., issued May 24, 1994; a 70-kd *Der f*
allergen which is a heat shock protein (Hsp70), Aki et al., *J. Biochem.*, vol. 115, pp.
30 435-440, 1994; or Noli et al., *Vet. Immunol. Immunopath.*, vol. 52, pp. 147-157, 1996;
and a 98-kd *Der f* paramyosin-like allergen, Tsai et al, *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-2-

102, pp. 295-303, 1998. None of these published sequences indicates, suggests or predicts any of the mite allergic nucleic acid molecules or proteins of the present invention, nor the relevance of such proteins as being immunoreactive with IgE antibodies in canine, feline, or human sera.

5 Products and processes of the present invention are needed in the art that provide specific detection and treatment of mite allergy.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to novel proteins having molecular weights of about 60 kilodaltons (kd or kD), 70 kD, or from about 98 kD to about 109 kD. Such proteins include at least one epitope of a protein allergen of a mite of the genus *Dermatophagoides* and are designated herein as *Der* HMW-map proteins. Preferred proteins are *Dermatophagoides farinae* or *Dermatophagoides pteronyssius* proteins. The present invention also provides proteins that are fragments or peptides of full-length or mature proteins, as well as antibodies, mimetopes or muteins of any of such proteins. The present invention also provides nucleic acid molecules encoding any of such proteins, as well as complements thereof. The present invention also includes methods to obtain such proteins, nucleic acid molecules, antibodies, mimetopes or muteins, as well as methods to use such compounds in diagnostic or therapeutic applications. The present invention also relates to reagents comprising non-proteinaceous epitopes that bind to IgE in mite-allergic dogs and/or cats as well as to antibodies raised against such epitopes. The present invention also relates to therapeutic compositions or assay kits comprising such non-proteinaceous epitopes, as well as to methods to identify and/or desensitize an animal susceptible to an allergic response to a mite, comprising the use of non-proteinaceous epitopes of the present invention.

25 One embodiment of the present invention is at least one of the following isolated nucleic acid molecules: (a) a nucleic acid molecule comprising at least about 150 nucleotides, wherein such a nucleic acid molecule hybridizes, in a solution comprising 1X SSC and 0% formamide, at a temperature of about 50°C, to a nucleic acid molecule comprising at least one of the following nucleic acid sequences: SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-3-

NO:22, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, and a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:33 and a complement thereof; and (b) a nucleic acid molecule comprising a fragment of any of the nucleic acid molecules of (a) wherein the fragment comprises at least about 15 nucleotides. The present invention also includes recombinant molecules, recombinant viruses and recombinant cells comprising such nucleic acid sequences as well as methods to produce them.

Another embodiment of the present invention is an isolated protein encoded by at least one of the following nucleic acid molecules: (a) a nucleic acid molecule comprising at least about 150 nucleotides, wherein such a nucleic acid molecule hybridizes, in a solution comprising 1X SSC and 0% formamide, at a temperature of about 50°C, to a nucleic acid molecule comprising at least one of the following nucleic acid sequences: SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:45, and a complement of a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33; and (b) a nucleic acid molecule comprising a fragment of any of the nucleic acid molecules of (a), wherein the fragment comprises at least about 15 nucleotides.

An isolated protein of the present invention can also be encoded by a nucleic acid molecule that hybridizes under stringent hybridization conditions with the complement of a nucleic acid molecule that encodes a protein having at least one of the following amino acid sequences: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, and SEQ ID NO:44. The present invention also includes an antibody that selectively binds to a protein of the present invention as well as methods to produce and use such proteins or antibodies.

The present invention also includes a therapeutic composition for treating an allergic response to a mite. Such a therapeutic composition includes at least one of the following desensitizing compounds: (a) an isolated nucleic acid molecule of the

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-4-

present invention; (b) an isolated mite allergenic protein of the present invention; (c) a mimotope of such a mite allergenic protein; (d) a mutein of such a mite allergenic protein; (e) an antibody to such a mite allergenic protein; and (f) an inhibitor of binding of such a mite allergenic protein to IgE. Also included is a method to desensitize a host animal to an allergic response to a mite. Such a method includes the step of administering to the animal a therapeutic composition of the present invention.

One embodiment of the present invention is an assay kit for testing if an animal is susceptible to or has an allergic response to a mite. Such a kit includes an isolated protein of the present invention and a means for determining if the animal is susceptible to or has that allergic response. Such a means includes use of such a protein to identify animals susceptible to or having allergic responses to mites. The present invention also includes a method to identify an animal susceptible to or having an allergic response to a mite. Such a method includes the steps of: (a) contacting an isolated protein of the present invention with antibodies of an animal; and (b) determining immunocomplex formation between the protein and the antibodies, wherein formation of the immunocomplex indicates that the animal is susceptible to or has such an allergic response.

The present invention includes a reagent that comprises a non-proteinaceous epitope having at least one of the following identifying characteristics: (a) the epitope is resistant to β -elimination of peptides; (b) the epitope is resistant to Proteinase-K digestion; and (c) the epitope is reactive to a test designed to detect glycosylated proteins. Such an epitope binds to at least one of the following antibodies: canine IgE from dogs allergic to mites and feline IgE from cats allergic to mites. Also included is an isolated antibody that selectively binds such a non-proteinaceous epitope as well as derivatives of such an epitope.

The present invention also relates to therapeutic compositions and assay kits comprising a non-proteinaceous epitope of the present invention, as well as methods to identify and/or desensitize an animal susceptible to an allergic response to a mite, comprising the use of a non-proteinaceous epitope of the present invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Fig. 1 illustrates high molecular weight *Der f* proteins resolved by 12% Tris-Glycine SDS-PAGE.

-5-

Fig. 2 illustrates an about 60 kD *Der f* protein resolved by 14% Tris-Glycine SDS-PAGE.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides for isolated proteins having molecular weights ranging from about 60 kilodaltons (kD) to about 109 kD, that include at least one epitope of a protein allergen of a mite of the genus *Dermatophagoides*, in particular a mite of the species *Dermatophagoides farinae* and/or *Dermatophagoides pteronyssius*. Such proteins are referred to herein as *Der* HMW-map proteins. The present invention further includes methods to isolate and identify nucleic acid molecules encoding *Der* HMW-map proteins, antibodies directed against *Der* HMW-map proteins and inhibitors of *Der* HMW-map protein activity. As used herein, the term isolated *Der* HMW-map proteins refers to *Der* HMW-map proteins derived from *Dermatophagoides*, and more preferably from *Dermatophagoides farinae* and/or *Dermatophagoides pteronyssius* and, as such, can be obtained from its natural source or can be produced using, for example, recombinant nucleic acid technology or chemical synthesis. Also included in the present invention is the use of this protein and antibodies in a method to detect immunoglobulin that specifically binds to *Der* HMW-map proteins, to treat pathogenesis against mite allergens, and in other applications, such as those disclosed below. The products and processes of the present invention are advantageous because they enable the detection of anti-*Der* HMW-map antibodies in fluids of animals and the inhibition of IgE or *Der* HMW-map protein activity associated with disease.

One embodiment of the present invention is an isolated *Dermatophagoides* allergenic composition including: (a) a composition produced by a method comprising: (1) applying soluble proteins of a *Dermatophagoides* extract to a gel filtration column; (2) collecting excluded protein from the gel filtration column and applying the excluded protein to an anion exchange column; and (3) eluting proteins bound to the anion exchange column with about 0.3 M Tris-HCl, pH 8 to obtain the *Dermatophagoides* allergenic composition; and (b) a composition comprising a peptide of a protein produced in accordance with step (a), in which the allergenic composition is capable of a biological function including binding to IgE, stimulating a

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-6-

B lymphocyte response and stimulating a T lymphocyte response. Such *Dermatophagoides* allergenic composition is also referred to herein as a *Der* HMW-map composition. A suitable gel filtration column includes any gel filtration column capable of excluding proteins having a molecular weight between about 50 kD and about 150 kD. A preferred gel filtration column includes, but is not limited to a Sephacryl S-100 column. A suitable anion exchange column includes any anion exchange column capable of binding to a protein having a pI of less than about pI 6. A preferred anion exchange column includes, but is not limited to a Q-Sepharose column. As used herein, "stimulating a B lymphocyte response" refers to increasing a humoral immune response in an animal that is induced preferentially by a *Der* HMW-map of the present invention and involves the activity of a B lymphocyte in the animal. As used herein, "stimulating a T lymphocyte response" refers to increasing a cellular immune response in an animal that is induced preferentially by a *Der* HMW-map of the present invention and involves the activity of a T lymphocyte in the animal.

One embodiment of the present invention is an isolated protein that includes a *Der* HMW-map protein. It is to be noted that the term "a" or "an" entity refers to one or more of that entity; for example, a protein, a nucleic acid molecule, an antibody, an inhibitor, a compound or a therapeutic composition refers to "one or more" or "at least one" protein, nucleic acid molecule, antibody, inhibitor, compound or therapeutic composition respectively. As such, the terms "a" (or "an"), "one or more" and "at least one" can be used interchangeably herein. It is also to be noted that the terms "comprising", "including", and "having" can be used interchangeably. According to the present invention, an isolated, or biologically pure, protein, is a protein that has been removed from its natural milieu. As such, "isolated" and "biologically pure" do not necessarily reflect the extent to which the protein has been purified. An isolated protein of the present invention can be obtained from its natural source, can be produced using recombinant DNA technology, or can be produced by chemical synthesis.

As used herein, a *Der* HMW-map protein can be a full-length protein or any homolog of such a protein. As used herein, a protein can be a polypeptide or a

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-7-

peptide, as the terms are used by those of skill in the art. Preferably, a *Der* HMW-map protein comprises at least a portion of a *Der* HMW-map protein that comprises at least one epitope recognized by an IgE antibody (i.e., a protein of the present invention binds to an IgE antibody), an antibody on the surface of a B lymphocyte and/or a T cell receptor in the presence of a major histocompatibility complex (MHC) molecule from an animal demonstrating IgE-mediated pathogenesis to a *Der* HMW-map protein.

A peptide of the present invention includes a *Der* HMW-map protein of the present invention that is capable of binding to IgE, desensitizing an animal against mite allergen, stimulating a B lymphocyte response, and/or stimulating a T lymphocyte response. Preferably, a peptide of the present invention comprises a B lymphocyte epitope or a T lymphocyte epitope. A peptide having a B lymphocyte epitope can bind to an antibody. A peptide having a T lymphocyte epitope can bind to a MHC molecule in such a manner that the peptide can stimulate a T lymphocyte through a T cell receptor. According to the present invention, a peptide comprising a B lymphocyte epitope can be from about 4 residues to about 50 residues in length, preferably from about 5 residues to about 20 residues in length. According to the present invention, a peptide comprising a T lymphocyte epitope can be from about 4 residues to about 20 residues in length, preferably from about 8 residues to about 16 residues in length.

A *Der* HMW-map protein of the present invention, including a homolog, can be identified in a straight-forward manner by the protein's ability to induce an allergic response to *Der* HMW-map protein. Examples of *Der* HMW-map protein homologs include *Der* HMW-map protein in which amino acids have been deleted (e.g., a truncated version of the protein, such as a peptide), inserted, inverted, substituted and/or derivatized (e.g., by glycosylation, phosphorylation, acetylation, myristoylation, prenylation, palmitoylation, amidation and/or addition of glycerophosphatidyl inositol) such that the homolog is capable of inducing an allergic response to a natural *Der* HMW-map protein.

Der HMW-map protein homologs can be the result of natural allelic variation or natural mutation. *Der* HMW-map protein homologs of the present invention can

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-8-

also be produced using techniques known in the art including, but not limited to, direct modifications to the protein or modifications to the gene encoding the protein using, for example, classic or recombinant nucleic acid techniques to effect random or targeted mutagenesis.

- 5 One embodiment of the present invention is a *Der* HMW-map gene that includes the nucleic acid sequence SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, and SEQ ID NO:45 as well as the complements of any of these nucleic acid sequences.
- 10 These nucleic acid sequences are further described herein. For example, nucleic acid sequence SEQ ID NO:14 represents the deduced sequence of the coding strand of a cDNA (complementary DNA) denoted herein as *Der* HMW-map gene nucleic acid molecule nDerf98₁₇₅₂, the production of which is disclosed in the Examples. Nucleic acid molecule nDerf98₁₇₅₂ comprises an apparently full-length coding region. The
- 15 complement of SEQ ID NO:14 (represented herein by SEQ ID NO:16) refers to the nucleic acid sequence of the strand complementary to the strand having SEQ ID NO:14, which can easily be determined by those skilled in the art. Likewise, a nucleic acid sequence complement of any nucleic acid sequence of the present invention refers to the nucleic acid sequence of the nucleic acid strand that is complementary to (i.e.,
- 20 can form a double helix with) the strand for which the sequence is cited. It should be noted that since nucleic acid sequencing technology is not entirely error-free, SEQ ID NO:14 (as well as other nucleic acid and protein sequences presented herein) represents an apparent nucleic acid sequence of the nucleic acid molecule encoding a *Der* HMW-map protein of the present invention.
- 25 In another embodiment, a *Der* HMW-map gene or nucleic acid molecule can be an allelic variant that includes a similar but not identical sequence to SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:16, or any other *Der* HMW-map nucleic acid sequence cited herein. For example, an allelic variant of a *Der* HMW-map gene including SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:16, is a gene that occurs at essentially the same locus (or loci)
- 30 in the genome as the gene including SEQ ID NO:14 and SEQ ID NO:16, but which, due to natural variations caused by, for example, mutation or recombination, has a

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-9-

similar but not identical sequence. Because natural selection typically selects against alterations that affect function, allelic variants (i.e. alleles corresponding to, or of, cited nucleic acid sequences) usually encode proteins having similar activity to that of the protein encoded by the gene to which they are being compared. Allelic variants of
5 genes or nucleic acid molecules can also comprise alterations in the 5' or 3' untranslated regions of the gene (e.g., in regulatory control regions), or can involve alternative splicing of a nascent transcript, thereby bringing alternative exons into juxtaposition. Allelic variants are well known to those skilled in the art and would be expected to occur naturally within a given dust mite such as *Dermatophagoides*, since
10 the respective genomes are diploid, and sexual reproduction will result in the reassortment of alleles.

In one embodiment of the present invention, an isolated *Der* HMW-map protein is encoded by a nucleic acid molecule that hybridizes under stringent hybridization conditions to a gene encoding a *Der* HMW-map protein. The minimal
15 size of a *Der* HMW-map protein of the present invention is a size sufficient to be encoded by a nucleic acid molecule capable of forming a stable hybrid (i.e., hybridizing under stringent hybridization conditions) with the complementary sequence of a nucleic acid molecule encoding the corresponding natural protein. The size of a nucleic acid molecule encoding such a protein is dependent on the nucleic
20 acid composition and the percent homology between the *Der* HMW-map nucleic acid molecule and the complementary nucleic acid sequence. It can easily be understood that the extent of homology required to form a stable hybrid under stringent conditions can vary depending on whether the homologous sequences are interspersed throughout a given nucleic acid molecule or are clustered (i.e., localized) in distinct regions on a
25 given nucleic acid molecule.

The minimal size of a nucleic acid molecule capable of forming a stable hybrid with a gene encoding a *Der* HMW-map protein is typically at least about 12 nucleotides to about 15 nucleotides in length if the nucleic acid molecule is GC-rich and at least about 15 to about 17 bases in length if it is AT-rich. The minimal size of a
30 nucleic acid molecule used to encode a *Der* HMW-map protein homolog of the present invention is from about 12 to about 18 nucleotides in length, preferably about 12

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-10-

nucleotides, or about 15 nucleotides, or about 18 nucleotides in length. Thus, the minimal size of a *Der* HMW-map protein homolog of the present invention is from about 4 to about 6 amino acids in length. There is no limit, other than a practical limit, on the maximal size of a nucleic acid molecule encoding a *Der* HMW-map protein of the present invention because a nucleic acid molecule of the present invention can include a portion of a gene, an entire gene, or multiple genes. The preferred size of a protein encoded by a nucleic acid molecule of the present invention depends on whether a full-length, fusion, multivalent, or functional portion of such a protein is desired. Preferably, the preferred size of a protein encoded by a nucleic acid molecule of the present invention is a portion of the protein that induces an immune response which is about 30 amino acids, more preferably about 35 amino acids and even more preferably about 44 amino acids in length.

Stringent hybridization conditions are determined based on defined physical properties of the gene to which the nucleic acid molecule is being hybridized, and can be defined mathematically. Stringent hybridization conditions are those experimental parameters that allow an individual skilled in the art to identify significant similarities between heterologous nucleic acid molecules. These conditions are well known to those skilled in the art. See, for example, Sambrook, *et al.*, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, and Meinkoth, *et al.*, 1984, *Anal. Biochem.* 138, 267-284. As explained in detail in the cited references, the determination of hybridization conditions involves the manipulation of a set of variables including the ionic strength (M, in moles/liter), the hybridization temperature (°C), the concentration of nucleic acid helix destabilizing agents (such as formamide), the average length of the shortest hybrid duplex (n), and the percent G + C composition of the fragment to which an unknown nucleic acid molecule is being hybridized. For nucleic acid molecules of at least about 150 nucleotides, these variables are inserted into a standard mathematical formula to calculate the melting temperature, or T_m , of a given nucleic acid molecule. As defined in the formula below, T_m is the temperature at which two complementary nucleic acid molecule strands will disassociate, assuming 100% complementarity between the two strands:

$$T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 \log M + 0.41(\%G + C) - 500/n - 0.61(\%\text{formamide}).$$

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-11-

For nucleic acid molecules smaller than about 50 nucleotides, hybrid stability is defined by the dissociation temperature (T_d), which is defined as the temperature at which 50% of the duplexes dissociate. For these smaller molecules, the stability at a standard ionic strength is defined by the following equation:

$$T_d = 4(G + C) + 2(A + T).$$

A temperature of 5°C below T_d is used to detect hybridization between perfectly matched molecules.

Also well known to those skilled in the art is how base-pair mismatch, i.e. differences between two nucleic acid molecules being compared, including non-complementarity of bases at a given location, and gaps due to insertion or deletion of one or more bases at a given location on either of the nucleic acid molecules being compared, will affect T_m or T_d for nucleic acid molecules of different sizes. For example, T_m decreases about 1°C for each 1% of mismatched base-pairs for hybrids greater than about 150 bp, and T_d decreases about 5°C for each mismatched base-pair for hybrids below about 50 bp. Conditions for hybrids between about 50 and about 150 base-pairs can be determined empirically and without undue experimentation using standard laboratory procedures well known to those skilled in the art. These simple procedures allow one skilled in the art to set the hybridization conditions (by altering, for example, the salt concentration, the formamide concentration or the temperature) so that only nucleic acid hybrids with less than a specified % base-pair mismatch will hybridize. Stringent hybridization conditions are commonly understood by those skilled in the art to be those experimental conditions that will allow hybridization between molecules having about 30% or less base-pair mismatch (i.e., about 70% or greater identity). Because one skilled in the art can easily determine whether a given nucleic acid molecule to be tested is less than or greater than about 50 nucleotides, and can therefore choose the appropriate formula for determining hybridization conditions, he or she can determine whether the nucleic acid molecule will hybridize with a given gene under stringent hybridization conditions and similarly whether the nucleic acid molecule will hybridize under conditions designed to allow a desired amount of base pair mismatch.

Hybridization reactions are often carried out by attaching the nucleic acid molecule to be hybridized to a solid support such as a membrane, and then hybridizing

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-12-

with a labeled nucleic acid molecule, typically referred to as a probe, suspended in a hybridization solution. Examples of common hybridization reaction techniques include, but are not limited to, the well-known Southern and northern blotting procedures. Typically, the actual hybridization reaction is done under non-stringent conditions, i.e., at a lower temperature and/or a higher salt concentration, and then high stringency is achieved by washing the membrane in a solution with a higher temperature and/or lower salt concentration in order to achieve the desired stringency.

For example, if the skilled artisan wished to identify a nucleic acid molecule that hybridizes under stringent hybridization conditions with a *Dermatophagoides farinae* and/or *Dermatophagoides pteronyssius* nucleic acid molecule of about 150 bp in length, the following conditions could preferably be used. The average G + C content of *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssius* DNA is about 39%. The unknown nucleic acid molecules would be attached to a support membrane, and the 150 bp probe would be labeled, e.g. with a radioactive tag. The hybridization reaction could be carried out in a solution comprising 2X SSC and 0% formamide, at a temperature of about 37°C (low stringency conditions). Solutions of differing concentrations of SSC can be made by one of skill in the art by diluting a stock solution of 20X SSC (175.3 gram NaCl and about 88.2 gram sodium citrate in 1 liter of water, pH 7) to obtain the desired concentration of SSC. In order to achieve high stringency hybridization, the skilled artisan would calculate the washing conditions required to allow up to 30% base-pair mismatch. For example, in a wash solution comprising 1X SSC and 0% formamide, the T_m of perfect hybrids would be about 80°C:

$$81.5^{\circ}\text{C} + 16.6 \log (.15\text{M}) + (0.41 \times 39) - (500/150) - (0.61 \times 0) = 80.4^{\circ}\text{C}.$$

Thus, to achieve hybridization with nucleic acid molecules having about 30% base-pair mismatch, hybridization washes would be carried out at a temperature of about 50°C. It is thus within the skill of one in the art to calculate additional hybridization temperatures based on the desired percentage base-pair mismatch, formulae and G/C content disclosed herein. For example, it is appreciated by one skilled in the art that as the nucleic acid molecule to be tested for hybridization against nucleic acid molecules of the present invention having sequences specified herein becomes longer than 150

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-13-

nucleotides, the T_m for a hybridization reaction allowing up to 30% base-pair mismatch will not vary significantly from 50°C.

Furthermore, it is known in the art that there are commercially available computer programs for determining the degree of similarity between two nucleic acid sequences. These computer programs include various known methods to determine the percentage identity and the number and length of gaps between hybrid nucleic acid molecules. Preferred methods to determine the percent identity among amino acid sequences and also among nucleic acid sequences include analysis using one or more of the commercially available computer programs designed to compare and analyze nucleic acid or amino acid sequences. These computer programs include, but are not limited to, GCG™ (available from Genetics Computer Group, Madison, WI), DNAsis™ (available from Hitachi Software, San Bruno, CA) and MacVector™ (available from the Eastman Kodak Company, New Haven, CT). A preferred method to determine percent identity among amino acid sequences and also among nucleic acid sequences includes using the Compare function by maximum matching within the program DNAsis Version 2.1 using default parameters.

One embodiment of the present invention includes *Der* HMW-map proteins. In one embodiment, *Der* HMW-map proteins of the present invention include proteins that, when submitted to reducing 12% Tris glycine SDS-PAGE, migrate as bands at a molecular weight of from about 98 kD to about 109 kD, as shown in Fig. 1. The bands in Fig. 1 are obtained when proteins are collected from *Dermataphagooides farinae* mites using the method described in detail in Example 1. Preferably, *Der* HMW-map proteins of the present invention includes proteins having a molecular weight ranging from about 90 kD to about 120 kD, and more preferably from about 98 kD to about 109 kD. Preferred *Der* HMW-map proteins of the present invention include mapA and mapB, the identification of which is described in the Examples section.

In another embodiment, *Der* HMW-map proteins of the present invention include proteins that, when submitted to reducing 14% Tris glycine SDS-PAGE, migrate as a band at a molecular weight of about 60 kD, as shown in Fig. 2. The band in Fig. 2 is obtained when proteins are collected from *Dermataphagooides farinae* mites using the method described in detail in Example 9. Preferably, *Der* HMW-map

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-14-

proteins of the present invention includes proteins having a molecular weight of about 60 kD. Preferred *Der* HMW-map proteins of the present invention include mapD, the identification of which is described in the Examples section.

In another embodiment, a preferred *Der* HMW-map protein includes a protein
5 encoded by a nucleic acid molecule which is at least about 50 nucleotides, or about
150 nucleotides, and which hybridizes under conditions which preferably allow about
40% or less base pair mismatch, more preferably under conditions which allow about
35% or less base pair mismatch, more preferably under conditions which allow about
30% or less base pair mismatch, more preferably under conditions which allow about
10 25% or less base pair mismatch, more preferably under conditions which allow about
20% or less base pair mismatch, more preferably under conditions which allow about
15% or less base pair mismatch, more preferably under conditions which allow about
10% or less base pair mismatch and even more preferably under conditions which
allow about 5% or less base pair mismatch with a nucleic acid molecule selected from
15 the group consisting of SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22, SEQ ID
NO:36, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:45 and a nucleic acid sequence
encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33 the
complement thereof.

Another embodiment of the present invention includes a *Der* HMW-map
20 protein encoded by a nucleic acid molecule selected from the group consisting of: a
nucleic acid molecule comprising at least about 150 nucleotides, wherein said nucleic
acid molecule comprising at least about 150 nucleotides hybridizes, in a solution
comprising 1X SSC and 0% formamide, at a temperature of about 50°C, to a nucleic
acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19,
25 SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:45, and
a complement of a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino
acid sequence SEQ ID NO:33; and a nucleic acid molecule comprising a fragment of
any of said nucleic acid molecules comprising at least about 15 nucleotides.

Yet another preferred *Der* HMW-map protein of the present invention includes
30 a protein encoded by a nucleic acid molecule which is preferably at least about 60%
identical, more preferably at least about 65% identical, more preferably at least about

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-15-

70% identical, more preferably at least about 75% identical, more preferably at least about 80% identical, more preferably at least about 85% identical, more preferably at least about 90% identical and even more preferably at least about 95% identical to a nucleic acid molecule having the nucleic acid sequence SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:43, and/or a complement of a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33; also preferred are fragments of such proteins. Percent identity as used herein is determined using the Compare function by maximum matching within the program DNAsis Version 2.1 using default parameters.

10 Additional preferred *Der* HMW-map proteins of the present invention include proteins having the amino acid sequence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:44, and proteins comprising homologs of a protein having the amino acid sequence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:44 in which such a homolog comprises at least one epitope that elicits an immune response against a protein having an amino acid sequence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:44 Likewise, also preferred are

30 proteins encoded by nucleic acid molecules encoded by nucleic acid molecules having nucleic acid sequence SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:43 and/or a nucleic acid

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-16-

sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33, or by homologs thereof.

- A preferred isolated protein of the present invention is a protein encoded by at least one of the following nucleic acid molecules: nDerf98₁₇₅₂, nDerf98₁₆₆₅,
5 nDerf98₁₆₀₈, nDerp98₁₆₂₁, nDerp98₁₅₂₇, nDerp98₁₄₇₀, nDerf60₅₁₀, or allelic variants of any of these nucleic acid molecules. Another preferred isolated protein is encoded by a nucleic acid molecule having nucleic acid sequence SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:43; or a protein encoded by an allelic variant of any of these listed nucleic acid molecule.
- 10 Translation of SEQ ID NO:14, the coding strand of nDerf98₁₇₅₂, yields a protein of about 555 amino acids, denoted herein as PDerf98₅₅₅, the amino acid sequence of which is presented in SEQ ID NO:15, assuming a first in-frame codon extending from nucleotide 1 to nucleotide 3 of SEQ ID NO:14. The complementary strand of SEQ ID NO:14 is presented herein as SEQ ID NO:16. The amino acid
15 sequence of PDerf98₅₅₅ is encoded by the nucleic acid molecule nDerf98₁₆₆₅, having a coding strand denoted SEQ ID NO:17 and a complementary strand denoted SEQ ID NO:19. Analysis of SEQ ID NO:15 suggests the presence of a signal peptide spanning from about amino acid 1 through about amino acid 19. The proposed mature protein, denoted herein as PDerf98₅₃₆, contains about 536 amino acids, the sequence of which
20 is represented herein as SEQ ID NO:21, and is encoded by a nucleic acid molecule referred to herein as nDerf98₁₆₀₈, represented by SEQ ID NO:20, the coding strand, and SEQ ID NO:22, the complementary strand.
- Translation of SEQ ID NO:34, the coding strand of nDerp98₁₆₂₁, yields a protein of about 509 amino acids, denoted herein as PDerp98₅₀₉, the amino acid
25 sequence of which is presented in SEQ ID NO:35, assuming a first in-frame codon extending from nucleotide 14 to nucleotide 16 of SEQ ID NO:34. The complementary strand of SEQ ID NO:34 is presented herein as SEQ ID NO:36. The amino acid sequence of PDerp98₅₀₉ is encoded by the nucleic acid molecule nDerp98₁₅₂₇, having a coding strand denoted SEQ ID NO:37 and a complementary strand denoted SEQ ID
30 NO:39. Analysis of SEQ ID NO:35 suggests the presence of a signal peptide spanning from about amino acid 1 through about amino acid 19. The proposed mature protein, denoted herein as PDerp98₄₉₀, contains about 490 amino acids, the sequence of which

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-17-

is represented herein as SEQ ID NO:41, and is encoded by a nucleic acid molecule referred to herein as nDerp98₁₇₀, represented by SEQ ID NO:40, the coding strand, and SEQ ID NO:42, the complementary strand.

Translation of SEQ ID NO:43, the coding strand of nDerf60₁₇₀, a nucleic acid molecule encoding a portion of the *D. farinae* 60-kD antigen protein yields a protein of about 170 amino acids, denoted herein as PDerf60₁₇₀, the amino acid sequence of which is presented as SEQ ID NO:44, assuming a first in-frame codon extending from nucleotide 1 to nucleotide 3 of SEQ ID NO:43. The complementary sequence to SEQ ID NO:43 is presented herein as SEQ ID NO:45.

10 Preferred *Der* HMW-map proteins of the present invention include proteins that are at least about 45%, preferably at least about 50%, more preferably at least about 55%, even more preferably at least about 60%, even more preferably at least about 65%, even more preferably at least about 70%, even more preferably at least about 75%, even more preferably at least about 80%, even more preferably at least about 85%, even more preferably at least about 90%, and even more preferably about 95% identical to PDerf98₅₅₅. More preferred is a *Der* HMW-map protein comprising PDerf98₅₅₅, PDerf98₅₃₆, PDerp98₅₀₉, PDerp98₄₉₀, and/or PDerf60₁₇₀; and proteins encoded by allelic variants of nucleic acid molecules encoding proteins PDerf98₅₅₅, PDerf98₂₃₆, PDerp98₅₀₉, PDerp98₄₉₀, and/or PDerf60₁₇₀.

20 Other preferred *Der* HMW-map proteins of the present invention include proteins having amino acid sequences that are at least about 45%, preferably at least about 50%, more preferably at least about 55%, even more preferably at least about 60%, even more preferably at least about 65%, even more preferably at least about 70%, even more preferably at least about 75%, even more preferably at least about 80%, even more preferably at least about 85%, even more preferably at least about 90%, and even more preferably about 95% identical to amino acid sequence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, and/or SEQ

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-18-

ID NO:44. More preferred are *Der* HMW-map proteins comprising amino acid sequences SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, and/or SEQ ID NO:44; and *Der* HMW-map proteins encoded by allelic variants of nucleic acid molecules encoding *Der* HMW-map proteins having amino acid sequences SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, and/or SEQ ID NO:44.

15 In one embodiment of the present invention, *Der* HMW-map proteins comprise amino acid sequence SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:35, and/or SEQ ID NO:44 (including, but not limited to, the proteins consisting of amino acid sequence SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:35, and/or SEQ ID NO:44, fragments thereof, fusion proteins and multivalent proteins), and proteins encoded by allelic variants of nucleic acid
20 molecules encoding proteins having amino acid sequence SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:35, and/or SEQ ID NO:44.

In one embodiment, a preferred *Der* HMW-map protein comprises an amino acid sequence of at least about 35 amino acids in length, preferably at least about 50 amino acids in length, more preferably at least about 100 amino acids in length, more preferably at least about 200 amino acids in length, even more preferably at least about 250 amino acids in length. Within this embodiment, a preferred *Der* HMW-map protein of the present invention has an amino acid sequence comprising at least a portion of SEQ ID NO:15. In another embodiment, a preferred *Der* HMW-map protein comprises a full-length protein, i.e., a protein encoded by a full-length coding
30 region.

-19-

Additional preferred *Der* HMW-map proteins of the present invention include proteins encoded by nucleic acid molecules comprising at least a portion of nDerf98₁₇₅₂, nDerf98₁₆₆₅, nDerf98₁₆₀₈, nDerp98₁₆₂₁, nDerp98₁₅₂₇, nDerp98₁₄₇₀, and nDerf60₅₁₀, as well as *Der* HMW-map proteins encoded by allelic variants of such

5 nucleic acid molecules.

Also preferred are *Der* HMW-map proteins encoded by nucleic acid molecules having nucleic acid sequences comprising at least a portion of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:40 SEQ ID NO:43 and/or a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid

10 sequence SEQ ID NO:33, as well as allelic variants of these nucleic acid molecules.

In another embodiment, a preferred *Der* HMW-map protein of the present invention is encoded by a nucleic acid molecule comprising at least about 12 nucleotides, preferably at least about 16 nucleotides, more preferably at least about 18 nucleotides, more preferably at least about 20 nucleotides, more preferably at least

15 about 25 nucleotides, more preferably at least about 50 nucleotides, more preferably at least about 100 nucleotides, more preferably at least about 350 nucleotides, more preferably at least about 450 nucleotides, more preferably at least about 500 nucleotides, and even more preferably at least about 800 nucleotides. Within this embodiment is a *Der* HMW-map protein encoded by at least a portion nDerf98₁₇₅₂,

20 nDerp98₁₆₂₁, and/or nDerf60₅₁₀ or by an allelic variant of these nucleic acid molecules. In yet another embodiment, a preferred *Der* HMW-map protein of the present invention is encoded by a nucleic acid molecule comprising an apparently full-length *Der* HMW-map coding region, i.e., a nucleic acid molecule encoding an apparently full-length *Der* HMW-map protein.

25 One embodiment of a *Der* HMW-map protein of the present invention is a fusion protein that includes a *Der* HMW-map protein-containing domain attached to one or more fusion segments. Suitable fusion segments for use with the present invention include, but are not limited to, segments that can: enhance a protein's stability; act as an immunopotentiator to enhance an immune response against a *Der*

30 HMW-map protein, reduce an IgE response against a *Der* HMW-map protein; and/or assist purification of a *Der* HMW-map protein (e.g., by affinity chromatography). A

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-20-

- suitable fusion segment can be a domain of any size that has the desired function (e.g., imparts increased stability, imparts increased immunogenicity to a protein, reduces an IgE response, and/or simplifies purification of a protein). Fusion segments can be joined to amino and/or carboxyl termini of the *Der* HMW-map protein-containing domain of the protein and can be susceptible to cleavage in order to enable straightforward recovery of a *Der* HMW-map protein. Fusion proteins are preferably produced by culturing a recombinant cell transformed with a fusion nucleic acid molecule that encodes a protein including the fusion segment attached to either the carboxyl and/or amino terminal end of a *Der* HMW-map protein-containing domain.
- 10 Preferred fusion segments include a metal binding domain (e.g., a poly-histidine segment); an immunoglobulin binding domain (e.g., Protein A; Protein G; T cell; B cell; Fc receptor or complement protein antibody-binding domains); a sugar binding domain (e.g., a maltose binding domain); a "tag" domain (e.g., at least a portion of galactosidase, a strep tag peptide, other domains that can be purified using compounds that bind to the domain, such as monoclonal antibodies); and/or a linker and enzyme domain (e.g., alkaline phosphatase domain connected to a *Der* HMW-map protein by a linker). More preferred fusion segments include metal binding domains, such as a poly-histidine segment; a maltose binding domain; a strep tag peptide, such as that available from Biometra in Tampa, FL; and a phage T7 S10 peptide.
- 20 In another embodiment, a *Der* HMW-map protein of the present invention also includes at least one additional protein segment that is capable of desensitizing an animal from one or more allergens. Such a multivalent desensitizing protein can be produced by culturing a cell transformed with a nucleic acid molecule comprising two or more nucleic acid domains joined together in such a manner that the resulting
- 25 nucleic acid molecule is expressed as a multivalent desensitizing compound containing at least two desensitizing compounds capable of desensitizing an animal from allergens.
- Examples of multivalent desensitizing compounds include, but are not limited to, a *Der* HMW-map protein of the present invention attached to one or more
- 30 compounds that desensitize against allergies caused by one or more allergens, such as a plant allergen, an animal allergen, a parasite allergen or an ectoparasite allergen,

-21-

including, but not limited to: plant allergens from grass, Meadow Fescue, Curly Dock, plantain, Mexican Firebush, Lamb's Quarters, pigweed, ragweed, sage, elm, cocklebur, Box Elder, walnut, cottonwood, ash, birch, cedar, oak, mulberry, cockroach, *Dermatophagoides*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*,
5 *Helminthosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pullularia*, *Rhizopus* and/or *Tricophyton*;
parasite allergens from helminths; or ectoparasite allergens from arachnids, insects and leeches, including fleas, ticks, flies, mosquitos, sand flies, black flies, horse flies, horn flies, deer flies, tsetse flies, stable flies, myiasis-causing flies and biting gnats, ants, spiders, lice; mites and true bugs.

10 The present invention also includes mimetopes of a *Der* HMW-map protein of the present invention. As used herein, a mimetope of a *Der* HMW-map protein of the present invention refers to any compound that is able to mimic the activity of such a *Der* HMW-map protein (e.g., ability to bind to induce an immune response against *Der* HMW-map protein), often because the mimetope has a structure that mimics the
15 *Der* HMW-map protein. It is to be noted, however, that the mimetope need not have a structure similar to a *Der* HMW-map protein as long as the mimetope functionally mimics the protein. Mimetopes can be, but are not limited to: peptides that have been modified to decrease their susceptibility to degradation; anti-idiotypic and/or catalytic antibodies, or fragments thereof; non-proteinaceous immunogenic portions of an
20 isolated protein (e.g., carbohydrate structures); synthetic or natural organic or inorganic molecules, including nucleic acids; and/or any other peptidomimetic compounds. Mimetopes of the present invention can be designed using computer-generated structures of *Der* HMW-map protein of the present invention. Mimetopes can also be obtained by generating random samples of molecules, such as
25 oligonucleotides, peptides or other organic molecules, and screening such samples by affinity chromatography techniques using the corresponding binding partner, (e.g., an anti-*Der* HMW-map protein antibody). A mimetope can also be obtained by, for example, rational drug design. In a rational drug design procedure, the three-dimensional structure of a compound of the present invention can be analyzed by, for
30 example, nuclear magnetic resonance (NMR) or x-ray crystallography. The three-dimensional structure can then be used to predict structures of potential mimetopes by,

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-22-

for example, computer modeling. The predicted mimotope structures can then be produced by, for example, chemical synthesis, recombinant DNA technology, or by isolating a mimotope from a natural source. Specific examples of *Der* HMW-map protein mimetopes include anti-idiotypic antibodies, oligonucleotides produced using 5 Selex™ technology, peptides identified by random screening of peptide libraries and proteins identified by phage display technology. A preferred mimotope is a peptidomimetic compound that is structurally and/or functionally similar to a *Der* HMW-map protein of the present invention, particularly to an epitope of *Der* HMW-map protein that induces an immune response.

10 The present invention also includes muteins of a *Der* HMW-map protein of the present invention. As used herein, a mutein refers to a particular homolog of a *Der* HMW-map protein in which desired amino acid residues have been substituted or removed. Preferred muteins of the present invention include *Der* HMW-map protein homologs in which amino acid residues have been changed to reduce an anaphylactic 15 reaction by an animal when the mutein is administered to the animal in therapeutic doses. More preferred muteins of the present invention include *Der* HMW-map protein homologs in which one or more cysteine residues of a *Der* HMW-map protein have been replaced or removed. Methods to produce muteins are known to those of skill in the art and are disclosed herein. Preferably, a mutein is produced using 20 recombinant techniques.

Another embodiment of the present invention is an isolated nucleic acid molecule comprising a *Der* HMW-map nucleic acid molecule. The identifying characteristics of such nucleic acid molecules are heretofore described. A nucleic acid molecule of the present invention can include an isolated natural *Der* HMW-map gene 25 or a homolog thereof, the latter of which is described in more detail below. A nucleic acid molecule of the present invention can include one or more regulatory regions, full-length or partial coding regions, or combinations thereof. The minimal size of a nucleic acid molecule of the present invention is a size sufficient to allow the formation of a stable hybrid (i.e., hybridization under stringent hybridization 30 conditions) with the complementary sequence of another nucleic acid molecule.

In accordance with the present invention, an isolated nucleic acid molecule is a nucleic acid molecule that has been removed from its natural milieu (i.e., that has been subjected to human manipulation) and can include DNA, RNA, or derivatives of either DNA or RNA. As such, "isolated" does not reflect the extent to which the nucleic acid molecule has been purified. An isolated *Der* HMW-map nucleic acid molecule of the present invention, or a homolog thereof, can be isolated from its natural source or produced using recombinant DNA technology (e.g., polymerase chain reaction (PCR) amplification or cloning) or chemical synthesis. Isolated *Der* HMW-map nucleic acid molecules, and homologs thereof, can include, for example, natural allelic variants and nucleic acid molecules modified by nucleotide insertions, deletions, substitutions, and/or inversions in a manner such that the modifications do not substantially interfere with the nucleic acid molecule's ability to encode a *Der* HMW-map protein of the present invention.

A *Der* HMW-map nucleic acid molecule homolog can be produced using a number of methods known to those skilled in the art, see, for example, Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press; Sambrook et al., *ibid*. For example, nucleic acid molecules can be modified using a variety of techniques including, but not limited to, classic mutagenesis and recombinant DNA techniques such as site-directed mutagenesis, chemical treatment, restriction enzyme cleavage, ligation of nucleic acid fragments, PCR amplification, synthesis of oligonucleotide mixtures and ligation of mixture groups to "build" a mixture of nucleic acid molecules, and combinations thereof. Nucleic acid molecule homologs can be selected by hybridization with a *Der* HMW-map nucleic acid molecule or by screening the function of a protein encoded by the nucleic acid molecule (e.g., ability to elicit an immune response against at least one epitope of a *Der* HMW-map protein or to effect *Der* HMW-map activity).

Allelic variants typically encode proteins having similar activity to that of the protein encoded by the gene to which they are being compared. Allelic variants can also comprise alterations in the 5' or 3' untranslated regions of the gene (e.g., in regulatory control regions). Allelic variants are well known to those skilled in the art and would be expected to be found within a given dust mite since the genome is

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-24-

diploid and/or among a group of two or more dust mites. The present invention also includes variants due to laboratory manipulation, such as, but not limited to, variants produced during polymerase chain reaction amplification.

An isolated nucleic acid molecule of the present invention can include a
5 nucleic acid sequence that encodes at least one *Der* HMW-map protein of the present invention, examples of such proteins being disclosed herein. Although the phrase "nucleic acid molecule" primarily refers to the physical nucleic acid molecule and the phrase "nucleic acid sequence" primarily refers to the sequence of nucleotides on the nucleic acid molecule, the two phrases can be used interchangeably, especially with
10 respect to a nucleic acid molecule, or a nucleic acid sequence, being capable of encoding a *Der* HMW-map protein.

A preferred nucleic acid molecule of the present invention, when administered to an animal, is capable of desensitizing that animal from allergic reactions caused by a *Der* HMW-map allergen. As will be disclosed in more detail below, such a nucleic
15 acid molecule can be, or encode, an antisense RNA, a molecule capable of triple helix formation, a ribozyme, or other nucleic acid-based drug compound. In additional embodiments, a nucleic acid molecule of the present invention can encode a desensitizing protein (e.g., a *Der* HMW-map protein of the present invention), the nucleic acid molecule being delivered to the animal, for example, by direct injection
20 (i.e., as a DNA reagent) or in a vehicle such as a recombinant virus reagent or a recombinant cell reagent.

One embodiment of the present invention is an isolated nucleic acid molecule that hybridizes under stringent hybridization conditions with a *Der* HMW-map gene. Stringent hybridization conditions refer to standard hybridization conditions described
25 herein. A preferred nucleic acid molecule of the present invention includes an isolated nucleic acid molecule that hybridizes under stringent hybridization conditions with a gene encoding a protein comprising an amino acid sequence including SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12,
30 SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32,

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-25-

SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, and/or SEQ ID NO:44. A more preferred nucleic acid molecule of the present invention includes an isolated nucleic acid molecule that hybridizes under stringent hybridization conditions with the complement of a nucleic acid sequence that encodes a protein comprising an amino acid sequence including SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, and/or SEQ ID NO:44.

A more preferred nucleic acid molecule of the present invention includes an isolated nucleic acid molecule selected from the group consisting of: a nucleic acid molecule comprising at least about 150 nucleotides, wherein said nucleic acid molecule comprising at least about 150 nucleotides hybridizes, in a solution comprising 1X SSC and 0% formamide, at a temperature of about 50°C, to a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45 and/or a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33 and a complement thereof.

The present invention also includes fragments of any nucleic acid molecule disclosed herein. According to the present invention, a fragment can include any nucleic acid molecule or nucleic acid sequence, the size of which can range between a length that is smaller than a sequence identified by a SEQ ID NO of the present invention and the minimum size of an oligonucleotide as defined herein. For example, the size of a fragment of the present invention can be any size that is less than about 1752 nucleotides and greater than 11 nucleotides in length.

In one embodiment of the present invention, a preferred *Der* HMW-map nucleic acid molecule includes an isolated nucleic acid molecule which is at least about 50 nucleotides, or at least about 150 nucleotides, and which hybridizes under conditions which preferably allow about 40% or less base pair mismatch, more preferably under conditions which allow about 35% or less base pair mismatch, more

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-26-

preferably under conditions which allow about 30% or less base pair mismatch, more preferably under conditions which allow about 25% or less base pair mismatch, more preferably under conditions which allow about 20% or less base pair mismatch, more preferably under conditions which allow about 15% or less base pair mismatch, more preferably under conditions which allow about 10% or less base pair mismatch and even more preferably under conditions which allow about 5% or less base pair mismatch with a nucleic acid molecule selected from the group consisting of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, and a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33 and a complement thereof.

Another embodiment of the present invention includes a nucleic acid molecule comprising at least about 150 base-pairs, wherein the nucleic acid molecule hybridizes, in a solution comprising 1X SSC and 0% formamide, at a temperature of about 50°C, to a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, and/or a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33 and a complement thereof. Additional preferred nucleic acid molecules of the present invention include fragments of an isolated nucleic acid molecule comprising at least about 150 base-pairs, wherein said nucleic acid molecule hybridizes, in a solution comprising 1X SSC and 0% formamide, at a temperature of about 50°C, to a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45 and a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33 and complement thereof.

Additional preferred *Der* HMW-map nucleic acid molecules of the present invention include an isolated nucleic acid molecule which is at least about 50 nucleotides, or at least about 150 nucleotides, comprising a nucleic acid sequence that

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-27-

is preferably at least about 60% identical, more preferably at least about 65% identical, more preferably at least about 70% identical, more preferably at least about 75% identical, more preferably at least about 80% identical, more preferably at least about 85% identical, more preferably at least about 90% identical and even more preferably at least about 95% identical to a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, and a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33 and a complement thereof. Also preferred are fragments of any of such nucleic acid molecules. Percent identity may be determined using the Compare function by maximum matching within the program DNAsis Version 2.1 using default parameters.

One embodiment of the present invention is a nucleic acid molecule comprising all or part of nucleic acid molecules nDerf98₁₇₅₂, nDerf98₁₆₆₅ and nDerf98₁₆₈₆, nDerp98₁₆₂₁, nDerp98₁₅₂₇, nDerp98₁₄₇₀, and/or nDerf60₅₁₀, or allelic variants of these nucleic acid molecules. Another preferred nucleic acid molecule of the present invention includes at least a portion of nucleic acid sequence SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45 and/or a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33, as well as allelic variants of nucleic acid molecules having these nucleic acid sequences and homologs of nucleic acid molecules having these nucleic acid sequences; preferably such a homolog encodes or is complementary to a nucleic acid molecule that encodes at least one epitope that elicits an immune response against a protein having an amino acid sequence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:41, and/or SEQ ID NO:44. Such nucleic acid molecules can include nucleotides in addition to those included in the SEQ ID

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-28-

NOs, such as, but not limited to, a full-length gene, a full-length coding region, a nucleic acid molecule encoding a fusion protein, or a nucleic acid molecule encoding a multivalent protective compound.

In one embodiment, a *Der* HMW-map nucleic acid molecule of the present invention encodes a protein that is at least about 45%, preferably at least about 50%, more preferably at least about 55%, even more preferably at least about 60%, even more preferably at least about 65%, even more preferably at least about 70%, even more preferably at least about 75%, even more preferably at least about 80%, even more preferably at least about 85%, even more preferably at least about 90%, and even more preferably about 95% identical to PDerf98₅₃₅, PDerp98₅₀₉, and/or PDerf60₁₇₀. Even more preferred is a nucleic acid molecule encoding PDerf98₅₅₅, PDerf98₅₃₆, PDerp98₅₀₉, PDerp98₄₉₀, and/or PDerf60₁₇₀, and/or an allelic variant of such nucleic acid molecules.

In another embodiment, a *Der* HMW-map nucleic acid molecule of the present invention encodes a protein having an amino acid sequence that is at least about 45%, preferably at least about 50%, more preferably at least about 55%, even more preferably at least about 60%, even more preferably at least about 65%, even more preferably at least about 70%, even more preferably at least about 75%, even more preferably at least about 80%, even more preferably at least about 85%, even more preferably at least about 90%, and even more preferably about 95% identical to SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:41, and/or SEQ ID NO:44. The present invention also includes a *Der* HMW-map nucleic acid molecule encoding a protein having at least a portion of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32,

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-29-

SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:41,
and/or SEQ ID NO:44, as well as allelic variants of a *Der* HMW-map nucleic acid
molecule encoding a protein having these sequences, including nucleic acid molecules
that have been modified to accommodate codon usage properties of the cells in which
5 such nucleic acid molecules are to be expressed.

In another embodiment, a preferred *Der* HMW-map nucleic acid molecule
encodes a *Der* HMW-map protein comprising at least about at least about 35 amino
acids in length, preferably at least about 50 amino acids in length, more preferably at
least about 100 amino acids in length, more preferably at least about 200 amino acids
10 in length, even more preferably at least about 250 amino acids in length.

Knowing the nucleic acid sequences of certain *Der* HMW-map nucleic acid
molecules of the present invention allows one skilled in the art to, for example, (a)
make copies of those nucleic acid molecules, (b) obtain nucleic acid molecules
including at least a portion of such nucleic acid molecules (e.g., nucleic acid molecules
15 including full-length genes, full-length coding regions, regulatory control sequences,
truncated coding regions), and (c) obtain other *Der* HMW-map nucleic acid molecules.
Such nucleic acid molecules can be obtained in a variety of ways including screening
appropriate expression libraries with antibodies of the present invention; traditional
cloning techniques using oligonucleotide probes of the present invention to screen
20 appropriate libraries; and PCR amplification of appropriate libraries or DNA using
oligonucleotide primers of the present invention. A preferred library to screen or from
which to amplify nucleic acid molecules includes a *Dermatophagoides farinae* and/or
Dermatophagoides pteronyssius library, such as the libraries disclosed herein in the
Examples. Techniques to clone and amplify genes are disclosed, for example, in
25 Sambrook et al., *ibid*.

The present invention also includes nucleic acid molecules that are
oligonucleotides capable of hybridizing, under stringent hybridization conditions, with
complementary regions of other, preferably longer, nucleic acid molecules of the
present invention such as those comprising *Der* HMW-map nucleic acid molecules or
30 other *Der* HMW-map nucleic acid molecules. Oligonucleotides of the present
invention can be RNA, DNA, or derivatives of either. The minimum size of such

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-30-

oligonucleotides is the size required for formation of a stable hybrid between an oligonucleotide and a complementary sequence on a nucleic acid molecule of the present invention. A preferred oligonucleotide of the present invention has a maximum size of preferably about 200 nucleotides, more preferably about 150 nucleotides and
5 even more preferably about 100 nucleotides. The present invention includes oligonucleotides that can be used as, for example, probes to identify nucleic acid molecules.

One embodiment of the present invention includes a recombinant vector, which includes at least one isolated nucleic acid molecule of the present invention, inserted
10 into any vector capable of delivering the nucleic acid molecule into a host cell. Such a vector contains heterologous nucleic acid sequences, that is nucleic acid sequences that are not naturally found adjacent to nucleic acid molecules of the present invention and that preferably are derived from a species other than the species from which the nucleic acid molecule(s) are derived. The vector can be either RNA or DNA, either
15 prokaryotic or eukaryotic, and typically is a virus or a plasmid. Recombinant vectors can be used in the cloning, sequencing, and/or otherwise manipulation of *Der* HMW- map nucleic acid molecules of the present invention.

One type of recombinant vector, referred to herein as a recombinant molecule, comprises a nucleic acid molecule of the present invention operatively linked to an
20 expression vector. The phrase operatively linked refers to insertion of a nucleic acid molecule into an expression vector in a manner such that the molecule is able to be expressed when transformed into a host cell. As used herein, an expression vector is a DNA or RNA vector that is capable of transforming a host cell and of effecting expression of a specified nucleic acid molecule. Preferably, the expression vector is
25 also capable of replicating within the host cell. Expression vectors can be either prokaryotic or eukaryotic, and are typically viruses or plasmids. Expression vectors of the present invention include any vectors that function (i.e., direct gene expression) in recombinant cells of the present invention, including in bacterial, fungal, endoparasite, insect, other animal, and plant cells. Preferred expression vectors of the present
30 invention can direct gene expression in bacterial, yeast, insect and mammalian cells and more preferably in the cell types disclosed herein.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-31-

In particular, expression vectors of the present invention contain regulatory sequences such as transcription control sequences, translation control sequences, origins of replication, and other regulatory sequences that are compatible with the recombinant cell and that control the expression of nucleic acid molecules of the present invention. In particular, recombinant molecules of the present invention include transcription control sequences. Transcription control sequences are sequences which control the initiation, elongation, and termination of transcription. Particularly important transcription control sequences are those which control transcription initiation, such as promoter, enhancer, operator and repressor sequences.

5 Suitable transcription control sequences include any transcription control sequence that can function in at least one of the recombinant cells of the present invention. A variety of such transcription control sequences are known to those skilled in the art. Preferred transcription control sequences include those which function in bacterial, yeast, insect and mammalian cells, such as, but not limited to, *tac*, *lac*, *trp*, *trc*, *oxy-pro*, *omp/lpp*, *rrnB*, bacteriophage lambda (such as lambda p_L and lambda p_R and fusions that include such promoters), bacteriophage T7, *T7lac*, bacteriophage T3, bacteriophage SP6, bacteriophage SP01, metallothionein, alpha-mating factor, *Pichia* alcohol oxidase, alphavirus subgenomic promoters (such as Sindbis virus subgenomic promoters), antibiotic resistance gene, baculovirus, *Heliothis zea* insect virus, vaccinia

10 virus, herpesvirus, raccoon poxvirus, other poxvirus, adenovirus, cytomegalovirus (such as intermediate early promoters), simian virus 40, retrovirus, actin, retroviral long terminal repeat, Rous sarcoma virus, heat shock, phosphate and nitrate transcription control sequences as well as other sequences capable of controlling gene expression in prokaryotic or eukaryotic cells. Additional suitable transcription control

15 sequences include tissue-specific promoters and enhancers as well as lymphokine-inducible promoters (e.g., promoters inducible by interferons or interleukins). Transcription control sequences of the present invention can also include naturally occurring transcription control sequences naturally associated with canines or felines.

Suitable and preferred nucleic acid molecules to include in recombinant vectors

20 of the present invention are as disclosed herein. Preferred nucleic acid molecules to include in recombinant vectors, and particularly in recombinant molecules, include

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-32-

nDerf98₁₇₃₂, nDerf98₁₆₆₅, nDerf98₁₆₀₈, nDerp98₁₆₂₁, nDerp98₁₅₂₇, nDerp98₁₄₇₀, and
nDerf60₅₁₀.

Recombinant molecules of the present invention may also (a) contain secretory signals (i.e., signal segment nucleic acid sequences) to enable an expressed *Der* HMW-map protein of the present invention to be secreted from the cell that produces the protein and/or (b) contain fusion sequences which lead to the expression of nucleic acid molecules of the present invention as fusion proteins. Examples of suitable signal segments include any signal segment capable of directing the secretion of a protein of the present invention. Preferred signal segments include, but are not limited to, tissue plasminogen activator (t-PA), interferon, interleukin, growth hormone, histocompatibility and viral envelope glycoprotein signal segments, as well as natural signal segments. Suitable fusion segments encoded by fusion segment nucleic acids are disclosed herein. In addition, a nucleic acid molecule of the present invention can be joined to a fusion segment that directs the encoded protein to the proteasome, such as a ubiquitin fusion segment. Recombinant molecules may also include intervening and/or untranslated sequences surrounding and/or within the nucleic acid sequences of nucleic acid molecules of the present invention.

Another embodiment of the present invention includes a recombinant cell comprising a host cell transformed with one or more recombinant molecules of the present invention. Transformation of a nucleic acid molecule into a cell can be accomplished by any method by which a nucleic acid molecule can be inserted into the cell. Transformation techniques include, but are not limited to, transfection, electroporation, microinjection, lipofection, adsorption, and protoplast fusion. A recombinant cell may remain unicellular or may grow into a tissue, organ or a multicellular organism. Transformed nucleic acid molecules of the present invention can remain extrachromosomal or can integrate into one or more sites within a chromosome of the transformed (i.e., recombinant) cell in such a manner that their ability to be expressed is retained. Preferred nucleic acid molecules with which to transform a cell include *Der* HMW-map nucleic acid molecules disclosed herein. Particularly preferred nucleic acid molecules with which to transform a cell include

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-33-

nDerf98₁₇₅₂, nDerf98₁₆₆₅, nDerf98₁₆₀₈, nDerp98₁₆₂₁, nDerp98₁₅₂₇, nDerp98₁₄₇₀, and nDerf60₂₁₀.

Suitable host cells to transform include any cell that can be transformed with a nucleic acid molecule of the present invention. Host cells can be either untransformed cells or cells that are already transformed with at least one nucleic acid molecule (e.g., nucleic acid molecules encoding one or more proteins of the present invention and/or other proteins useful in the production of multivalent vaccines). Host cells of the present invention either can be endogenously (i.e., naturally) capable of producing *Der* HMW-map proteins of the present invention or can be capable of producing such proteins after being transformed with at least one nucleic acid molecule of the present invention. Host cells of the present invention can be any cell capable of producing at least one protein of the present invention, and include bacterial, fungal (including yeast), other insect, other animal and plant cells. Preferred host cells include bacterial, mycobacterial, yeast, parasite, insect and mammalian cells. More preferred host cells include *Salmonella*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Listeria*, *Saccharomyces*, *Spodoptera*, *Mycobacteria*, *Trichoplusia*, BHK (baby hamster kidney) cells, MDCK cells (normal dog kidney cell line for canine herpesvirus cultivation), CRFK cells (normal cat kidney cell line for feline herpesvirus cultivation), CV-1 cells (African monkey kidney cell line used, for example, to culture raccoon poxvirus), COS (e.g., COS-7) cells, and Vero cells. Particularly preferred host cells are *Escherichia coli*, including *E. coli* K-12 derivatives; *Salmonella typhi*; *Salmonella typhimurium*, including attenuated strains such as UK-1 χ 3987 and SR-11 χ 4072; *Spodoptera frugiperda*; *Trichoplusia ni*; BHK cells; MDCK cells; CRFK cells; CV-1 cells; COS cells; Vero cells; and non-tumorigenic mouse myoblast G8 cells (e.g., ATCC CRL 1246). Additional appropriate mammalian cell hosts include other kidney cell lines, other fibroblast cell lines (e.g., human, murine or chicken embryo fibroblast cell lines), myeloma cell lines, Chinese hamster ovary cells, mouse NIH/3T3 cells, LMTK³¹ cells and/or HeLa cells.

A recombinant cell is preferably produced by transforming a host cell with one or more recombinant molecules, each comprising one or more nucleic acid molecules of the present invention operatively linked to an expression vector containing one or more transcription control sequences. The phrase operatively linked refers to insertion

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-34-

of a nucleic acid molecule into an expression vector in a manner such that the molecule is able to be expressed when transformed into a host cell.

A recombinant molecule of the present invention is a molecule that can include at least one of any nucleic acid molecule heretofore described operatively linked to at least one of any transcription control sequence capable of effectively regulating expression of the nucleic acid molecule(s) in the cell to be transformed, examples of which are disclosed herein.

A recombinant cell of the present invention includes any cell transformed with at least one of any *Der* HMW-map nucleic acid molecule of the present invention. Suitable and preferred *Der* HMW-map nucleic acid molecules as well as suitable and preferred recombinant molecules with which to transform cells are disclosed herein.

Recombinant DNA technologies can be used to improve expression of transformed nucleic acid molecules by manipulating, for example, the number of copies of the nucleic acid molecules within a host cell, the efficiency with which those nucleic acid molecules are transcribed, the efficiency with which the resultant transcripts are translated, and the efficiency of post-translational modifications. Recombinant techniques useful for increasing the expression of nucleic acid molecules of the present invention include, but are not limited to, operatively linking nucleic acid molecules to high-copy number plasmids, integration of the nucleic acid molecules into one or more host cell chromosomes, addition of vector stability sequences to plasmids, substitutions or modifications of transcription control signals (e.g., promoters, operators, enhancers), substitutions or modifications of translational control signals (e.g., ribosome binding sites, Shine-Dalgarno sequences), modification of nucleic acid molecules of the present invention to correspond to the codon usage of the host cell, deletion of sequences that destabilize transcripts, and use of control signals that temporally separate recombinant cell growth from recombinant enzyme production during fermentation. The activity of an expressed recombinant protein of the present invention may be improved by fragmenting, modifying, or derivatizing nucleic acid molecules encoding such a protein.

Isolated *Der* HMW-map proteins of the present invention can be produced in a variety of ways, including production and recovery of natural proteins, production and

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-35-

recovery of recombinant proteins, and chemical synthesis of the proteins. In one embodiment, an isolated protein of the present invention is produced by culturing a cell capable of expressing the protein under conditions effective to produce the protein, and recovering the protein. A preferred cell to culture is a recombinant cell of the present invention. Effective culture conditions include, but are not limited to, effective media, bioreactor, temperature, pH and oxygen conditions that permit protein production. An effective medium refers to any medium in which a cell is cultured to produce a *Der* HMW-map protein of the present invention. Such a medium typically comprises an aqueous medium having assimilable carbon, nitrogen and phosphate sources, and appropriate salts, minerals, metals and other nutrients, such as vitamins. Cells of the present invention can be cultured in conventional fermentation bioreactors, shake flasks, test tubes, microtiter dishes, and petri plates. Culturing can be carried out at a temperature, pH and oxygen content appropriate for a recombinant cell. Such culturing conditions are within the expertise of one of ordinary skill in the art.

Depending on the vector and host system used for production, resultant proteins of the present invention may either remain within the recombinant cell; be secreted into the fermentation medium; be secreted into a space between two cellular membranes, such as the periplasmic space in *E. coli*; or be retained on the outer surface of a cell or viral membrane. The phrase "recovering the protein", as well as similar phrases, refers to collecting the whole fermentation medium containing the protein and need not imply additional steps of separation or purification. Proteins of the present invention can be purified using a variety of standard protein purification techniques, such as, but not limited to, affinity chromatography, ion exchange chromatography, filtration, electrophoresis, hydrophobic interaction chromatography, gel filtration chromatography, reverse phase chromatography, concanavalin A chromatography, chromatofocusing and differential solubilization. Proteins of the present invention are preferably retrieved in "substantially pure" form. As used herein, "substantially pure" refers to a purity that allows for the effective use of the protein as a therapeutic composition or diagnostic. A therapeutic composition for animals, for example, should exhibit no substantial toxicity and preferably should be capable of desensitizing a treated animal.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-36-

The present invention also includes isolated (i.e., removed from their natural milieu) antibodies that selectively bind to a *Der* HMW-map protein of the present invention or a mimotope thereof (i.e., anti-*Der* HMW-map protein antibodies). As used herein, the term "selectively binds to" a *Der* HMW-map protein refers to the ability of antibodies of the present invention to preferentially bind to specified proteins and mimetopes thereof of the present invention. Binding can be measured using a variety of methods standard in the art including enzyme immunoassays (e.g., ELISA), immunoblot assays, etc.; see, for example, Sambrook et al., *ibid.* An anti-*Der* HMW-map protein antibody preferably selectively binds to a portion of a *Der* HMW-map protein that induces an immune response in an animal.

Isolated antibodies of the present invention can include antibodies in a bodily fluid (such as, but not limited to, serum), or antibodies that have been purified to varying degrees. Antibodies of the present invention can be polyclonal or monoclonal. Functional equivalents of such antibodies, such as antibody fragments and genetically-engineered antibodies (including single chain antibodies or chimeric antibodies that can bind to more than one epitope) are also included in the present invention.

A preferred method to produce antibodies of the present invention includes (a) administering to an animal an effective amount of a protein, peptide or mimotope thereof of the present invention to produce the antibodies and (b) recovering the antibodies. In another method, antibodies of the present invention are produced recombinantly using techniques as heretofore disclosed to produce *Der* HMW-map proteins of the present invention. Antibodies raised against defined proteins or mimetopes can be advantageous because such antibodies are not substantially contaminated with antibodies against other substances that might otherwise cause interference in a diagnostic assay or side effects if used in a therapeutic composition.

Antibodies of the present invention have a variety of potential uses that are within the scope of the present invention. For example, such antibodies can be used (a) as tools to detect mite allergen, in particular *Der* HMW-map protein; (b) as tools to screen expression libraries; and/or (c) to recover desired proteins of the present invention from a mixture of proteins and other contaminants. Antibodies of the present invention can also be used, for example, to inhibit binding of *Der* HMW-map

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-37-

protein to IgE that binds specifically to *Der* HMW-map protein, to prevent immunocomplex formation, thereby reducing hypersensitivity responses to mite allergens.

A *Der* HMW-map protein of the present invention can be included in a chimeric molecule comprising at least a portion of a *Der* HMW-map protein that induces an immune response in an animal and a second molecule that enables the chimeric molecule to be bound to a substrate in such a manner that the *Der* HMW-map protein portion can bind to IgE in essentially the same manner as a *Der* HMW-map protein that is not bound to a substrate. An example of a suitable second molecule includes a portion of an immunoglobulin molecule or another ligand that has a suitable binding partner that can be immobilized on a substrate, e.g., biotin and avidin, or a metal-binding protein and a metal (e.g., His), or a sugar-binding protein and a sugar (e.g., maltose).

A *Der* HMW-map protein of the present invention can be contained in a formulation, herein referred to as a *Der* HMW-map protein formulation. For example, a *Der* HMW-map protein can be combined with a buffer in which the *Der* HMW-map protein is solubilized, and/or with a carrier. Suitable buffers and carriers are known to those skilled in the art. Examples of suitable buffers include any buffer in which a *Der* HMW-map protein can function to selectively bind to an antibody that specifically binds to *Der* HMW-map protein, such as, but not limited to, phosphate buffered saline, water, saline, phosphate buffer, bicarbonate buffer, HEPES buffer (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid buffered saline), TES buffer (Tris-EDTA buffered saline), Tris buffer and TAE buffer (Tris-acetate-EDTA). Examples of carriers include, but are not limited to, polymeric matrices, toxoids, and serum albumins, such as bovine serum albumin. Carriers can be mixed with *Der* HMW-map protein or conjugated (i.e., attached) to *Der* HMW-map protein in such a manner as to not substantially interfere with the ability of the *Der* HMW-map protein to selectively bind to an antibody that specifically binds to *Der* HMW-map protein.

A *Der* HMW-map protein of the present invention can be produced by a cell comprising the *Der* HMW-map protein. A preferred *Der* HMW-map protein-bearing

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-38-

cell includes a recombinant cell comprising a nucleic acid molecule encoding a *Der* HMW-map protein of the present invention.

In addition, a *Der* HMW-map protein formulation of the present invention can include not only a *Der* HMW-map protein but also one or more additional antigens or antibodies useful in desensitizing an animal against allergy, or preventing or treating mite allergen pathogenesis. As used herein, an antigen refers to any molecule capable of being selectively bound by an antibody. As used herein, an allergen refers to any antigen that is capable of stimulating production of antibodies involved in an allergic response in an animal. As used herein, selective binding of a first molecule to a second molecule refers to the ability of the first molecule to preferentially bind (e.g., having higher affinity higher avidity) to the second molecule when compared to the ability of a first molecule to bind to a third molecule. The first molecule need not necessarily be the natural ligand of the second molecule. Allergens of the present invention are preferably derived from mites, and mite-related allergens including, but not limited to, other insect allergens and plant allergens.

In accordance with the present invention, virtually any substance can act as an antigen and elicit an antibody response, i.e., can function as an epitope. For example, antibodies can be raised in response to carbohydrate epitopes, including saccharides and/or polysaccharides that are attached to a protein, a so-called glycosylated protein. However, a saccharide and/or polysaccharide may act as an antigen alone, without a protein being present. The terminal sugar of a carbohydrate moiety, as well as internal sugars can serve as an epitope. Polysaccharide may be present as a branched chain, in which case epitopes may comprise sugars that are not contiguous in sequence, but are adjacent spatially. Unusual, insect-specific sugars, not normally seen in mammalian proteins, may be present on glycoprotein derived from insect nucleic acid molecules, and these unusual sugars can comprise an epitope recognized by a mammalian immune system.

One embodiment of the present invention is a reagent comprising a non-proteinaceous epitope that is capable of binding to IgE of an animal that is allergic to mites, of desensitizing an animal against mite allergen, of stimulating a B lymphocyte response, and/or of stimulating a T lymphocyte response. Such an epitope, referred to

herein as a *Der* NP epitope, can exist as part of a *Der* HMW-map protein of the present invention or can be isolated therefrom. Such an epitope exists, for example, on a protein contained in the *D. farinae* HMW-map composition produced in accordance with Example 1. A *Der* NP epitope of the present invention can be isolated from its natural source or produced synthetically. Such an epitope can be, but need not be, joined to a carrier or other molecule. A *Der* NP epitope has at least one of the following identifying characteristics: (a) the epitope is resistant to β -elimination of peptides; (b) the epitope is resistant to Proteinase-K digestion; and (c) the epitope is reactive to a test designed to detect glycosylated proteins. A preferred *Der* NP epitope has all such identifying characteristics. A *Der* NP epitope can selectively bind to IgE of dogs or cats that are allergic to mites. While not being bound by theory, it is believed that a *Der* NP epitope comprises a carbohydrate moiety that apparently does not include an N-linked glycan. Identification of the structural characteristics of such an epitope can be determined by one skilled in the art. In one embodiment, there is provided an isolated antibody that selectively binds to a *Der* NP epitope. The present invention also includes a derivative of a *Der* NP epitope, i.e., a compound that mimics the activity of such an epitope (e.g. is a *Der* NP epitope mimotope) and is capable of binding to antibody raised against a native (i.e. seen in nature) *Der* NP epitope.

A reagent comprising a *Der* NP epitope of the present invention can be used in a variety of ways in accordance with the present invention. Such a reagent can be a desensitizing compound or a detection reagent to test for mite allergy susceptibility or sensitivity. In one embodiment, a therapeutic composition of the present invention includes a reagent comprising a *Der* NP epitope. In another embodiment, an assay kit of the present invention includes a reagent comprising a *Der* NP epitope. One embodiment of the present invention is a method to identify an animal susceptible to or having an allergic response to a mite. Such a method includes the steps of contacting a reagent comprising a *Der* NP epitope with antibodies of an animal and determining immunocomplex formation between the reagent and the antibodies, wherein formation of the immunocomplex indicates that the animal is susceptible to or has said allergic response. Another embodiment of the present invention is a method to desensitize a host animal to an allergic response to a mite. Such a method includes

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-40-

the step of administering to the animal a therapeutic composition that includes a reagent comprising a *Der* NP epitope as a desensitizing compound.

Another embodiment of the present invention is a *Der* HMW-map protein lacking *Der* NP epitopes. Without being bound by theory, it is believed that such a protein would be a better desensitizing compound since such a protein is expected to have a reduced ability to bind to IgE. Such a protein can be produced by, for example, removing *Der* NP epitopes from a native *Der* HMW-map protein or by producing the protein recombinantly, for example in *E. coli*.

One embodiment of the present invention is an *in vivo* test that is capable of detecting whether an animal is hypersensitive to *Der* HMW-map protein. An *in vivo* hypersensitivity test of the present invention is particularly useful for identifying animals susceptible to or having allergy to mite allergens. A suitable *in vivo* hypersensitivity test of the present invention can be, but is not limited to, a skin test comprising administering (e.g., intradermally injecting or superficial scratching) an effective amount of a formulation containing *Der* HMW-map protein, or a mimetope thereof. Methods to conduct skin tests of the present invention are known to those of skill in the art and are briefly disclosed herein.

Suitable formulations to use in an *in vivo* skin test include *Der* HMW-map protein, homologs of *Der* HMW-map protein and/or mimetopes of *Der* HMW-map protein.

It is understood by one of skill in the art that a suitable amount of *Der* HMW-map protein formulation for use in a skin test of the present invention can vary widely depending on the allergenicity of the formulation used in the test and on the site at which the product is delivered. Suitable amounts of *Der* HMW-map protein formulation for use in a skin test of the present invention include an amount capable of forming reaction, such as a detectable wheal or induration (hardness) resulting from an allergic reaction to the formulation. Preferred amounts of *Der* HMW-map protein for use in a skin test of the present invention range from about 1×10^{-8} micrograms (μg) to about 100 μg , more preferably from about 1×10^{-7} μg to about 10 μg , and even more preferably from about 1×10^{-6} μg to about 1 μg of *Der* HMW-map protein. It is to be

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-41-

appreciated by those of skill in the art that such amounts will vary depending upon the allergenicity of the protein being administered.

According to the present invention, *Der* HMW-map protein of the present invention can be combined with an immunopotentiator (e.g., carriers or adjuvants of the present invention as defined in detail below). A novel aspect, however, of the present invention is that *Der* HMW-map protein of the present invention can induce a hypersensitive response in the absence of an immunopotentiator, particularly in canines.

A skin test of the present invention further comprises administering a control solution to an animal. A control solution can include a negative control solution and/or a positive control solution. A positive control solution of the present invention contains an effective amount of at least one compound known to induce a hypersensitive response when administered to an animal. A preferred compound for use as positive control solution includes, but is not limited to, histamine. A negative control solution of the present invention can comprise a solution that is known not to induce a hypersensitive response when administered to an animal. As such, a negative control solution can comprise a solution having compounds essentially incapable of inducing a hypersensitive response or simply a buffer used to prepare the formulation, such as saline. An example of a preferred negative control solution is phenolated phosphate buffered saline (available from Greer Laboratories, Inc., Lenoir, NC).

Hypersensitivity of an animal to one or more formulations of the present invention can be evaluated by measuring reactions (e.g., wheal size, induration or hardness; using techniques known to those skilled in the art) resulting from administration of one or more experimental sample(s) and control sample(s) into an animal and comparing the reactions to the experimental sample(s) with reactions resulting from administration of one or more control solution. Preferred devices for intradermal injections include individual syringes. Preferred devices for scratching include devices that permit the administration of a number of samples at one time. The hypersensitivity of an animal can be evaluated by determining if the reaction resulting from administration of a formulation of the present invention is larger than the reaction resulting from administration of a negative control, and/or by determining

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-42-

if the reaction resulting from administration of the formulation is at least about the same size as the reaction resulting from administration of a positive control solution. As such, if an experimental sample produces a reaction greater than or equal to the size of a wheal produced by administration of a positive control sample to an animal, then that animal is hypersensitive to the experimental sample. Conversely, if an experimental sample produces a reaction similar to the reaction produced by administration of a negative control sample to an animal, then that animal is not hypersensitive to the experimental sample.

Preferred wheal sizes for evaluation of the hypersensitivity of an animal range from about 16 mm to about 8 mm, more preferably from about 15 mm to about 9 mm, and even more preferably from about 14 mm to about 10 mm in diameter.

Preferably, the ability or inability of an animal to exhibit an immediate hypersensitive response to a formulation of the present invention is determined by measuring wheal sizes from about 2 minutes to about 30 minutes after administration of a sample, more preferably from about 10 minutes to about 25 minutes after administration of a sample, and even more preferably about 15 minutes after administration of a sample.

Preferably, the ability or inability of an animal to exhibit a delayed hypersensitive response to a formulation of the present invention is determined by measuring induration and/or erythema from about 18 hours to about 30 hours after administration of a sample, more preferably from about 20 hours to about 28 hours after administration of a sample, and even more preferably at about 24 hours after administration of a sample. A delayed hypersensitivity response can also be measured using other techniques such as by determining, using techniques known to those of skill in the art, the extent of cell infiltrate at the site of administration during the time periods defined directly above.

In a preferred embodiment, a skin test of the present invention comprises intradermally injecting into an animal at a given site an effective amount of a formulation that includes *Der* HMW-map protein, and intradermally injecting an effective amount of a control solution into the same animal at a different site. It is within the scope of one of skill in the art to use devices capable of delivering multiple samples simultaneously at a number of sites, preferably enabling concurrent evaluation

of numerous formulations. A preferred *Der* HMW-map protein for use with a skin test includes full-length protein. A preferred positive control sample can be a sample comprising histamine. A preferred negative control sample can be a sample comprising diluent.

5 Animals suitable and preferred to test for hypersensitivity to *Der* HMW-map protein using a skin test of the present invention are disclosed herein. Particularly preferred animals to test with a skin test of the present invention include humans, canines, felines and equines, with human, canines and felines being even more preferred. As used herein, canine refers to any member of the dog family, including
10 domestic dogs, wild dogs and zoo dogs. Examples of dogs include, but are not limited to, domestic dogs, wild dogs, foxes, wolves, jackals and coyotes. As used herein, feline refers to any member of the cat family, including domestic cats, wild cats and zoo cats. Examples of cats include, but are not limited to, domestic cats, lions, tigers, leopards, panthers, cougars, bobcats, lynx, jaguars, cheetahs and servals. As used
15 herein, equine refers to any member of the horse family, including horses, donkeys, mules and zebras.

One embodiment of the present invention is a method to detect antibodies *in vitro* that bind to *Der* HMW-map protein (referred to herein as anti-*Der* HMW-map antibody) which includes the steps of: (a) contacting an isolated *Der* HMW-map
20 protein with a putative anti-*Der* HMW-map antibody-containing composition under conditions suitable for formation of a *Der* HMW-map protein:antibody complex; and (b) detecting the presence of the antibody by detecting the *Der* HMW-map protein:antibody complex. Presence of such a *Der* HMW-map protein:antibody complex indicates that the animal is producing antibody to a mite allergen. Preferred
25 anti-*Der* HMW-map antibody to detect include antibodies having an IgE or IgG isotype. Preferred anti-*Der* HMW-map antibody to detect include feline antibody, canine antibody, equine antibody and human antibody, with feline, canine and human antibody being particularly preferred.

As used herein, the term "contacting" refers to combining or mixing, in this
30 case a putative antibody-containing composition with a *Der* HMW-map protein. Formation of a complex between a *Der* HMW-map protein and an antibody refers to

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-4-

the ability of the *Der* HMW-map protein to selectively bind to the antibody in order to form a stable complex that can be measured (i.e., detected). As used herein, the term selectively binds to an antibody refers to the ability of a *Der* HMW-map protein of the present invention to preferentially bind to an antibody, without being able to

5 substantially bind to other antibodies that do not specifically bind to *Der* HMW-map protein. Binding between a *Der* HMW-map protein and an antibody is effected under conditions suitable to form a complex; such conditions (e.g., appropriate concentrations, buffers, temperatures, reaction times) as well as methods to optimize such conditions are known to those skilled in the art, and examples are disclosed

10 herein. Examples of complex formation conditions are also disclosed in, for example, in Sambrook et al., *ibid.*

As used herein, the term "detecting complex formation" refers to determining if any complex is formed, i.e., assaying for the presence (i.e., existence) of a complex. If complexes are formed, the amount of complexes formed can, but need not be,

15 determined. Complex formation, or selective binding, between *Der* HMW-map protein and an antibody in the composition can be measured (i.e., detected, determined) using a variety of methods standard in the art (see, for example, Sambrook et al. *ibid.*), examples of which are disclosed herein.

In one embodiment, a putative antibody-containing composition of the present

20 method includes a biological sample from an animal. A suitable biological sample includes, but is not limited to, a bodily fluid composition or a cellular composition. A bodily fluid refers to any fluid that can be collected (i.e., obtained) from an animal, examples of which include, but are not limited to, blood, serum, plasma, urine, tears, aqueous humor, cerebrospinal fluid (CSF), saliva, lymph, nasal secretions, milk and

25 feces. Such a composition of the present method can, but need not be, pretreated to remove at least some of the non-IgE or non-IgG isotypes of immunoglobulin and/or other proteins, such as albumin, present in the fluid. Such removal can include, but is not limited to, contacting the bodily fluid with a material, such as the lectin jacalin or an antibody that specifically binds to the constant region of an IgA immunoglobulin

30 (i.e., anti-IgA isotype antibody), to remove IgA antibodies and/or affinity purifying IgE or IgG antibodies from other components of the body fluid by exposing the fluid

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-45-

to, for example, Concanavalin A or protein G, respectively. In another embodiment, a composition includes collected bodily fluid that is pretreated to concentrate immunoglobulin contained in the fluid. For example, immunoglobulin contained in a bodily fluid can be precipitated from other proteins using ammonium sulfate. A preferred composition of the present method is serum.

In another embodiment, an antibody-containing composition of the present method includes a cell that produces IgE or IgG. Such a cell can have IgE or IgG bound to the surface of the cell and/or can secrete IgE or IgG. An example of such a cell includes myeloma cells. IgE or IgG can be bound to the surface of a cell either directly to the membrane of the cell or bound to a molecule (e.g., an antigen) bound to the surface of the cell.

A complex can be detected in a variety of ways including, but not limited to use of one or more of the following assays: an enzyme-linked immunoassay, a radioimmunoassay, a fluorescence immunoassay, a chemiluminescent assay, a lateral flow assay, an agglutination assay, a particulate-based assay (e.g., using particulates such as, but not limited to, magnetic particles or plastic polymers, such as latex or polystyrene beads), an immunoprecipitation assay, a BioCore™ assay (e.g., using colloidal gold) and an immunoblotting assay (e.g., a western blot). Such assays are well known to those skilled in the art. Assays can be used to give qualitative or quantitative results depending on how they are used. Some assays, such as agglutination, particulate separation, and immunoprecipitation, can be observed visually (e.g., either by eye or by machines, such as a densitometer or spectrophotometer) without the need for a detectable marker.

In other assays, conjugation (i.e., attachment) of a detectable marker to the *Der* HMW-map protein, to antibody bound to the *Der* HMW-map protein, or to a reagent that selectively binds to the *Der* HMW-map protein or to the antibody bound to the *Der* HMW-map protein (described in more detail below) aids in detecting complex formation. Examples of detectable markers include, but are not limited to, a radioactive label, an enzyme, a fluorescent label, a chemiluminescent label, a chromophoric label or a ligand. A ligand refers to a molecule that binds selectively to another molecule. Preferred detectable markers include, but are not limited to,

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-46-

fluorescein, a radioisotope, a phosphatase (e.g., alkaline phosphatase), biotin, avidin, a peroxidase (e.g., horseradish peroxidase) and biotin-related compounds or avidin-related compounds (e.g., streptavidin or ImmunoPure® NeutrAvidin available from Pierce, Rockford, IL).

- 5 In one embodiment, a complex is detected by contacting a putative antibody-containing composition with a *Der* HMW-map protein that is conjugated to a detectable marker. A suitable detectable marker to conjugate to a *Der* HMW-map protein includes, but is not limited to, a radioactive label, a fluorescent label, an enzyme label, a chemiluminescent label, a chromophoric label or a ligand. A
- 10 detectable marker is conjugated to a *Der* HMW-map protein in such a manner as not to block the ability of the *Der* HMW-map protein to bind to the antibody being detected.

- In another embodiment, a *Der* HMW-map protein:antibody complex is detected by contacting a putative antibody-containing composition with a *Der* HMW-map protein and then contacting the complex with an indicator molecule. Suitable
- 15 indicator molecules of the present invention include molecules that can bind to either the *Der* HMW-map protein or to the antibody bound to the *Der* HMW-map protein. As such, an indicator molecule can comprise, for example, an antigen and an antibody, depending upon which portion of the *Der* HMW-map protein:antibody complex is being detected. Preferred indicator molecules that are antibodies include, for example,
- 20 anti-IgE antibodies, anti-IgG antibodies and antibodies that are known bind to *Der* HMW-map protein but bind to a different epitope on *Der* HMW-map protein than antibodies identified in the putative antibody-containing composition. Preferred lectins include those lectins that bind to high-mannose groups. An indicator molecule itself can be attached to a detectable marker of the present invention. For example, an
- 25 antibody can be conjugated to biotin, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase or fluorescein.

- In one preferred embodiment, a *Der* HMW-map protein:antibody complex is detected by contacting the complex with an indicator molecule that selectively binds to an IgE antibody (referred to herein as an anti-IgE reagent) or an IgG antibody (referred
- 30 to herein as an anti-IgG reagent. Examples of such an anti-IgE or an anti-IgG antibody include, but are not limited to, a secondary antibody that is an anti-isotype antibody

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-47-

(e.g., an antibody that selectively binds to the constant region of an IgE or an IgG), an antibody-binding bacterial surface protein (e.g., Protein A or Protein G), an antibody-binding cell (e.g., a B cell, a T cell, a natural killer cell, a polymorphonuclear leukocyte cell, a monocyte cell or a macrophage cell), an antibody-binding eukaryotic cell surface protein (e.g., a Fc receptor), and an antibody-binding complement protein. Preferred indicator molecules include, but are not limited to, an anti-feline IgE antibody, an anti-feline IgG antibody, an anti-canine IgE antibody, an anti-canine IgG antibody, an anti-human IgE antibody, and an anti-human IgG antibody. As used herein, an anti-IgE or anti-IgG antibody includes not only a complete antibody but also any subunit or portion thereof that is capable of selectively binding to an IgE or IgG heavy chain constant region. For example, an anti-IgE reagent or anti-IgG reagent can include an Fab fragment or a F(ab')₂ fragment, both of which are described in detail in Janeway et al., in *Immunobiology, the Immune System in Health and Disease*, Garland Publishing, Inc., NY, 1996.

15 In another preferred embodiment, a *Der* HMW-map protein:antibody complex is detected by contacting the complex with an indicator molecule that selectively binds to *Der* HMW-map protein at a different epitope than the epitope at which an antibody in a putative antibody-containing composition binds to *Der* HMW-map protein.

In one embodiment a complex can be formed and detected in solution. In another embodiment, a complex can be formed in which one or more members of the complex are immobilized on (e.g., coated onto) a substrate. Immobilization techniques are known to those skilled in the art. Suitable substrate materials include, but are not limited to, plastic, glass, gel, celluloid, paper, PVDF (poly-vinylidene-fluoride), nylon, nitrocellulose, and particulate materials such as latex, polystyrene, nylon, nitrocellulose, agarose and magnetic resin. Suitable shapes for substrate material include, but are not limited to, a well (e.g., microtiter dish well), a plate, a dipstick, a bead, a lateral flow apparatus, a membrane, a filter, a tube, a dish, a celluloid-type matrix, a magnetic particle, and other particulates. A particularly preferred substrate comprises an ELISA plate, a dipstick, a radioimmunoassay plate, agarose beads, plastic beads, latex beads, immunoblot membranes and immunoblot

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-48-

papers. In one embodiment, a substrate, such as a particulate, can include a detectable marker.

A preferred method to detect antibody that binds to *Der* HMW-map protein is an immunoabsorbent assay. An immunoabsorbent assay of the present invention
5 comprises a capture molecule and an indicator molecule. A capture molecule of the present invention binds to an IgE or an IgG in such a manner that the IgE or IgG is immobilized to a substrate. As such, a capture molecule is preferably immobilized to a substrate of the present invention prior to exposure of the capture molecule to a putative IgE-containing composition or a putative IgG-containing composition. An
10 indicator molecule of the present invention detects the presence of an IgE or an IgG bound to a capture molecule. As such, an indicator molecule preferably is not immobilized to the same substrate as a capture molecule prior to exposure of the capture molecule to a putative IgE-containing composition or a putative IgG-containing composition.

A preferred immunoabsorbent assay method includes a step of either:
15 (a) immobilizing a *Der* HMW-map protein on a substrate prior to contacting a *Der* HMW-map protein with a putative IgE-containing composition or a putative IgG-containing composition to form a *Der* HMW-map protein-immobilized substrate; and
(b) binding a putative IgE-containing composition or a putative IgG-containing
20 composition on a substrate prior to contacting *Der* HMW-map protein with a putative IgE-containing composition or a putative IgG-containing composition, to form a putative IgE-containing composition-bound substrate or a putative IgG-containing composition-bound substrate, respectively. Preferably, the substrate includes a non-coated substrate, a *Der* HMW-map protein-immobilized substrate, an anti-IgE
25 antibody-immobilized substrate or anti-IgG antibody-immobilized substrate.

Both a capture molecule and an indicator molecule of the present invention are capable of binding to an IgE, an IgG or *Der* HMW-map protein. Preferably, a capture molecule binds to a different region of an IgE, an IgG or *Der* HMW-map protein than an indicator molecule, thereby allowing a capture molecule to be bound to an IgE, an
30 IgG or *Der* HMW-map protein at the same time as an indicator molecule. The use of a reagent as a capture molecule or an indicator molecule depends upon whether the

-49-

molecule is immobilized to a substrate when the molecule is exposed to an IgE, an IgG or *Der* HMW-map protein. For example, a *Der* HMW-map protein of the present invention is used as a capture molecule when the *Der* HMW-map protein is bound on a substrate. Alternatively, a *Der* HMW-map protein is used as an indicator molecule when the *Der* HMW-map protein is not bound on a substrate. Suitable molecules for use as capture molecules or indicator molecules include, but are not limited to, a *Der* HMW-map protein of the present invention, an anti-IgE antibody reagent or an anti-IgG antibody reagent of the present invention.

An immunoabsorbent assay of the present invention can further comprise one or more layers and/or types of secondary molecules or other binding molecules capable of detecting the presence of an indicator molecule. For example, an untagged (i.e., not conjugated to a detectable marker) secondary antibody that selectively binds to an indicator molecule can be bound to a tagged (i.e., conjugated to a detectable marker) tertiary antibody that selectively binds to the secondary antibody. Suitable secondary antibodies, tertiary antibodies and other secondary or tertiary molecules can be selected by those of skill in the art. Preferred secondary molecules of the present invention include an antigen, an anti-IgE idiotype antibody (i.e., an antibody that binds to an epitope unique to the anti-IgE antibody), an anti-IgE isotypic antibody, an anti-IgG idiotype antibody (i.e., an antibody that binds to an epitope unique to the anti-IgG antibody), and an anti-IgG isotypic antibody. Preferred tertiary molecules can be selected by a skilled artisan based upon the characteristics of the secondary molecule. The same strategy is applied for subsequent layers.

In one embodiment, *Der* HMW-map protein is used as a capture molecule by being immobilized on a substrate, such as a microtiter dish well or a dipstick. A biological sample collected from an animal is applied to the substrate and incubated under conditions suitable (i.e., sufficient) to allow for *Der* HMW-map protein:antibody complex formation bound to the substrate (i.e., IgE or IgG in a sample binds to *Der* HMW-map protein immobilized on a substrate). Excess non-bound material (i.e., material from the biological sample that has not bound to the *Der* HMW-map protein), if any, is removed from the substrate under conditions that retain antigen:antibody complex binding to the substrate. Preferred conditions are generally

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-50-

disclosed in Sambrook et al., *ibid.* An indicator molecule that can selectively bind to an IgE or an IgG bound to the antigen is added to the substrate and incubated to allow formation of a complex between the indicator molecule and the *Der* HMW-map protein:antibody complex. Excess indicator molecule is removed, a developing agent is added if required, and the substrate is submitted to a detection device for analysis. A preferred indicator molecule for this embodiment is an anti-IgG antibody to detect IgG antibody bound to *Der* HMW-map protein or an anti-IgE antibody to detect IgE antibody bound to *Der* HMW-map protein. Preferably the anti-IgG or anti-IgE antibodies are conjugated to biotin, to a fluorescent label or to an enzyme label.

10 In one embodiment, an anti-IgE or anti-IgG antibody (e.g., isotype or idiotype specific antibody) is used as a capture molecule by being immobilized on a substrate, such as a microtiter dish well or a dipstick. A biological sample collected from an animal is applied to the substrate and incubated under conditions suitable to allow for anti-IgE antibody:IgE complex or anti-IgG antibody:IgG complex formation, respectively, bound to the substrate. Excess non-bound material, if any, is removed from the substrate under conditions that retain anti-IgE antibody:IgE complex or anti-IgG antibody:IgG complex binding to the substrate. *Der* HMW-map protein is added to the substrate and incubated to allow formation of a complex between the *Der* HMW-map protein and the anti-IgE antibody:IgE complex or anti-IgG antibody:IgG complex. Preferably, the *Der* HMW-map protein is conjugated to a detectable marker (preferably to biotin, an enzyme label or a fluorescent label). Excess *Der* HMW-map protein is removed, a developing agent is added if required, and the substrate is submitted to a detection device for analysis.

25 In one embodiment, an immunoabsorbent assay of the present invention does not utilize a capture molecule. In this embodiment, a biological sample collected from an animal is applied to a substrate, such as a microtiter dish well or a dipstick, and incubated under conditions suitable to allow for IgE or IgG binding to the substrate. Any IgE or IgG present in the bodily fluid is immobilized on the substrate. Excess non-bound material, if any, is removed from the substrate under conditions that retain IgE or IgG binding to the substrate. *Der* HMW-map protein is added to the substrate and incubated to allow formation of a complex between the *Der* HMW-map protein

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-51-

and the IgE or IgG. Preferably, the *Der* HMW-map protein is conjugated to a detectable marker (preferably to biotin, an enzyme label or a fluorescent label). Excess *Der* HMW-map protein is removed, a developing agent is added if required, and the substrate is submitted to a detection device for analysis.

- 5 Another preferred method to detect IgE or IgG is a lateral flow assay, examples of which are disclosed in U.S. Patent No. 5,424,193, issued June 13, 1995, by Pronovost et al.; U.S. Patent No. 5,415,994, issued May 16, 1995, by Imrich et al; WO 94/29696, published December 22, 1994, by Miller et al.; and WO 94/01775, published January 20, 1994, by Pawlak et al. In one embodiment, a biological sample
- 10 is placed in a lateral flow apparatus that includes the following components: (a) a support structure defining a flow path; (b) a labeling reagent comprising a bead conjugated to *Der* HMW-map protein, the labeling reagent being impregnated within the support structure in a labeling zone; and (c) a capture reagent comprising an IgE-binding or an IgG-binding composition. The capture reagent is located downstream of
- 15 the labeling reagent within a capture zone fluidly connected to the labeling zone in such a manner that the labeling reagent can flow from the labeling zone into the capture zone. The support structure comprises a material that does not impede the flow of the beads from the labeling zone to the capture zone. Suitable materials for use as a support structure include ionic (i.e., anionic or cationic) material. Examples
- 20 of such a material include, but are not limited to, nitrocellulose (NC), PVDF, carboxymethylcellulose (CM). The support structure defines a flow path that is lateral and is divided into zones, namely a labeling zone and a capture zone. The apparatus can further comprise a sample receiving zone located along the flow path, more preferably upstream of the labeling reagent. The flow path in the support structure is
- 25 created by contacting a portion of the support structure downstream of the capture zone, preferably at the end of the flow path, to an absorbent capable of absorbing excess liquid from the labeling and capture zones.

- In this embodiment, the biological sample is applied to the sample receiving zone which includes a portion of the support structure. The labeling zone receives the
- 30 sample from the sample receiving zone which is directed downstream by the flow path. The labeling zone comprises the labeling reagent that binds to IgE or IgG, or

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-52-

both. A preferred labeling reagent is *Der* HMW-map protein conjugated, either directly or through a linker, to a plastic bead substrate, such as to a latex bead. The substrate also includes a detectable marker, preferably a colorimetric marker.

Typically, the labeling reagent is impregnated to the support structure by drying or lyophilization. The sample structure also comprises a capture zone downstream of the labeling zone. The capture zone receives labeling reagent from the labeling zone which is directed downstream by the flow path. The capture zone contains the capture reagent, in this case an anti-IgE or anti-IgG antibody, or both, as disclosed above, that immobilizes the IgE and/or IgG complexed to the *Der* HMW-map protein in the capture zone. The capture reagent is preferably fixed to the support structure by drying or lyophilizing. The labeling reagent accumulates in the capture zone and the accumulation is assessed visually or by an optical detection device.

In another embodiment, a lateral flow apparatus used to detect IgE or IgG includes: (a) a support structure defining a flow path; (b) a labeling reagent comprising an anti-IgE or an anti-IgG antibody, or both, as described above, the labeling reagent impregnated within the support structure in a labeling zone; and (c) a capture reagent comprising *Der* HMW-map protein, the capture reagent being located downstream of the labeling reagent within a capture zone fluidly connected to the labeling zone in such a manner that the labeling reagent can flow from the labeling zone into the capture zone. The apparatus preferably also includes a sample receiving zone located along the flow path, preferably upstream of the labeling reagent. The apparatus preferably also includes an absorbent located at the end of the flow path.

An animal hypersensitive to *Der* HMW-map protein is identified by comparing the level of immunocomplex formation using samples of body fluid with the level of immunocomplex formation using control samples. An immunocomplex refers to a complex comprising an antibody and *Der* HMW-map protein (i.e., *Der* HMW-map protein:antibody complex). As such, immunocomplexes form using positive control samples and do not form using negative control samples. As such, if a body fluid sample results in immunocomplex formation greater than or equal to immunocomplex formation using a positive control sample, then the animal from which the fluid was taken is hypersensitive to the *Der* HMW-map protein bound to the substrate.

-53-

Conversely, if a body fluid sample results in immunocomplex formation similar to immunocomplex formation using a negative control sample, then the animal from which the fluid was taken is not hypersensitive to the *Der* HMW-map protein bound to the substrate.

5 It is within the scope of the present invention that two or more different skin tests and/or *in vitro* tests can be used in combination for diagnostic purposes. For example, the immediate hypersensitivity of an animal to *Der* HMW-map protein can be tested using an *in vitro* immunoabsorbent test capable of detecting IgE antibodies specific for *Der* HMW-map protein in the animal's bodily fluid. While most animals
10 that display delayed hypersensitivity to *Der* HMW-map protein also display immediate hypersensitivity to the allergen, a small number of animals that display delayed hypersensitivity to an allergen do not display immediate hypersensitivity to the allergen. In such cases, following negative results from the IgE-specific *in vitro* test, the delayed hypersensitivity of the animal to *Der* HMW-map protein can be tested
15 using a skin test of the present invention.

The present invention also includes kits to detect antibodies that bind specifically to *Der* HMW-map protein based on each of the disclosed detection methods. One embodiment is a kit to detect *Der* HMW-map protein-specific antibodies comprising *Der* HMW-map protein and a means for detecting an IgE and/or
20 an IgG. Suitable means of detection include compounds disclosed herein that bind to either the *Der* HMW-map protein or to an IgE and/or an IgG. A preferred kit of the present invention further comprises a detection means including an antibody capable of selectively binding to an IgE or IgG disclosed herein and/or a compound capable of binding to a detectable marker conjugated to a *Der* HMW-map protein (e.g., avidin,
25 streptavidin and ImmunoPure® NeutrAvidin when the detectable marker is biotin).

Another preferred kit of the present invention is an allergen kit comprising *Der* HMW-map protein and an allergen commonly detected in the same environment as mite allergen. Suitable and preferred mite-related allergens for use with the present kit include those mite-related allergens disclosed herein.

30 A preferred kit of the present invention includes those in which *Der* HMW-map protein is immobilized on a substrate. If a kit comprises *Der* HMW-map protein

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-54-

and another allergen, the kit can comprise one or more compositions, each composition comprising one allergen. As such, each allergen can be tested separately. A kit can also contain two or more diagnostic reagents for IgE or IgG, or other compounds as disclosed herein. Particularly preferred are kits used in a lateral flow assay format. It is within the scope of the present invention that a lateral flow assay kit can include one or more lateral flow assay apparatuses. Multiple lateral flow apparatuses can be attached to each other at one end of each apparatus, thereby creating a fan-like structure.

Another aspect of the present invention includes treating animals susceptible to or having mite allergy, with a *Der* HMW-map protein formulation of the present invention. According to the present invention, the term treatment can refer to the regulation of a hypersensitive response by an animal to mite allergens. Regulation can include, for example, immunomodulation of cells involved in the animal's hypersensitive response. Immunomodulation can include modulating the activity of molecules typically involved in an immune response (e.g., antibodies, antigens, major histocompatibility molecules (MHC) and molecules co-reactive with MHC molecules). In particular, immunomodulation refers to modulation of antigen:antibody interactions resulting in inflammatory responses, immunosuppression, and immunotolerization of cells involved in a hypersensitive response.

Immunosuppression refers to inhibiting an immune response by, for example, killing particular cells involved in the immune response. Immunotolerization refers to inhibiting an immune response by anergizing (i.e., diminishing reactivity of a T cell to an antigen) particular cells involved in the immune response.

One embodiment of the present invention is a therapeutic composition that includes desensitizing compounds capable of inhibiting an immune response to *Der* HMW-map protein of the present invention. Such desensitizing compounds include blocking compounds, toleragens and/or suppressor compounds. Blocking compounds comprise compounds capable of modulating antigen:antibody interactions that can result in inflammatory responses, toleragens are compounds capable of immunotolerizing an animal, and suppressor compounds are capable of immunosuppressing an animal. A desensitizing compound of the present invention

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-55-

can be soluble or membrane-bound. Membrane-bound desensitizing compounds can be associated with biomembranes, including cells, liposomes, planar membranes or micelles. A soluble desensitizing compound of the present invention is useful for: (1) inhibiting a Type I hypersensitivity reaction by blocking IgE:antigen mediated de-

5 granulation of mast cells; (2) inhibiting a Type III hypersensitivity reaction by blocking IgG:antigen complex formation leading to complement destruction of cells; and (3) inhibiting a Type IV hypersensitivity reaction by blocking T helper cell stimulation of cytokine secretion by macrophages. A membrane-bound desensitizing compound of the present invention is useful for: (1) inhibiting a Type II

10 hypersensitivity reaction by blocking IgG:antigen complex formation on the surface of cells leading to complement destruction of cells; (2) inhibiting a Type II hypersensitivity reaction by blocking IgG regulated signal transduction in immune cells; and (3) inhibiting a Type IV hypersensitivity reaction by blocking T cytotoxic cell killing of antigen-bearing cells. Examples of desensitizing compounds include,

15 but are not limited to, muteins, mimetopes and antibodies of the present invention, as well as other inhibitors of the present invention that inhibit binding between a protein of the present invention and IgE.

A desensitizing compound of the present invention can also be covalently linked to a ligand molecule capable of targeting the desensitizing compound to a

20 specific cell involved in a hypersensitive response to *Der* HMW-map protein. Appropriate ligands with which to link a desensitizing compound include, for example, at least a portion of an immunoglobulin molecule, cytokines, lectins, heterologous allergens, CD8 molecules or major histocompatibility molecules (e.g., MHC class I or MHC class II molecules). Preferred portions of immunoglobulin

25 molecules to link to a desensitizing compound include variable regions capable of binding to immune cell specific surface molecules and constant regions capable of binding to Fc receptors on immune cells, in particular IgE constant regions. Preferred CD8 molecules include at least the extracellular functional domains of the α chain of CD8. An immune cell refers to a cell involved in an immune response, in particular,

30 cells having MHC class I or MHC class II molecules. Preferred immune cells include antigen presenting cells, T cells and B cells.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-56-

In one embodiment, a therapeutic composition of the present invention includes *Der* HMW-map protein of the present invention, a mimotope or mutein thereof, or a *Der* HMW-map nucleic acid molecule of the present invention. Suitable therapeutic compositions of the present invention for treating mite allergy include *Der* HMW-map protein, a mimotope or mutein thereof, or a *Der* HMW-map nucleic acid molecule of the present invention. Preferred therapeutic compositions include: an isolated mite allergenic protein encoded a nucleic acid molecule that hybridizes under stringent hybridization conditions with the complement of a nucleic acid molecule that encodes an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, and SEQ ID NO:44; a mimotope of the mite allergenic protein; a mutein of the mite allergenic protein; and an isolated nucleic acid molecule selected from the group consisting of: a nucleic acid molecule comprising at least about 150 nucleotides, wherein said nucleic acid molecule comprising at least about 150 nucleotides hybridizes, in a solution comprising 1X SSC and 0% formamide, at a temperature of about 50°C, to a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, and a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33 and a complement thereof; and a nucleic acid molecule comprising a fragment of any of said nucleic acid molecules comprising at least about 150 nucleotides. A preferred *Der* HMW-map mutein comprises at least a portion of *Der* HMW-map protein, in which a suitable number of cysteine residues have been removed or replaced with a non-cysteine residue such that the altered *Der* HMW-map protein is not toxic to an animal (e.g., does not cause anaphylaxis).

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-57-

In another embodiment, a therapeutic composition of the present invention includes a nucleic acid molecule encoding a *Der* HMW-map protein that can be administered to an animal in a fashion to enable expression of that nucleic acid molecule into a *Der* HMW-map protein in the animal. Nucleic acid molecules can be delivered to an animal in a variety of methods including, but not limited to, (a) administering a naked (i.e., not packaged in a viral coat or cellular membrane) nucleic acid molecule (e.g., as naked DNA or RNA molecules, such as is taught, for example in Wolff et al., 1990, *Science* 247, 1465-1468) or (b) administering a nucleic acid molecule packaged as a recombinant virus or as a recombinant cell (i.e., the nucleic acid molecule is delivered by a viral or cellular vehicle).

A naked nucleic acid molecule of the present invention includes a nucleic acid molecule of the present invention and preferably includes a recombinant molecule of the present invention that preferably is replication, or otherwise amplification, competent. A naked nucleic acid of the present invention can comprise one or more nucleic acid molecules of the present invention in the form of, for example, a bicistronic recombinant molecule having, for example one or more internal ribosome entry sites. Preferred naked nucleic acid molecules include at least a portion of a viral genome (i.e., a viral vector). Preferred viral vectors include those based on alphaviruses, poxviruses, adenoviruses, herpesviruses, picornaviruses, and retroviruses, with those based on alphaviruses (such as Sindbis or Semliki virus), species-specific herpesviruses and species-specific poxviruses being particularly preferred. Any suitable transcription control sequence can be used, including those disclosed as suitable for protein production. Particularly preferred transcription control sequence include cytomegalovirus intermediate early (preferably in conjunction with Intron-A), Rous Sarcoma Virus long terminal repeat, and tissue-specific transcription control sequences, as well as transcription control sequences endogenous to viral vectors if viral vectors are used. The incorporation of "strong" poly(A) sequences are also preferred.

Naked nucleic acid molecules of the present invention can be administered by a variety of methods. Suitable delivery methods include, for example, intramuscular injection, subcutaneous injection, intradermal injection, intradermal scarification,

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-58-

particle bombardment, oral application, and nasal application, with intramuscular injection, intradermal injection, intradermal scarification and particle bombardment being preferred, and intramuscular injection being even more preferred. A preferred single dose of a naked DNA molecule ranges from about 1 nanogram (ng) to about 1 milligram (mg), depending on the route of administration and/or method of delivery, as can be determined by those skilled in the art. Examples of administration methods are disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,204,253, by Bruner, et al., issued April 20, 1993, PCT Publication No. WO 95/19799, published July 27, 1995, by McCabe, and PCT Publication No. WO 95/05853, published March 2, 1995, by Carson, et al.

10 Naked DNA molecules of the present invention can be contained in an aqueous excipient (e.g., phosphate buffered saline) and/or with a carrier (e.g., lipid-based vehicles), or it can be bound to microparticles (e.g., gold particles).

A recombinant virus of the present invention includes a recombinant molecule of the present invention that is packaged in a viral coat and that can be expressed in an animal after administration. Preferably, the recombinant molecule is packaging-deficient and/or encodes an attenuated virus. A number of recombinant viruses can be used, including, but not limited to, those based on alphaviruses, poxviruses, adenoviruses, herpesviruses, picornaviruses and retroviruses. Preferred recombinant viruses are those based on alphaviruses (such as Sindbis virus), raccoon poxviruses, species-specific herpesviruses and species-specific poxviruses. An example of methods to produce and use alphavirus recombinant virus is disclosed in PCT Publication No. WO 94/17813, by Xiong et al., published August 18, 1994.

20

When administered to an animal, a recombinant virus of the present invention infects cells within the recipient animal and directs the production of a protein or RNA nucleic acid molecule that is capable of reducing *Der* HMW-map protein-mediated biological responses in the animal. For example, a recombinant virus comprising a *Der* HMW-map nucleic acid molecule of the present invention is administered according to a protocol that results in the animal producing an amount of protein or RNA sufficient to reduce *Der* HMW-map protein-mediated biological responses. A preferred single dose of a recombinant virus of the present invention is from about 1×10^4 to about 1×10^7 virus plaque forming units (pfu) per kilogram body weight of the

25

30

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-59-

animal. Administration protocols are similar to those described herein for protein-based compositions, with subcutaneous, intramuscular, intranasal and oral administration routes being preferred.

5 A recombinant cell vaccine of the present invention includes recombinant cells of the present invention that express at least one protein of the present invention. Preferred recombinant cells for this embodiment include *Salmonella*, *E. coli*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *S. frugiperda*, yeast, (including *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*), BHK, CV-1, myoblast G8, COS (e.g., COS-7), Vero, MDCK and CRFK recombinant cells. Recombinant cell vaccines of the present invention can be administered in a variety of ways but have the advantage that they can be administered orally, preferably at doses ranging from about 10^8 to about 10^{12} cells per kilogram body weight. Administration protocols are similar to those described herein for protein-based vaccines. Recombinant cell vaccines can comprise whole cells, cells stripped of cell walls or cell lysates.

15 The efficacy of a therapeutic composition of the present invention to desensitize an animal against mite allergy can be tested in a variety of ways including, but not limited to, using *in vivo* skin test methods disclosed herein, detection of cellular immunity activity in the treated animal, or determine levels of IgE that bind specifically to a *Der* HMW-map protein of the present invention. Methods to determine cellular immunity activity and IgE levels in an animal are known to those of skill in the art. In one embodiment, therapeutic compositions can be tested in animal models such as dogs, cats, rabbits and mice, and can also be tested in humans. Such techniques are known to those skilled in the art.

25 Preferred nucleic acid molecules to use with a therapeutic composition of the present invention include any *Der* HMW-map nucleic acid molecule disclosed herein, in particular SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45 and/or a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33 and a complement thereof.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-60-

A recombinant cell useful in a therapeutic composition of the present invention includes recombinant cells of the present invention that comprises *Der* HMW-map protein of the present invention. Preferred recombinant cells for this embodiment include *Salmonella*, *E. coli*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *S. frugiperda*, yeast, (including 5 *Saccharomyces cerevisiae*), BHK, CV-1, myoblast G8, COS (e.g., COS-7), Vero, MDCK and CRFK recombinant cells. A recombinant cell of the present invention can be administered in a variety of ways but have the advantage that they can be administered orally, preferably at doses ranging from about 10^8 to about 10^{12} cells per kilogram body weight. Administration protocols are similar to those described herein 10 for protein compositions. Recombinant cells can comprise whole cells, cells stripped of cell walls or cell lysates.

One embodiment of the present invention is a method of immunotherapy comprising administering to an animal an effective amount of a therapeutic composition comprising a *Der* HMW-map protein of the present invention. Suitable 15 therapeutic compositions and methods of administration are disclosed herein. According to the present invention, a therapeutic composition and method of the present invention can be used to prevent or alleviate symptoms associated with mite allergen pathogenesis.

The efficacy of a therapeutic composition of the present invention to effect an allergic response to *Der* HMW-map protein can be tested using standard methods for 20 detecting *Der* HMW-map protein-mediated immunity including, but not limited to, immediate hypersensitivity, delayed hypersensitivity, antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), immune complex activity, mitogenic activity, histamine release assays and other methods such as those described in Janeway et al., *ibid*.

25 The present invention also includes a therapeutic composition comprising one or more therapeutic compounds of the present invention. Examples of such therapeutic compounds include, for example, other allergens disclosed herein.

Therapeutic compositions of the present invention can be formulated in an excipient that the animal to be treated can tolerate. Examples of such excipients 30 include water, saline, Ringer's solution, dextrose solution, Hank's solution, and other aqueous physiologically balanced salt solutions. Nonaqueous vehicles, such as fixed

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-61-

oils, sesame oil, ethyl oleate, or triglycerides may also be used. Other useful formulations include suspensions containing viscosity enhancing agents, such as sodium carboxymethylcellulose, sorbitol, or dextran. Excipients can also contain minor amounts of additives, such as substances that enhance isotonicity and chemical stability. Examples of buffers include phosphate buffer, bicarbonate buffer and Tris buffer, while examples of preservatives include thimerosal, o-cresol, formalin and benzyl alcohol. Standard formulations can either be liquid injectables or solids which can be taken up in a suitable liquid as a suspension or solution for injection. Thus, in a non-liquid formulation, the excipient can comprise dextrose, human serum albumin, preservatives, etc., to which sterile water or saline can be added prior to administration.

In one embodiment of the present invention, a therapeutic composition can include an adjuvant. Adjuvants are agents that are capable of enhancing the immune response of an animal to a specific antigen. Suitable adjuvants include, but are not limited to, cytokines, chemokines, and compounds that induce the production of cytokines and chemokines (e.g., granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), colony stimulating factor (CSF), Flt-3 ligand, erythropoietin (EPO), interleukin 2 (IL-2), interleukin-3 (IL-3), interleukin 4 (IL-4), interleukin 5 (IL-5), interleukin 6 (IL-6), interleukin 7 (IL-7), interleukin 8 (IL-8), interleukin 10 (IL-10), interleukin 12 (IL-12), interferon gamma, interferon gamma inducing factor I (IGIF), transforming growth factor beta, RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted), macrophage inflammatory proteins (e.g., MIP-1 alpha and MIP-1 beta), and Leishmania elongation initiating factor (LEIF); bacterial components (e.g., endotoxins, in particular superantigens, exotoxins and cell wall components); aluminum-based salts; calcium-based salts; silica; polynucleotides; toxoids; serum proteins, viral coat proteins; block copolymer adjuvants (e.g., Hunter's Titermax™ adjuvant (Vaxcel™, Inc. Norcross, GA), Ribi adjuvants (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT); and saponins and their derivatives (e.g., Quil A (Superfos Biosector A/S, Denmark). Protein adjuvants of the present invention can be delivered in the form of the protein

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-62-

themselves or of nucleic acid molecules encoding such proteins using the methods described herein.

In one embodiment of the present invention, a therapeutic composition can include a carrier. Carriers include compounds that increase the half-life of a
5 therapeutic composition in the treated animal. Suitable carriers include, but are not limited to, polymeric controlled release vehicles, biodegradable implants, liposomes, bacteria, viruses, other cells, oils, esters, and glycols.

One embodiment of the present invention is a controlled release formulation that is capable of slowly releasing a composition of the present invention into an
10 animal. As used herein, a controlled release formulation comprises a composition of the present invention in a controlled release vehicle. Suitable controlled release vehicles include, but are not limited to, biocompatible polymers, other polymeric matrices, capsules, microcapsules, microparticles, bolus preparations, osmotic pumps, diffusion devices, liposomes, lipospheres, and transdermal delivery systems. Other
15 controlled release formulations of the present invention include liquids that, upon administration to an animal, form a solid or a gel *in situ*. Preferred controlled release formulations are biodegradable (i.e., bioerodible).

A preferred controlled release formulation of the present invention is capable of releasing a therapeutic composition of the present invention into the blood of an
20 animal at a constant rate sufficient to attain therapeutic dose levels of the composition to reduce mite allergy in the animal. As used herein, mite allergy refers to cellular responses that occur when mite allergens contact an animal. For example, IgE that specifically binds to mite allergen becomes coupled with Fc epsilon receptor, resulting in Fc epsilon receptor-mediated biological response including release of biological
25 mediators, such as histamine, prostaglandins and/or proteases; that can trigger clinical symptoms of allergy. The therapeutic composition is preferably released over a period of time ranging from about 1 to about 12 months. A preferred controlled release formulation of the present invention is capable of effecting a treatment preferably for
at least about 1 month, more preferably for at least about 3 months, even more
30 preferably for at least about 6 months, even more preferably for at least about 9 months, and even more preferably for at least about 12 months.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-63-

Therapeutic compositions of the present invention can be sterilized by conventional methods which do not result in protein degradation (e.g., filtration) and/or lyophilized.

A therapeutic composition of the present invention can be administered to any animal susceptible to mite allergy as herein described. Acceptable protocols by which to administer therapeutic compositions of the present invention in an effective manner can vary according to individual dose size, number of doses, frequency of dose administration, and mode of administration. Determination of such protocols can be accomplished by those skilled in the art. An effective dose refers to a dose capable of treating an animal against hypersensitivity to mite allergens. Effective doses can vary depending upon, for example, the therapeutic composition used and the size and type of the recipient animal. Effective doses to immunomodulate an animal against mite allergens include doses administered over time that are capable of alleviating a hypersensitive response by an animal to mite allergens. For example, a first tolerizing dose can comprise an amount of a therapeutic composition of the present invention that causes a minimal hypersensitive response when administered to a hypersensitive animal. A second tolerizing dose can comprise a greater amount of the same therapeutic composition than the first dose. Effective tolerizing doses can comprise increasing concentrations of the therapeutic composition necessary to tolerize an animal such that the animal does not have a hypersensitive response to exposure to mite allergens. An effective dose to desensitize an animal can comprise a concentration of a therapeutic composition of the present invention sufficient to block an animal from having a hypersensitive response to exposure to a mite allergen present in the environment of the animal. Effective desensitizing doses can include repeated doses having concentrations of a therapeutic composition that cause a minimal hypersensitive response when administered to a hypersensitive animal.

A suitable single dose is a dose that is capable of treating an animal against hypersensitivity to mite allergens when administered one or more times over a suitable time period. For example, a preferred single dose of a mite allergen, or mimotope therapeutic composition is from about 0.5 ng to about 1 g of the therapeutic composition per kilogram body weight of the animal. Further treatments with the

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-64-

therapeutic composition can be administered from about 1 day to 1 year after the original administration. Further treatments with the therapeutic composition preferably are administered when the animal is no longer protected from hypersensitive responses to mite allergens. Particular administration doses and schedules can be developed by one of skill in the art based upon the parameters discussed above. Modes of administration can include, but are not limited to, subcutaneous, intradermal, intravenous, nasal, oral, transdermal and intramuscular routes.

A therapeutic composition of the present invention can be used in conjunction with other compounds capable of modifying an animal's hypersensitivity to mite allergens. For example, an animal can be treated with compounds capable of modifying the function of a cell involved in a hypersensitive response, compounds that reduce allergic reactions, such as by systemic agents or anti-inflammatory agents (e.g., anti-histamines, anti-steroid reagents, anti-inflammatory reagents and reagents that drive immunoglobulin heavy chain class switching from IgE to IgG). Suitable compounds useful for modifying the function of a cell involved in a hypersensitive response include, but are not limited to, antihistamines, cromolyn sodium, theophylline, cyclosporin A, adrenalin, cortisone, compounds capable of regulating cellular signal transduction, compounds capable of regulating adenosine 3',5'-cyclic phosphate (cAMP) activity, and compounds that block IgE activity, such as peptides from IgE or IgE specific Fc receptors, antibodies specific for peptides from IgE or IgE-specific Fc receptors, or antibodies capable of blocking binding of IgE to Fc receptors.

Compositions of the present invention can be administered to any animal having or susceptible to mite allergen hypersensitivity. Preferred animals to treat include mammals and birds, with felines, canines, equines, humans and other pets, work and/or economic food animals. Particularly preferred animals to protect are felines and canines.

Another aspect of the present invention includes a method for prescribing treatment for animals susceptible to or having hypersensitivity to mite allergens, using a formulation of the present invention. A preferred method for prescribing treatment for mite allergen hypersensitivity, for example, comprises: (1) intradermally injecting into an animal at one site an effective amount of a formulation containing a mite

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-65-

allergen of the present invention, or a mimetope thereof (suitable and preferred formulations are disclosed herein); (2) intradermally injecting into the animal at a second site an effective amount of a control solution; (3) evaluating if the animal has mite allergen hypersensitivity by measuring and comparing the wheal size resulting from injection of the formulation with the wheal size resulting from injection of the control solution; and (4) prescribing a treatment for the mite allergen hypersensitivity.

An alternative preferred method for prescribing treatment for mite allergen hypersensitivity comprises: (1) contacting a first portion of a sample of bodily fluid obtained from an animal to be tested with an effective amount of a formulation containing mite allergen, or a mimetope thereof (suitable and preferred formulations are disclosed herein) to form a first immunocomplex solution; (2) contacting a positive control antibody to form a second immunocomplex solution; (3) evaluating if the animal has mite allergen hypersensitivity by measuring and comparing the amount of immunocomplex formation in the first and second immunocomplex solutions; and (4) prescribing a treatment for the mite allergen hypersensitivity. It is to be noted that similar methods can be used to prescribe treatment for allergies using mite allergen formulations as disclosed herein.

Another aspect of the present invention includes a method for monitoring animals susceptible to or having mite allergen hypersensitivity, using a formulation of the present invention. *In vivo* and *in vitro* tests of the present invention can be used to test animals for mite allergen hypersensitivity prior to and following any treatment for mite allergen hypersensitivity. A preferred method to monitor treatment of mite allergen hypersensitivity (which can also be adapted to monitor treatment of other allergies) comprises: (1) intradermally injecting an animal at one site with an effective amount of a formulation containing mite allergen, or a mimetope thereof (suitable and preferred formulations are disclosed herein); (2) intradermally injecting an effective amount of a control solution into the animal at a second site; and (3) determining if the animal is desensitized to mite allergens by measuring and comparing the wheal size resulting from injection of the formulation with the wheal size resulting from injection of the control solution.

An alternative preferred method to monitor treatment of mite allergen hypersensitivity (which can be adapted to monitor treatments of other allergies)

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-66-

comprises: (1) contacting a first portion of a sample of bodily fluid obtained from an animal to be tested with an effective amount of a formulation containing a mite allergen or mimotope thereof (suitable and preferred formulations are disclosed herein) to form a first immunocomplex solution; (2) contacting a positive control antibody to form a second immunocomplex solution; and (3) determining if the animal is desensitized to mite allergens by measuring and comparing the amount of immunocomplex formation in the first and second immunocomplex solutions.

The present invention also includes antibodies capable of selectively binding to mite allergen, or mimotope thereof. Such an antibody is herein referred to as an anti-mite allergen antibody. As used herein, the term "selectively binds to" refers to the ability of such an antibody to preferentially bind to mite allergens and mimitopes thereof. In particular, the present invention includes antibodies capable of selectively binding to *Der* HMW-map protein. Binding can be measured using a variety of methods known to those skilled in the art including immunoblot assays, immunoprecipitation assays, enzyme immunoassays (e.g., ELISA), radioimmunoassays, immunofluorescent antibody assays and immunoelectron microscopy; see, for example, Sambrook et al., *ibid*.

Antibodies of the present invention can be either polyclonal or monoclonal antibodies. Antibodies of the present invention include functional equivalents such as antibody fragments and genetically-engineered antibodies, including single chain antibodies, that are capable of selectively binding to at least one of the epitopes of the protein or mimotope used to obtain the antibodies. Preferred antibodies are raised in response to *Der* HMW-map proteins, or mimitopes thereof. More preferred *Der* HMW-map protein against which to raise an antibody includes at least a portion of a protein having the amino acid sequence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, and/or SEQ ID NO:44, or homologs thereof. Preferably, an antibody of the present invention has a single site binding affinity of

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-67-

from about $10^3 M^{-1}$ to about $10^{12} M^{-1}$ for a *Der* HMW-map protein of the present invention.

A preferred method to produce antibodies of the present invention includes administering to an animal an effective amount of a *Der* HMW-map protein or
5 mimotope thereof to produce the antibody and recovering the antibodies. Antibodies raised against defined products or mimetopes can be advantageous because such antibodies are not substantially contaminated with antibodies against other substances that might otherwise cause interference in a diagnostic assay or side effects if used in a therapeutic composition.

10 Antibodies of the present invention have a variety of potential uses that are within the scope of the present invention. For example, such antibodies can be used (a) as vaccines to passively immunize an animal in order to protect the animal from mite allergen hypersensitivity, (b) as positive controls in test kits, and/or (c) as tools to recover desired mite allergens from a mixture of proteins and other contaminants.

15 The following examples are provided for the purposes of illustration and are not intended to limit the scope of the present invention.

EXAMPLES

It is to be noted that the Examples include a number of molecular biology, microbiology, immunology and biochemistry techniques considered to be known to
20 those skilled in the art. Disclosure of such techniques can be found, for example, in Sambrook et al., *ibid.*, and related references.

Example 1

This example describes the identification of high molecular weight proteins that bind to IgE from dogs known to be allergic to mite allergens.

25 About 5.5 grams (g) of frozen wet *Dermataphagoides farinae* (*Der f*) mites (available from Bayer Allergy, Spokane, WA) were homogenized in a ground glass homogenizer, in either about 30 ml of phosphate buffered saline (PBS) or 0.1 M Tris-HCl, pH 8, each containing complete protease inhibitors (available from Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) to obtain a *Der f* crude extract. The resulting
30 supernatants were collected and each concentrated in a Centriprep 30 concentrator (available from Amicon, Beverly, MA) by centrifugation at $16,000 \times g$ for about 30

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-68-

minutes. The concentrated supernatants were applied to separate Sephacryl S-100 columns (2.7 x 70 cm; available from Pharmacia, Piscataway, NJ) in PBS or 0.1 M Tris-HCl, pH 8, respectively. The excluded fractions from each column were pooled. Fractions were dialyzed against 10 mM Tris-HCl, pH 8, when PBS was used. The

5 fractions were applied to separate Q-Sepharose columns (2.5 x 5 cm; available from Pharmacia). The Q-Sepharose column was pre-equilibrated in 10 mM Tris-HCl, pH 8, when the fractions containing 0.1 M Tris-HCl, pH 8 were used. Each column was sequentially eluted with about 45 ml of 10 mM Tris-HCl, pH 8, then 0.1 M Tris-HCl, pH 8, then 0.2 M Tris-HCl, pH 8, then 0.3 M Tris-HCl, pH 8, then 0.4 M Tris-HCl, pH

10 8 and then 0.5 M Tris-HCl, pH 8. Fractions were collected from each elution step. Each fraction was analyzed by western blot for the presence of protein that bound to IgE antibodies present in dog sera isolated from dogs known to be allergic to mite allergens (referred to herein as mite allergic dog antisera or mite allergic antisera). Specifically, proteins contained in the fractions were resolved by 12% Tris-glycine

15 SDS-PAGE and then blotted onto nitrocellulose. The blot was incubated with a pool of sera obtained from dogs known to be allergic to mite allergens, diluted 1:20, using standard buffers. The blot was incubated and then washed using standard procedures. The blot was then incubated with the mouse monoclonal anti-dog IgE antibody DEI38 (1 mg/ml, 1:1000 dilution). The blot was incubated and then washed using standard

20 procedures. The blot was then incubated with donkey anti-mouse IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:1000 dilution; available from Jackson Labs, Maine). The presence of HRP-conjugated antibody bound to the blot was detected using standard techniques. An about 70-kD protein was identified in the 0.2 M Tris-HCl, pH 8 fraction, an about 98-kD protein and an about 109-kD protein were

25 identified in the 0.3 M Tris-HCl, pH 8 fraction.

The fraction described above that was eluted using 0.3 M Tris-HCl, pH 8 was concentrated in a Centriprep 30 concentrator and then diluted in 20 mM Na-Ac, pH 5.6. The diluted fraction was then applied to a PolyCat A HPLC cation exchange column (available from PolyLC, Columbia, MD). The column was eluted with about

30 10 ml of 20 mM Na-Ac, pH 5.6, and then with about 45 ml of a linear gradient from 0 to 0.5 M NaCl in the 20 mM Na-Ac, pH 5.6 buffer at a flow rate of about 1ml/min. Fractions were collected from the elution procedure and assayed for the presence of

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-69-

high molecular weight proteins using the mite allergic antisera and western blot protocol described above. Fractions containing the high molecular weight proteins were pooled. Trifluoroacetic acid (TFA) was added to a concentration of about 0.05%. The solution was applied to a TSK-Gel TMS-250 C1 reverse phase column (available from TosohHaas, Montgomeryville, PA) that had been pre-equilibrated in 80% solvent A and 20% solvent B. Solvent A was composed of about 0.05% TFA in water and solvent B was composed of about 0.05% TFA in 90% acetonitrile in water. The column was eluted with about 5 ml of 20% solvent B and then with 36 ml of a linear gradient of about 20% to about 70% solvent B at 0.6 ml/min. The proteins eluted from the column were resolved by 12% Tris-Glycine PAGE. The gel was stained with Comassie blue. The stained gel is shown in Fig. 1. Lane 1 contains Mark-12 protein molecular weight markers (available from Novex, San Diego, CA), lane 2 contains the protein eluted from the reverse phase column, and lane 3 contains SeeBlue™ protein molecular weight markers (available from Novex). Two major proteins were identified in the eluant. The molecular weights of the proteins were determined using a BioRad™ Multi-Analyst™/PC Image System (available from BioRad Corp.). The higher molecular weight protein in lane 2 of Fig. 1 was determined to be about 109 kD, referred to herein as mite allergen protein A (mapA). The lower molecular weight protein in lane 2 of Fig. 1 was determined to be about 98 kD, referred to herein as mite allergen protein B (mapB). The purity of the combined proteins was greater than 85% purity, i.e., less than 15% impurities. This purified eluant is referred to herein as the *D. farinae* high molecular weight map (HMW-map) composition.

Example 2

This example describes N-terminal sequencing of proteins in the *D. farinae* HMW-map composition.

Proteins contained in the 0.3 M Tris-HCl, pH 8 fraction obtained as described above in Example 1 were resolved by SDS-PAGE using a 12% Tris-glycine polyacrylamide-SDS gel, followed by coomassie staining. The proteins were blotted onto PVDF, stained with Coomassie R-250 and destained using standard procedures. The proteins corresponding to the about 98 kD and about 109 kD bands were excised and subjected separately to N-terminal amino acid sequencing using techniques known

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-70-

to those skilled in the art. A partial N-terminal amino acid sequence of about 14 amino acids was deduced for both proteins and the sequences were determined to be identical. The N-terminal amino acid sequence is represented herein as SEQ ID NO:1, having the amino acid sequence: Ser Ile Lys Arg Asp His Asn Asp Tyr Ser Lys Asn

5 Pro Met.

The proteins in the *D. fariniae* HMW-map composition were also submitted to proteolytic cleavage in order to obtain internal amino acid sequence data. Specifically, the *D. fariniae* HMW-map composition was cleaved with Endoproteinase Asp-N (available from Boehringer Mannheim Biochemica, Indianapolis, IN) using methods standard in the art. The digested protein was then resolved by HPLC using the method described by Stone et al., Enzymatic Digestion of Proteins and HPLC Peptide Isolation, in A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, PT Matsudaira ed., Academic Press, San Diego, CA. Twelve proteolytic fragments were isolated, that are referred to herein as map(1), map(2), map(3), map(4), map(5), map(6), map(7), map(8), map(9), map(10), map(11) and map(12).

The N-terminal partial amino acid sequence of map(1) was determined to be Asp Tyr Glu Tyr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ala Pro Leu Tyr Lys Arg Pro, also denoted SEQ ID NO:2. The N-terminal partial amino acid sequence of map(2) was determined to be Asp Ile Pro His Pro Thr Asn Ile His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Ser Val Asn Gly Gly, also denoted SEQ ID NO:3. The N-terminal partial amino acid sequence of map(3) was determined to be Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser Pro Pro Gly Phe Ile Val Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser, also denoted SEQ ID NO:4. The N-terminal partial amino acid sequence of map(4) was determined to be Asp Glu Lys Asn Ser Phe Glu Cys Ile Leu Gly Pro, also denoted SEQ ID NO:5. The N-terminal partial amino acid sequence of map(5) was determined to be Asp Ala Phe Glu Pro His Gly Tyr Leu Leu Thr Ala Ala Val Ser Pro Gly Lys, also denoted SEQ ID NO:6. The N-terminal partial amino acid sequence of map(6) was determined to be Asp Lys Gln Asn Tyr Leu Ala Leu Val Arg Glu Leu Lys, also denoted SEQ ID NO:7. The N-terminal partial amino acid sequence of map(7) was determined to be Asp Met Ala Gln Asn Tyr Lys Tyr Arg Gln Gln Phe Ile Gln Ser Val Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg Gln,

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-71-

also denoted SEQ ID NO:8. The N-terminal partial amino acid sequence of map(8) was determined to be Asp Glu Xaa Asn Val Met Xaa Tyr Val Leu Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg, also denoted SEQ ID NO:9, in which Xaa represents any amino acid. The N-terminal partial amino acid sequence of map(9) was determined to be Asp Lys Leu Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Xaa Ser Ile Glu, also denoted SEQ ID NO:10, in which Xaa represents any amino acid. The N-terminal partial amino acid sequence of map(10) was determined to be Asp Ile Pro His Pro Thr Asn Ile His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Ser Val Asn Gly, also denoted SEQ ID NO:11. The N-terminal partial amino acid sequence of map(11) was determined to be Asp Tyr Ala Lys Asn Pro Lys Arg Ile Val Cys Ile Val Gly Thr Glu Gly Val Leu Ser, also denoted SEQ ID NO:12. The N-terminal partial amino acid sequence of map(12) was determined to be Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser Pro Pro Gly He Ile Val Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser, also denoted SEQ ID NO:13. Since the amino acid sequences for map(1), map(2), map(3), map(4), map(5), map(6), map(7), map(8), map(9), map(10), map(11), map(12), and map(13) were generated from a mixture of mapA and mapB proteins, these sequences do not necessarily represent partial sequences of a single protein.

Example 3

This example describes the purification of a 70-kD protein that binds to IgE from dogs known to be allergic to mite allergens.

The fraction described above in Example 1 that was eluted using 0.2 M Tris-HCl, pH 8 was concentrated in a Centriprep 30 concentrator and then diluted in 20 mM Na-Ac, pH 5.6. The diluted protein was then applied to a PolyCat A HPLC cation exchange column. The column was eluted with about 10 ml of 20 mM Na-Ac, pH 5.6, and then with about 45 ml of a linear gradient from 0 to 0.5 M NaCl in the 20 mM Na-Ac, pH 5.6 buffer at a flow rate of about 1 ml/min. Fractions were collected from the elution procedure and assayed for the presence of 70-kD protein using the mite allergic antisera and western blot protocol described above. Fractions containing the 70-kD protein were pooled. Trifluoroacetic acid (TFA) was added to a concentration of about 0.05%. The solution was applied to a TSK-Gel TMS-250 C1 reverse phase column that had been pre-equilibrated in 80% solvent A and 20%

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-72-

solvent B. Solvent A was composed of about 0.05% TFA in water and solvent B was composed of about 0.05% TFA in 90% acetonitrile in water. The column was eluted with about 3 ml of 20% solvent B and then with 36 ml of a linear gradient of about 20% to about 70% solvent B at 0.6 ml/min. An about 70-kD protein of >90% purity was obtained. The about 70-kD protein is referred to herein as mapC.

N-terminal sequence of a region on an SDS-PAGE corresponding to the 70 kD protein (mapC) was obtained as described in Example 2. An N-terminal amino acid sequence of about 21 amino acids was deduced with an 80% confidence level, and is represented herein as SEQ ID NO:33, having the following amino acid sequence: Gln Ser Arg Asp Arg Asn Asp Lys Pro Tyr Xaa Ile Val Lys Lys Lys Lys Lys Ala Leu Asp.

Example 4

This example describes the binding of the *D. farinae* HMW-map composition (i.e., containing mapA and mapB) to canine IgE in dog sera isolated from dogs known to be allergic to mite allergens.

Multiple wells of an Immulon II microtiter plate were coated with about 100 nanograms per well (ng/well) of a *D. farinae* HMW-map composition isolated according to the method described above in Example 1, diluted in CBC buffer. The plate was incubated overnight at 4°C. Following incubation, the *D. farinae* HMW-map composition-containing solution was removed from the plate, and the plate was blotted dry. The plate was then blocked using about 200 μ l/well of 4.0% fetal calf serum contained in phosphate buffered saline (PBS) having 0.05% Tween-20 (PBSTFCS) for about 1 hour at room temperature. The plate was then washed four times with 0.05% Tween-20 in PBS (PBST) using an automatic washer (available from Dynatech, Chantilly, VA). About 100 μ l/well of a 1:10 dilution in PBSTFCS of serum samples isolated from different dogs known to be sensitive to mite allergens in intradermal skin tests were added to the plate. A negative control group of sera was also added to the plate comprising a combination of sera from six dogs that were raised in a barrier facility (available from Harlan Bioproducts, Indianapolis, IN). Some wells did not receive dog sera so that background binding levels could be determined. The plate was incubated for about 1 hour at room temperature and then washed four times with PBST. About 100 μ l/well of a 1:4000 dilution of 40 μ g/ml biotinylated human Fc ϵ R

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-73-

alpha chain protein (produced as described in Frank et al., WO 98/23964, published November 24, 1997) contained in PBSTFCS was added. The plate was incubated for about 1 hour at room temperature and then washed four times with PBST. About 100 μ l of about 0.25 μ g/ml streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (available from Kirkegaard and Perry Laboratories (KPL), Gaithersburg, MD; diluted in PBST) was added to each well that received experimental or control samples. The plates were then incubated for about 1 hour at room temperature and washed four times with PBST. About 100 μ l of TMB substrate (available from KPL), that had been pre-warmed to room temperature, was added to each well. The plate was then incubated for about 10 minutes at room temperature and then about 100 μ l/well of Stop Solution (available from KPL) was added. Optical densities (O.D.) of wells were read on a Spectramax Microtiter Plate (available from Molecular Devices Inc.) reader at 450 nm within 10 minutes of adding the stop solution.

The O.D. readings obtained using the negative control sample and the background wells were 0 O.D. Sera from 5 of 26 mite allergen sensitive dogs generated O.D. readings between about 2,000 O.D. and about 3,200 O.D. Sera from 3 other mite allergen sensitive dogs generated O.D. readings between about 1,000 O.D. and 2,000 O.D. Sera from 3 other mite allergen sensitive dogs generated O.D. readings between about 500 O.D. and 1,000 O.D. Sera from 7 other mite allergen sensitive dogs generated O.D. readings between about 200 O.D. and 500 O.D. Sera from 6 other mite allergen sensitive dogs generated O.D. readings less than 50 O.D. Thus, the results indicate that sera from dogs known to be sensitive to mite allergens contain IgE antibodies that bind specifically to the mapA and mapB proteins of the present invention.

25 Example 5

This example describes the binding of the 70-kD *D. farinae* protein to canine IgE in dog sera isolated from dogs known to be allergic to mite allergens.

Multiple wells of an Immulon II microtiter plate were coated with about 100 ng/well of 70-kD *D. farinae* protein (referred to herein as mapC) isolated according to the method described above in Examples 1 and 3, diluted in CBC buffer. The plate was incubated overnight at 4°C. The plate was blocked and washed using the method

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-74-

described in Example 4. About 100 μ l/well of a 1:10 dilution in PBSTFCS of serum samples isolated from different dogs known to be sensitive to mite allergens in intradermal skin tests were added to the plate. Negative control samples were also added to the plate comprising SPF serum samples (serum from dogs maintained in a barrier facility and therefore never exposed to mite allergens). Some wells did not receive dog sera so that background binding levels could be determined. The plate was incubated for about 1 hour at room temperature and then washed four times with PBST. Biotinylated human Fc ϵ R alpha chain protein was then added and the presence of IgE bound to the plate was detected using the methods described in Example 4.

The O.D. readings obtained using the negative control sample and the background wells were 0 O.D. Sera from 3 of 26 mite allergen sensitive dogs generated O.D. readings between about 1,500 O.D. and about 2,700 O.D. Sera from 5 other mite allergen sensitive dogs generated O.D. readings between about 800 and about 1,500 O.D. Sera from 4 other mite allergen sensitive dogs generated O.D. readings between about 500 O.D. and about 800 O.D. Sera from 6 other mite allergen sensitive dogs generated O.D. readings between about 200 O.D. and 500 O.D. Sera from 8 other mite allergen sensitive dogs generated O.D. readings less than 50 O.D. Thus, the results indicate that sera from dogs known to be sensitive to mite allergens contain IgE antibodies that bind specifically to the mapC protein of the present invention.

Example 6

This example describes the binding of mapA, mapB or mapC proteins to feline IgE in cat sera isolated from cats shown by *in vitro* testing to be hypersensitive to mite allergens.

Multiple wells of an Immulon II microtiter plate were coated with about 100 ng/well of a *D. farinae* HMW-map composition (isolated according to the method described above in Example 1) and 70-kD *D. farinae* protein (isolated according to the method described above in Example 3). Other wells of the plate were coated with 400 ng/well of whole *Dermatophagoidea pteronyssius* extract (available from Greer Laboratories, Inc., Lenoir, NC; concentrated 8-fold prior to use) or whole *D. farinae* extract (available from Miles, Inc., Elkhart, IN). All samples were diluted in CBC

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-75-

buffer. The plates were incubated overnight at 4°C. The plates were blocked and washed using the method described in Example 4. About 100 µl/well of a 1:10 dilution in PBSTFCS of serum samples isolated from different cats known to be sensitive to mite allergens in *in vitro* allergen testing were added to the plate. Sera from seven control cats (#15, #16, #17, #18, #19, #20, and #21), shown not to be sensitive by *in vitro* test to dust mite allergens, were also tested. Some wells did not receive cat sera so that background binding levels could be determined. The plate was incubated for about 1 hour at room temperature and then washed four times with PBST. Biotinylated human FcεR alpha chain protein was then added and the presence of IgE bound to the plate was detected using the methods described in Example 4.

The results are shown below in Table 1. All values represent O.D. values times 1,000. HDM refers to cats that are sensitive to house dust mite allergens (by serological test, i.e. an ELISA to whole *D. farinae* extract).

15 Table 1.

Cat #	HDM	Whole Der p	Whole Der f	mapA and mapB	mapC
1	+	54	173	211	400
2	+	437	454	245	352
3	+	96	88	17	36
4	+	35	179	278	758
5	+	123	23	0	0
6	+	2	10	0	0
7	+	84	321	439	445
8	+	125	333	611	599
9	+	2459	2737	1613	507
10	+	17	0	0	0
11	+	146	347	243	586
12	+	31	100	102	223
13	+	56	171	267	292
14	+	121	146	163	185
15	-	0	0	0	8
16	-	0	0	0	0
17	-	0	0	0	0
18	-	0	0	0	0
19	-	0	0	0	0
20	-	0	0	0	0
21	-	23	0	0	0

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-76-

The results indicate that sera from some of the cats known to be sensitive to mite allergens contain IgE antibodies that bound specifically to the mapA, mapB or mapC proteins of the present invention. In addition, some sera containing IgE that bound to the mapA, mapB or mapC proteins also contain IgE antibodies that bound to whole *D. pteronyssius* extract. The control sera did not contain IgE antibodies that bound to either the mapA, mapB or mapC proteins of the present invention.

Example 7

This example demonstrates the ability of the *D. farinae* HMW-map composition to induce a hypersensitive response in dogs.

10 To determine whether the *D. farinae* HMW-map composition described in Example 1 was capable of inducing an allergic response in animals susceptible to dust mite allergic responses, skin tests were performed on dogs that actively demonstrate clinical signs for dust mite allergy (referred to herein as atopic dogs). Normal dogs include dogs that do not show symptoms of mite allergy but may be susceptible to a mite allergic response. Each dog (i.e., 4 normal and 4 atopic dogs) was shaved in the lateral thorax/abdominal area and intradermally injected in different sites in that area with an about 1:50,000 dilution of *D. farinae* crude extract isolated by the method described in Example 1, with about 2 μg of the purified *D. farinae* HMW-map composition and/or with control solutions, i.e., saline, as a negative control, and a 20 1:1000 dilution of histamine as a positive control. All four normal dogs and all 4 atopic dogs received *D. farinae* whole extract. Three of the normal dogs and 2 of the atopic dogs received the *D. farinae* HMW-map composition. All 8 of the dogs received both the negative and positive control samples. The total volume per injection was 50 microliters (μl), with the compositions and controls being diluted in 25 saline. The injections were administered as single injections.

All injection sites were objectively measured in millimeters (mm) at 15 minutes and scored either (+) or (-) when compared with the control samples. The subjective scoring was performed by Andrew Hillier, D.V.M., at Ohio State University, Columbus, OH. The results are shown in Table 2:

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-77-

Table 2.

	Normal Dog 1	Normal Dog 2	Normal Dog 3	Normal Dog 4	Atopic Dog 1	Atopic Dog 2	Atopic Dog 3	Atopic Dog 4
Whole Extract	+	+	+	-	+	+	-	-
HMW map	+	+	-	n/a	+	-	n/a	n/a
Neg. Control	-	-	-	-	-	-	-	-
5 Histamine	+	+	+	+	+	+	+	+

n/a = not applicable

The results indicate that the *D. farinae* HMW-map composition was capable of inducing an immediate hypersensitive response in dogs including atopic dogs. Thus, the HMW-map composition is sufficiently allergenic to induce a hypersensitive response in dogs including atopic dogs.

Table 3 describes the results of the following experiment. IgE to the HMW-map composition was measured in the serum of three groups of dogs: *D. farinae* allergic (HDM-AD), atopic (to other allergens) but not HDM allergic (AD), and naive dogs using ELISA. These dogs were also tested by intradermal skin test to *D. farinae* whole extract and to the HMW-map composition.

Table 3. Skin test and ELISA data for *D. farinae* whole extract and for HMW-map composition in *D. farinae*-allergic, atopic but not HDM-allergic, and naive dogs.

Dog	Clinical status	Df IDST 1:50,000	Df ELISA	HMW-map IDST Iug	HMW-map ELISA
20 1	HDM-AD	+	1968	+	2876
2	HDM-AD	+	407	-	954
3	HDM-AD	+	3921	+	3465
4	HDM-AD	+	153	+	198
5	HDM-AD	+	1712	+	997
25 6	HDM-AD	+	1833	+	2006
7	HDM-AD	+	4200	+	4200
8	HDM-AD	+	2851	+	3559
9	HDM-AD	+	122	+	209
10	HDM-AD	+	1627	+	566
30 11	HDM-AD	+	1185	+	1307
12	HDM-AD	+	308	+	101
13	HDM-AD	+	341	+	433
14	AD	-	1	-	0

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-78-

Dog	Clinical status	DFIDST 1:50,000	DFELISA	HMW-map IDST 1ug	HMW-map ELISA
15	AD	-	8	-	2
16	AD	ND	66	ND	87
17	Normal	-	24	-	40
18	Normal	-	53	ND	369
19	Normal	-	37	-	21
20	SPF beagle	ND	0	ND	0
21	SPF beagle	ND	6	ND	1

All dogs that were positive by ELISA for whole *D. farinae* extract were also positive for the HMW-map composition allergen. Of the eight dogs that were ELISA negative for whole *D. farinae* extract, 7 of 8 were also negative for the HMW-map composition.

Example 8

This example describes the isolation of nucleic acid molecules encoding a *Der* HMW-map composition of the present invention.

15 *Der* HMW-map composition nucleic acid molecules were identified and isolated as follows.

A. Preparation of a *Dermatophagoides farinae* cDNA Library.

A *Dermatophagoides farinae* cDNA library was prepared as follows. Total RNA was extracted from about 2 grams of flash frozen and pulverized house dust 20 mites, using an acid-guanidinium-phenol-chloroform method similar to that described by Chomzynski et al., 1987, *Anal. Biochem.* 162,156-159. Poly A⁺ selected RNA was separated from the total RNA preparation by oligo-dT cellulose chromatography using the mRNA Purification Kit (available from Pharmacia Biotech, Newark, NJ), according to the method recommended by the manufacturer. A cDNA library was 25 constructed in lambda-Uni-ZAPTM XR vector (available from Stratagene), using Stratagene's ZAP-cDNA Synthesis Kit protocol. Approximately 5 µg of Poly A⁺ RNA was used to produce the *Dermatophadoides farinae* cDNA library.

B. Preparation of PCR primers.

Further N-terminal amino acid sequence analysis was performed according to 30 the methods described above in Example 2. A partial N-terminal amino acid sequence of 34 amino acids was deduced and is represented by SEQ ID NO:24, having the

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-79-

amino acid sequence: Ser Ile Lys Arg Asp His Asn Asp Tyr Ser Lys Asn Pro Met Met
 Ile Val Xaa Tyr Tyr Gly Gly Ser Ser Gly Tyr Gln Ser Xaa Lys Arg Xaa Xaa Thr
 (wherein "Xaa" represents any amino acid residue). The amino acid sequences of SEQ
 ID NO:4 (described above in Example 2) and SEQ ID NO:24 were used to design
 5 synthetic oligonucleotide primers. Sense primer Derf1 derived from SEQ ID NO:24,
 having the nucleotide sequence 5' AAA CGT GAT CAT AAY GAT TAY TCN AAR
 AAY C 3' (wherein Y represents C or T, R represents A or G, and N represents A, C,
 T or G), designated SEQ ID NO: 25 or sense primer Derf2, derived from SEQ ID
 NO:24, having the nucleotide sequence 5' AAA CGT GAT CAT AAY GAT TAY
 10 AGY AAR AAY C 3', designated SEQ ID NO:26, were used in combination with
 antisense primer Derf3 derived from SEQ ID NO:4, having the nucleotide sequence 5'
 CCT TCT TCA CCN ACR ATC AAN CC 3', denoted SEQ ID NO:27, or antisense
 primer Derf4 derived from SEQ ID NO:4, having the nucleotide sequence 5' CCT
 TCT TCA CCN ACR ATG AAN CC 3', denoted SEQ ID NO:28.

15 The foregoing primers were then used to screen the *Der f* cDNA library using
 standard polymerase chain reaction amplification (PCR) techniques. All attempts to
 identify a cDNA that hybridized to the primers failed.

C. Immunoscreening the *D. farinae* cDNA library using anti-*Der* HMW-
 mapcomposition antibodies.

20 Since attempts to isolate a cDNA clone using PCR methods failed, the
 inventors screened the *D. farinae* cDNA library using an antiserum produced as
 follows. Protein isolated according to the method described above in Example 1 was
 used as a source of antigen to generate rabbit polyclonal antibodies, referred to herein
 as anti-*Der* HMW-map composition antibodies. The preparation of rabbit polyclonal
 25 antibodies was carried out using standard techniques.

About 7.5 ml of *Escherichia coli* (XLI Blue, O.D.₆₀₀=0.5) was incubated with
 3.0 x 10⁴ pfu of phage from a *Dermatophagoides farinae* ZAP-cDNA library (1.8 x
 10⁸ pfu/ml), at 37°C for 15 min and plated in 30 ml Luria-Bertani (LB) medium agar
 plates (150 mm). The plates were incubated at 37°C over night. Each plate was then
 30 overlaid with an IPTG (10 mM) treated nitrocellulose filter for about 4 hours at 37°C.
 The filters were then removed and washed with Tris buffered saline (pH 7.5)

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-80-

containing 0.1% Tween (TBST), for 5 minutes. The filters were blocked with a solution of 1% dried powder milk, 1% BSA, 2% goat serum and 0.15% gelatin, prepared in TBST, for 2 hours at room temperature. Filters were then incubated with the anti-*Der* HMW-map composition antibodies at a dilution of 1:1000, contained in the above blocking solution at 4°C, overnight. The mixture was then incubated with a donkey anti-rabbit IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (available from Jackson ImmunoResearch, West Grove, PN) for 2 hours at room temperature. All of the filters were washed with blocking solution contained in TBST (3 x 15 min/wash) between each incubation. All of the filters were then treated to a final wash in Tris buffered saline (pH 7.5) for 5 minutes at room temperature. Immunocomplexed plaques were identified by immersing the filters into the developing solution (TMB Peroxidase Substrate/TMB Peroxidase Solution/TMB Membrane Enhancer from Kirkegaard & Perry Laboratories) at 1/1/0.1 volume ratio to produce a color reaction. One hundred and twenty three plaques were identified and 50 plaques were further plaque purified two more times under the same immunoscreening condition as described above.

D. PCR screening of purified phage plugs

The phage plugs identified in the foregoing immunoscreening study were then further analyzed by PCR amplification using the primers described above in section 8B. DNA from the 50 plaques was amplified using a mixture of the 4 primers identified by SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 and SEQ ID NO:28. PCR amplification was conducted using standard techniques. One resulting PCR amplification product comprised a fragment of about 700 nucleotides. The PCR product was cloned into the InVitrogen, Corp., TA™ cloning vector (procedures provided by InVitrogen, Corp.) and subjected to DNA sequence analysis using standard techniques. The phagemid from the purified phage that were determined to contain sequences encoded in the 700-bp PCR product were rescued and subjected to DNA sequence analysis using standard techniques.

A clone was isolated that included about a 1752-nucleotide insert, referred to herein as nDorf98₁₇₅₂. Nucleic acid sequence was obtained using standard techniques from nDorf98₁₇₅₂, to yield a *Dermatophagoides farinae* nucleic acid molecule named

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-81-

nDorf98₁₇₅₂ composed of a coding strand having nucleic acid sequence SEQ ID NO:14 and a complementary strand having a nucleic acid sequence SEQ ID NO:16. Translation of SEQ ID NO:14 suggests that nucleic acid molecule nDorf98₁₇₅₂ encodes a full-length flea protein of about 555 amino acids, referred to herein as PDorf98₅₅₅, having amino acid sequence SEQ ID NO:15, assuming an open reading frame in which the first codon spans from nucleotide 1 through nucleotide 3 of SEQ ID NO:14 and a stop codon spanning from nucleotide 1666 through nucleotide 1668 of SEQ ID NO:14. The amino acid sequence of PDorf98₅₅₅ is encoded by the nucleic acid molecule nDorf98₁₆₆₅, having a coding strand with the nucleic acid sequence SEQ ID NO:17 and a complementary strand with the nucleic acid sequence SEQ ID NO:19. PDorf98₅₅₅, also represented by SEQ ID NO:18, has an estimated molecular weight of about 63.2 kD and an estimated pI of about 5.33. Analysis of SEQ ID NO:15 suggests the presence of a signal peptide spanning from about amino acid 1 through about amino acid 19. The proposed mature protein, denoted herein as PDorf₃₃₆, contains about 536 amino acids, the sequence of which is represented herein as SEQ ID NO:21, and is encoded by a nucleic acid molecule referred to herein as nDorf98₁₆₀₈, represented by SEQ ID NO:20, the coding strand, and SEQ ID NO:22, the complementary strand. The amino acid sequence of flea PDorf98₃₃₆ (i.e. SEQ ID NO:21) predicts that PDorf98₃₃₆ has an estimated molecular weight of 61.2 kD, and an estimated pI of about 5.26.

Comparison of amino acid sequence SEQ ID NO:15 with amino acid sequences reported in GenBank indicates that SEQ ID NO:15 showed the most homology, i.e., about 42% identity, with a chitinase protein from *Anopheles gambiae* (GenBank accession number 2654602). Comparison of nucleic acid sequence SEQ ID NO:17 with nucleic acid sequences reported in GenBank indicates that SEQ ID NO:17 showed the most homology, i.e., about 58% identity between SEQ ID NO:17 and *Chelonus sp.* venom chitinase mRNA (GenBank accession number U10422).

Example 9

This example describes the purification of a 60-kD protein that binds to IgE from dogs known to be allergic to mite allergens and partial amino acid sequences derived from this 60-kD protein.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-82-

A. Purification of a 60 kD protein

D. farinae extract was prepared and fractionated on a Sephacryl S-100 column according to the methods described above in Example 1. Fractions were collected from the Sephacryl S-100 column after the excluded peak (fractions 29 through 35) and were pooled. The pooled fractions were then diluted 1:1 with 10 mM Tris-HCl, pH 8, and applied to a Q-sepharose column and fractions obtained using the methods described above in Example 1. The fraction that eluted in 0.4 M Tris-HCl was concentrated and further purified through a TMS 250 reverse phase HPLC column using the methods described above in Example 1. The proteins in the fractions were resolved by 14% Tris-glycine SDS-PAGE using similar methods described for resolution of proteins on the 12% gel in Example 1. The stained gel is shown in Fig. 2. A protein was identified having a molecular weight of about 60 kD (Fig. 2, lane 4) of about 90% purity that eluted at about 50% B (.05%TA in 90% acetonitrile). The molecular weight of the denoted 60-kd protein was estimated to be 56.11 kd using the BioRad Multi-Analyst/PC Version 1.1 program and Mark-12 protein molecular weight markers. The about 60-kd protein is referred to herein as mapD protein.

B. Partial N-terminal and internal sequence obtained from the 60-kd protein

The eluted protein from Part A, above, was blotted onto PVDF, which was stained with Coomassie R-250 and destained using standard procedures. The protein corresponding to the about 60-kd band was excised and subjected to N-terminal amino acid sequencing using techniques known to those skilled in the art. A partial N-terminal amino acid sequence of about 25 amino acids was deduced for the protein and the amino acid sequence, represented herein as SEQ ID NO:23, was determined to be: Xaa Leu Glu Pro Lys Thr Val Cys Tyr Tyr Glu Ser Trp Val His His Arg Gln Gly Glu Gly Lys Met Asp Pro (wherein Xaa refers to any amino acid).

The protein corresponding to the 60 kd region was also submitted to proteolytic cleavage in order to obtain internal amino acid sequence data. Digestion of the 60-kd protein and reverse-phase chromatography were carried out as described in Example 1. Four proteolytic fragments were isolated and sequenced, and are referred to herein as map(13), map(14), map(15), and map(16).

The N-terminal partial amino acid sequence of map(13) was determined to be Gln Tyr Gly Val Thr Gln Ala Val Val Thr Gln ProAla, also denoted SEQ ID NO:29.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-83-

The N-terminal partial amino acid sequence of map(14) was determined to be Asp Glu Leu Leu Met Lys Ser Gly Pro Gly Pro, also denoted SEQ ID NO:30. The N-terminal partial amino acid sequence of map(15) was determined to be Asp Met Glu His Phe Thr Gln His Lys Gly Asn Ala Lys Ala Met Ile Ala Val Gly Gly Ser Thr Met Ser, also denoted SEQ ID NO:31. The N-terminal partial amino acid sequence of map(16) was determined to be Asp Ala Asn Glu Glu Ala Arg Ser Gln Leu Pro Glu Thr Ala Met Val Leu Ile Lys Ser Gln, denoted SEQ ID NO:32.

Example 10.

This example describes the isolation and sequencing of nucleic acid molecules encoding a portion of the *D. farinae* 60 kD (mapD) allergen.

A *D. farinae* library was prepared as described previously in Example 8. A degenerate synthetic oligonucleotide primer was designed from the N-terminal amino acid sequence deduced for *D. farinae* 60 kD-protein (SEQ ID NO:23): Primer 1, a sense primer corresponding to amino acid residues from about 3 through about 11 of SEQ ID NO:23 has the sequence 5' GAACCAAAA CHGTNTGYTA YTAYG 3', also known as SEQ ID NO:46, where H represents A or C or T, N represents A or C or G or T, and Y represents C or T. PCR amplification of fragments from the *D. farinae* library was conducted using standard techniques. A PCR amplification product was generated using a combination of SEQ ID NO:46 (primer 1) and the M13 forward universal primer 5'GTAAAACGACG GCCAGT 3', denoted SEQ ID NO:47.

A second, nested PCR reaction was carried out on the products of the first PCR reaction. A synthetic oligonucleotide was synthesized that corresponded to a region spanning from about amino acid residue 1 through amino acid residue 10 of the 60-kD protein internal amino acid sequence, SEQ ID NO:31. This primer, primer 2, has the nucleic acid sequence 5' GATATGGAAC ATTTYACHCA ACAYAARGG 3', denoted SEQ ID NO:48, where R represents A or G. A PCR amplification product was generated using the combination of primer 2, SEQ ID NO:48, and the T7 standard primer, 5' GTAATACGAC TCACTATAGG GC 3', denoted SEQ ID NO:49. The resultant PCR product was subjected to DNA sequence analysis using standard techniques.

-84-

The PCR product was sequenced and found to contain 510 nucleotides, and is known as nDerf60₅₁₀. The nucleotide sequence of the coding strand of nDerf60₅₁₀ is represented herein as SEQ ID NO:43, and its complement is denoted SEQ ID NO:45. Translation of SEQ ID NO:43 suggests that nDerf60₅₁₀ encodes a partial *D. farinae* 60-
5 kD protein of about 170 amino acids, referred to herein as PDerf60₁₇₀, with an amino acid sequence denoted SEQ ID NO:44, assuming an open reading frame in which the first codon spans from about nucleotide 1 through nucleotide 3 of SEQ ID NO:43, and the last codon spanning from about nucleotide 508 through about nucleotide 510 of SEQ ID NO:43. PDerf60₁₇₀ has an estimated molecular weight of 19.2 kD and an
10 estimated pI of about 6.51.

Nucleic acid molecule nDerf60₅₁₀ was used as a probe to isolate a nucleic acid molecule that encodes a protein corresponding to a full-length, or larger partial *D. farinae* 60-kD protein. Using procedures described previously in Example 8, the whole *D. farinae* library was screened with the nucleic acid SEQ ID NO:43
15 radiolabeled with ³²P using standard techniques. Hybridization was done in 6X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS, 100 mg/ml ssDNA, at 55°C, for about 36 hours. The filters were washed 3 times, for 30 minutes per wash, at 55°C in 2X SSC, 0.2% SDS, followed by a final wash of about 30 minutes in 0.2X SSC, 0.2% SDS.

PCR amplification was carried out on the primary phage plugs. Primer 1, denoted as SEQ ID NO:46, and T7 standard primer, denoted as SEQ ID NO:49, were used as the primers, and a PCR product was generated. Preliminary sequence analysis of this 1.6 kilobase PCR product showed that it represents a nucleic acid sequence that contains the complete sequence encoding the PDerf60 full-length protein.
20

Comparison of PDerf60₁₇₀, the amino acid sequence of SEQ ID NO:44, with amino acid sequences reported in GenBank indicates that PDerf60₁₇₀ showed the most homology, i.e. about 39% identity, with a chitinase protein precursor from *Aphanodidium album*. (GenBank accession number P32470). Nucleic acid sequence SEQ ID NO:43 showed no significant homology to any of the sequences submitted to GenBank.
25

Example 11

This example describes the isolation of nucleic acid molecules encoding *Dermatophagoides pteronyssius* 98 kD allergen protein.

Nucleic acid molecules with high homology to the *D. farinae* 98 kD allergen (map B) were isolated from a *D. pteronyssius* cDNA library by hybridization with a 32-P labeled cDNA encoding the *D. farinae* HMW-map composition.

A *D. pteronyssius* cDNA library was prepared as follows. Total RNA was extracted from approximately 2 grams of *D. pteronyssius* mites, using an acid-guanidium-phenol-chloroform method, described by Chomzynski et al., 1987, *Anal. Biochem* 162: pp 156-159. Poly A+ selected RNA was separated from the total RNA preparation by oligo-dT cellulose chromatography using the mRNA Purification Kit (available from Pharmacia, Newark, NJ), according to the method recommended by the manufacturer. A whole *D. pteronyssius* cDNA library was constructed in lambda-
10 Uni-ZAP™ XR vector (available from Stratagene, La Jolla, CA), using Stratagene's ZAP-cDNA Synthesis Kit protocol. Approximately 5 milligram (mg) of Poly A+
15 RNA was used to produce the *D. pteronyssius* cDNA library.

Using a modification of the protocol described in the cDNA Synthesis Kit (available from Stratagene), the whole *D. pteronyssius* cDNA library was screened, using duplicate plaque lifts, with a 32P-labeled cDNA encoding the *D. farinae* 97 kD
20 Map B allergen, i.e. SEQ ID NO:17. Hybridization was done in 6X SSC (for recipe see Sambrook, et al., *ibid.*), 5X Denhardt's solution (for recipe see Sambrook, et al., *ibid.*), 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) (available from Sigma), and 100 mg/ml of single stranded DNA (available from Sigma), at 55°C, for about 36 hours. The filters were washed 3 times, for about 30 minutes per wash, at 55°C, in 2X SSC, 0.2% SDS,
25 followed by a final wash of about 30 minutes, at 55°C, in 0.2X SSC, 0.2% SDS. A plaque purified clone of the *D. pteronyssius* nucleic acid molecule encoding the *D. pteronyssius* 97 kD allergen (map B) was converted into a double stranded recombinant molecule using the ExAssist™ helper phage and SOLR™ E. coli according to the *in vivo* excision protocol described in the ZAP-cDNA Synthesis Kit
30 (all available from Stratagene). The plasmid containing the *D. pteronyssius* clone was subjected to DNA sequence analysis using standard techniques. DNA sequence

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-86-

analysis, including the determination of molecular weight and isoelectric point (pI) was performed using the GCG™ program.

A clone was isolated that included an about 1621-nucleotide insert, which includes the full-length coding region, referred to herein as nDerp98₁₆₂₁, with a coding strand represented as SEQ ID NO:34 and a complementary strand represented as SEQ ID NO:36. The apparent start and stop codons span from nucleotide 14 through nucleotide 16, and from nucleotide 1541 through nucleotide 1543, respectively, of SEQ ID NO:34. A putative polyadenylation signal (5' AATAAA 3') is located in a region spanning from nucleotide 1584 to 1589 of SEQ ID NO:34.

10 Translation of SEQ ID NO:34 yields a protein of about 509 amino acids, denoted PDerp98₅₀₉, the amino acid sequence of which is presented as SEQ ID NO:35. The nucleic acid molecule consisting of the coding region encoding PDerp98₅₀₉ is referred to herein as nDerp98₁₅₂₇, the nucleic acid sequence of which is represented as SEQ ID NO:37 (the coding strand), and SEQ ID NO:39 (the complementary strand).

15 The amino acid sequence of PDerp98₅₀₉, also represented herein as SEQ ID NO:38, has an estimated molecular weight of about 58.9 kD and an estimated pI of about 5.61. Analysis of PDerp98₅₀₉ suggests the presence of a signal peptide spanning from about amino acid 1 through about amino acid 19. The proposed mature protein, denoted herein as PDerp98₄₉₀, contains about 490 amino acids, and is represented herein as

20 SEQ ID NO:41. The amino acid sequence of PDerp98₄₉₀ predicts the protein to have an estimated molecular weight of about 56.8 kD, and an estimated pI of about 5.49, as well as two asparagine-linked glycosylation sites extending from about amino acid 115 to about amino acid 117, and extending from about amino acid 240 to amino acid 242, respectively. The nucleic acid molecule encoding PDerp98₄₉₀ is known as nDerp98₁₄₇₀,

25 with a coding strand represented by SEQ ID NO:40 and a complementary strand represented by SEQ ID NO:42.

A BLAST search was performed as described previously. PDerp98₅₀₉, SEQ ID NO:35, showed the highest homology at the amino acid level with the *Manduca sexta* chitinase (SwissProt accession number p36362), with about a 34% identity.

30 nDerp98₁₆₂₁, SEQ ID NO:34, showed the highest homology at the nucleic acid level to *Chelonus sp.* chitinase (accession number U10422), with about a 49% identity.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-87-

Comparison of cDNA regions corresponding to the coding regions for the *D. farinae* 98 kD allergen protein and the cDNA regions corresponding to the coding regions for the *D. pteronyssius* 98 kD allergen protein shows an identity of about 84%.

Example 14.

5 This example demonstrates the binding of the *D. farinae* HMW-map composition to human IgE in human sera isolated from humans known to be allergic to mite allergens.

A technique called RAST, or radio-allergo-absorbent test, was used because the amount of human IgE present in human sera is quite low. RAST was essentially performed as described in Aalberse, RC et al., (1981) *J. Allergy Clin Immunol.* 68: pp 10 356-364. To calculate the unit IU/ml, a standard curve was derived by performing RAST with several dilutions of a well-characterized chimeric human/mouse IgE monoclonal antibody against Derp2, (human IgE/monoclonal anti-Derp2, following the procedure of Schuurman, et al. (1997) *J Allergy Clin Immunol.* 99: pp 545-550).

15 Briefly, 50 μ g of the HMW-map composition, purified as described in Example 1, was coupled to 50 mg of CNBr-activated Sepharose 4B (available from Pharmacia, Piscataway, NJ), according to the manufacturer's protocols. Human sera were selected (17 different samples, total) on the basis of a positive RAST for whole mite *D. farinae* extracts, a positive RAST number is greater than 1 IU/ml). Two 20 negative (less than 0.3 IU) control sera were also included.

To test each individual serum sample, 0.5 mg of the *D. farinae* HMW-map composition-coupled Sepharose was incubated with 50 μ l serum in a total volume of 300 μ l of PBS-T (Phosphate buffered saline with added 0.1% volume/volume Tween-20, available from Sigma). Incubation was overnight at 27°C, with shaking. After 25 incubation, the coupled Sepharose was washed five times with PBS-T. Radiolabelled (¹²⁵Iodine) sheep anti-human IgE, made by standard radioiodination protocols, (diluted in PBS-T with 4.5% bovine serum and 0.5% sheep serum, v/v) in a total volume of 750 μ l, was added and incubated overnight at 27°C. After incubation, the coupled Sepharose was washed four times with PBS-T and counted in a gamma- 30 counter to determine the amount of radiolabeled sheep anti-human IgE bound to the HMW-map composition-coupled Sepharose. The results are shown in Table 4.

Table 4. Binding of human IgE to HMW-map composition from *D. farinae*

Serum number	RAST, <i>D. farinae</i> whole extract, IU	RAST, HMW-map comp's'n., IU
1445	> 100	48
1456	>100	42
5 1458	21.1	0.5
1460	14.1	2.5
1463	37.6	0.1
1464	37.2	2.0
1465	14.5	0.7
10 1466	89.9	7.7
1468	>100	19.9
1471	31.9	0.8
1491	23.8	1.0
1496	25.3	3.6
15 1505	5.1	0.2
1523	1.0	<0.1
1529	1.2	0.7
1530 (control)	0.2	<0.1
1531 (control)	0.1	<0.1

20 Almost 75% of patients (11 of 15) who showed sensitivity to *D. farinae* whole mite extracts were sensitive to the HMW-map composition antigen, implying that the HMW-map composition antigen is a major antigen for *D. farinae* sensitive humans. Sensitivity to the HMW-map composition was defined as a RAST of greater than or equal to 0.5 IU.

25 Example 15.

This example demonstrates that the *D. farinae* HMW-map composition described in Example 1 includes a glycoprotein.

30 About (5.4 μ g) of a *D. farinae* HMW-map composition prepared in accordance with Example 1 was applied to SDS PAGE and electrophoresis was done according to standard techniques. The protein was blotted to a nitrocellulose membrane according to standard techniques, and glycoprotein was detected using the DIGTM Glycine

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-89-

Detection Kit (available from Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), using the manufacturer's protocol. The region corresponding to the HMW-map region showed a positive reaction with the kit, indicating that the HMW-map composition includes a glycoprotein.

5 Example 16.

This example shows that the *D. farinae* HMW-map composition retains its character as an allergen even when the amino acid residues are removed, both by chemical and enzymatic means. The results suggest that the main epitope(s) could be a carbohydrate epitope including a polysaccharide attached to an N-linked or O-linked glycosylation site on the HMW-map composition.

10

A. Protein elimination by chemical means (β -elimination of proteins)

Twelve μg (microgram) of HMW-map composition (purified as described in Example 1) was dissolved in 100 μl (microliter) of distilled deionized water. To this mixture was added 5 μl 10 M (molar) NaOH and 3.8 mg (milligram) NaBH₄ (available from Sigma) to give a final concentration of 0.5 M NaOH and 1 M NaBH₄. This reaction mixture was heated at 50°C for 30 minutes, then cooled, and 100 μl acetone was added. To this mixture, sufficient amount, i.e. approximately 150 μl , of Dowex 50 (H+) (available from Pharmacia) was added to make the solution slightly acidic. The Dowex 50 adsorbed and removed the protein, leaving any sugar moieties in the supernatant. The mixture was centrifuged in a microcentrifuge and washed three times with 100 μl of water. The combined supernatants from the centrifugations were evaporated to dryness, then washed five times from a methanol:HCl solution (1000:1 v/v), evaporating to dryness after each wash, to remove salts. The mixture was dissolved in 100 μl of water, and a portion (20 μl) was analyzed by SDS-PAGE using standard techniques, and both Coomassie blue and Silver staining were used to determine the amount of protein in the chemically treated samples. No protein was detected by either Coomassie or Silver staining, indicating removal of protein. Any sugar moieties on the protein would be unaffected by these conditions.

20
25
30
The remainder of the residue from each sample was subjected to ELISA analysis as described in Example 4. Briefly, 100 ng of either the β -eliminated sample or of non- β -eliminated sample of the HMW-map composition was coated onto the

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-90-

Immulsion plates, and ELISAs were carried out as described in Example 4 with a *D. farinae* sensitive dog sera pool, a *D. farinae* sensitive cat sera pool, and various individual dog sera that are either *D. farinae* sensitive or not sensitive (as measured by ELISA). The results are shown in Table 5.

- 5 Table 5. Reactivity of dog and cat sera to HMW-map composition and to β -eliminated HMW-map composition (which is carbohydrate only)

Sera used	β -eliminated HMW-map-OD (carbohydrate antigen)	untreated HMW-map comp's'n., OD X 10 ³
<i>D. farinae</i> dog pool	1233	1931
10 <i>D. farinae</i> cat pool	2837	3115
dog 162LA	15	0
dog 1621C	24	21
dog 1621S	59	420
dog 1626C	23	214
15 dog SPF-2	16	0

Results from Table 5 indicate that the β -eliminated HMW-map composition sample still retains the ability to bind IgE from dog and cat sera that is sensitive to *D. farinae* HMW-map composition, indicating that the glycans attached to the protein constitute a major epitope of the HMW-map composition allergen protein.

- 20 B. Protein Elimination by enzymatic means.

14 μ g of HMW-map composition (purified as described in Example 1) was digested with 1 μ g Endoproteinase K, available from Sigma, to remove the protein moiety of the molecule. The digestion reaction took place at 56°C for 24 hours, after which the endoproteinase in the reaction was heat-denatured in boiling water for 10

- 25 minutes.

A portion of this reaction was analyzed by SDS-PAGE using standard techniques, and both Coomassie blue and Silver staining were used to detect the presence of protein in the enzymatically digested samples. No HMW-map composition was detected by either Coomassie or Silver staining, indicating

30 elimination of the HMW-map composition. Any glycan that was attached via a glycosylation site on the protein would be unaffected by these conditions.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-91-

The remainder of the enzymatically digested reaction was tested by ELISA in the manner described in Example 4. Briefly, 100 ng of either the proteinase-K-digested sample or of a non-digested sample of the HMW-map composition was coated onto Immulon plates, and ELISAs were carried out as described in Example 4 with various individual dog sera that were either *D. farinae* sensitive or not sensitive (as measured by ELISA). The results are shown in Table 6.

Table 6. Reactivity of dog sera to HMW-map composition and to Endoproteinase-K digested HMW-map composition.

dog #	<i>D. farinae</i> sensitive?	OD ₄₅₀ wells coated with HMW-map comp'n.	OD ₄₅₀ wells coated with Proteinase K digested HMW-map	
10	1	yes	120	122
	2	yes	1637	1561
	3	yes	858	383
	4	yes	914	509
	5	yes	277	227
15	6	yes	2891	2636
	7	no	10	11
	8	yes	4056	3880
	9	yes	1920	1626
	10	yes	472	432
20	11	yes	328	213
	12	yes	2913	2530
	13	yes	1232	984
	14	yes	3153	2355
	15	no	6	46
25	16	yes	860	339
	17	yes	2429	750
	18	yes	1194	351
	19	yes	2655	1443
	20	yes	3285	1207
30	21	yes	2636	1240
	22	yes	1097	848
	23	yes	1621	1408
	24	yes	2113	1592
	25	yes	1169	408
35	26	yes	4200	4200
	27	yes	4200	4200

-92-

dog #	<i>D. farinae</i> sensitive ¹	OD, wells coated with HMW-map comp'n.	OD, wells coated with Proteinase K digested HMW-map
28	yes	3222	2932
29	yes	2468	2118
30	yes	3339	2454
31	no	0	4

5 ¹ by ELISA in a separate experiment

Results from Table 6 indicate that the proteinase-K digested HMW-map composition sample still retains the ability to bind IgE from dog and cat sera that is sensitive to *D. farinae* HMW-map composition, suggesting that the glycans attached to the protein constitute a major epitope on the HMW-map composition.

10 Example 17

This example describes attempts to remove N-linked glycans from the HMW-map composition.

HMW-map composition (2 μ g), purified as in Example 1, was digested with N-glycosidase F (available from Boehringer-Mannheim), according to the manufacturer's directions. The digestion was analyzed by SDS-PAGE and stained according to standard protocols. 2 μ g Fetuin (available from Sigma) was used as a positive N-linked glycosylated protein control. Analysis of the SDS-PAGE showed that there were no apparent differences in the molecular weights of the intact and digested map B protein. The positive control, fetuin, did show a reduction of molecular weight after digestion with N-glycosidase F. This result indicates that there are no N-linked glycans on the HMW-map composition, or alternatively that there are only small sized N-glycans on the HMW-map composition.

Example 18

25 This example describes the isolation and sequencing of a nucleic acid molecule encoding the full length *Dermatophagoides farinae* 60 kD allergen.

This nucleic acid molecule was isolated from a *Dermatophagoides farinae* cDNA library by its ability to hybridize with a ³²P-labeled cDNA encoding a portion of the *Dermatophagoides farinae* 60 kD allergen described in Example 10.

30 A *Dermatophagoides farinae* cDNA library was prepared as follows. Total RNA was extracted from approximately 2 grams of *D. farinae* mites, using an acid-

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-93-

guanidinium-phenol-chloroform method similar to that described by Chomzynski et al., 1987, *Anal. Biochem.* 162,156-159. Poly A⁺ selected RNA was separated from the total RNA preparation by oligo-dT cellulose chromatography using the mRNA Purification Kit (available from Pharmacia Biotech, Newark, NJ), according to the method recommended by the manufacturer. A whole mite cDNA library was constructed in lambda-Uni-ZAPTM XR vector (available from Stratagene), using Stratagene's ZAP-cDNA Synthesis Kit protocol. Approximately 5 µg of Poly A⁺ RNA was used to produce the *D. farinae* cDNA library.

Using a modification of the protocol described in the cDNA Synthesis Kit, the whole mite cDNA library was screened, using duplicate plaque lifts, with ³²P-labeled cDNA nDerf60₅₁₀. Hybridization was done at 6XSSC, 5X Denhardt's solutions, 0.5 % SDS, 100 mg/ml of ssDNA and, at 52°C, for 18 hr. The filters were washed 2 times, for 30 minutes per wash, at 55°C in 2XSSC, 0.2% SDS, followed by a final wash of 30 minutes in the same buffer except using about 0.2XSSC. A plaque purified clone of the nucleic acid molecules encoding the *D. farinae* 60 kD allergen was converted into a double stranded recombinant molecule, herein denoted as nDerf60₁₄₅₅, using the ExAssistTM helper phage and SOLRTM *E. coli* according to the *in vivo* excision protocol described in the ZAP-cDNA Synthesis Kit (available from Stratagene). Double-stranded plasmid DNA was prepared using an alkaline lysis protocol, such as that described in Sambrook et al., *ibid*.

Example 19

This example describes the sequencing of a *D. farinae* nucleic acid molecule of the present invention.

The plasmid containing nDerf60₁₄₅₅ was sequenced by the Sanger dideoxy chain termination method, using the PRISMTM Ready Dye Terminator Cycle Sequencing Kit with Ampli Taq DNA Polymerase, FS (available from the Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT). PCR extensions were done in the GeneAmpTM PCR System 9600 (available from Perkin-Elmer). Excess dye terminators were removed from extension products using the CentriflexTM Gel Filtration Cartridge (available from Advanced Genetics Technologies Corporation, Gaithersburg, MD) following the manufacturer's standard protocol. Samples were resuspended according to ABI

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-94-

protocols and were run on a Perkin-Elmer ABI PRISM™ 377 Automated DNA Sequencer. DNA sequence analysis, including the compilation of sequences and the determination of open reading frames, was performed using the GCG™ program (available from Genetics Computer Group, Madison, WI). Protein sequence analysis, including the determination of molecular weight and isoelectric point (pI) was performed using the GCG™ program.

An about 1455 nucleotide consensus sequence of the entire nDorf60₁₄₅₅ nucleic acid molecule was determined; the sequences of the two complementary strands are presented as SEQ ID NO:50 (the coding strand) and SEQ ID NO: 52 (the complementary strand). The nDorf60₁₄₅₅ sequence contains a full length coding region. The apparent start and stop codons span nucleotides from 14 through 16 and from 1400 through 1402, respectively, of SEQ ID NO: 50. A putative polyadenylation signal (5' AATAAA 3') is located in a region spanning from about nucleotide 1408-1413 of SEQ ID NO: 50.

Translation of SEQ ID NO: 50 yields a protein of 462 amino acids, denoted PDorf60₄₆₂, the amino acid sequence of which is presented in SEQ ID NO: 51. The nucleic acid molecule consisting of the coding region encoding PDorf60₄₆₂ is referred to herein as nDorf60₁₃₈₆, the nucleic acid sequence of which is represented in SEQ ID NO: 53 (the coding strand) and SEQ ID NO: 54 (the complementary strand). The amino acid sequence of PDorf60₄₆₂ (i.e., SEQ ID NO: 51) predicts that PDorf60₄₆₂ has an estimated molecular weight of about 52.1 kD and an estimated pI of about 5.73. Analysis of SEQ ID NO: 51 suggests the presence of a signal peptide encoded by a stretch of amino acids spanning from amino acid 1 through amino acid 25. The proposed mature protein, denoted herein as PDorf60₄₃₇, contains about 437 amino acids which is represented herein as SEQ ID NO: 56. The amino acid sequence of PDorf60₄₃₇ (i.e., SEQ ID NO: 56) predicts that PDorf60₄₆₂ has an estimated molecular weight of about 50.0 kD, an estimated pI of about 5.61, and one predicted asparagine-linked glycosylation site extending from amino acids 313 through 315. The nucleic acid molecule encoding the mature protein is denoted SEQ ID NO: 55 and its reverse complement is denoted SE ID NO: 57.

A BLASTp search was performed according to Altschul, et al, (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-410; and Altschul, et al, (1997), *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. The protein search was performed using SEQ ID NO:51, which showed significant homology to chitinase molecules. The highest scoring match of the homology search at the amino acid level was PIR accession number A53918: *Chelonus sp.* chitinase precursor, which was about 32% identical with SEQ ID NO:51. At the nucleotide level, the search was performed using SEQ ID NO:53, which did not show significant similarity to any sequences in the database. Sequence analysis was performed using the GCG GAP program as described above.

10 Example 20

This example further describes the characterization of the *D. farinae* HMW-map composition (also referred to as Der f 15).

Nucleic acid molecule nDerf98₁₇₅₂ of Example 8 was inserted into appropriate expression vectors and expressed in *E. coli* and *P. pastoris*. When the resulting protein, PDerf98₃₅₅ was expressed in *E. coli* or *P. pastoris*, sensitized dog sera, produced as described in Example 4, failed to recognize the recombinant protein. This is in contrast to the positive results obtained when the native *D. farinae* HMW-map composition of Example 1 (also referred to as native Der f 15) was used; see Example 4.

20 The non-reactivity of the protein expressed in *E. coli* is consistent with the results shown in Example 16, in which it was shown that the native HMW allergens retain their character as allergens, even after the amino acids are removed.

All of these results together suggest that the main epitope(s) are carbohydrate regions of the molecule or some other secondary modification.

25 The antigenicity of the native Der f 15 protein is not lost after periodate treatment; generally carbohydrate epitopes are destroyed by periodate except for those further substituted with additional groups or those having an unusual sugar with no geminal hydroxyl groups.

30 The native Der f 15 antigen was analyzed for carbohydrate content. A substantial amount of carbohydrate was found, about 30% by weight. Specifically, mannose constituted approximately 2.8% by weight of the antigen; galactose

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-96-

approximately 23.2%; glucose approximately 4.3% (the presence of glucosyl residue must be considered tentative as glucose often contaminates glycoprotein samples); and HexNAc at detectable levels; further investigation revealed that the HexNAc were GlcNAc and GalNAc.

5 The native Der f 15 protein was treated with base in the presence of NaBH₄ and analyzed by a P-4 sizing chromatography. O-linked oligosaccharides present in Der f 15 were found to void the column. This result is consistent with either very large O-linked oligosaccharides or the presence of acidic groups on the oligosaccharides such as sulfate. Attempts to determine the presence or absence of sulfate more directly gave
10 ambiguous results.

Der f 15 was treated at pH 4, pH 5, and pH 7 overnight at 37° C. The resulting samples were then probed with antibody to the protein or dog serum known to be reactive with Der f 15. In the samples treated at pH 5 and pH 7, all of the dog antiserum epitope was destroyed, but in the samples treated at pH 4, some activity
15 remained. The anti-Der f 15 antibody shows that the molecular weight of Der f 15 was decreased at all pH's with some original material left at pH 4, as though deglycosylation was occurring. It is not known whether this change was self catalyzed by the Der f 15 protein or occurred chemically; while not being bound by theory, it is believed that self catalysis was involved since the loss of the epitope occurred under
20 such mild conditions.

Example 21

This example describes the binding of several house dust mite (HDM) allergens to feline IgE in cat serum.

The allergen profile of the IgE response of cats to house dust mites appears to
25 be different from that of dogs. An examination of the results of IgE testing on cat sera submitted to Heska's Veterinary Diagnostic Laboratories (VDL) in January 2000 shows that 40% of all allergen-specific IgE positive cats had anti-HDM IgE. All the cats were positive to both *D. farinae* and *D. pteronyssinus*. Eighty-eight sera known to be positive for *D. farinae* were assayed by ELISA on highly purified preparations of
30 Der f 1, Der f 2, Der f 15, and the 60 kD allergen. In this assay, 32% of the cats were

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-97-

positive for Der f 1, 42% were positive for Der f 2, 68% were positive for Der f 15, and 86% were positive for the 60 kD allergen.

While various embodiments of the present invention have been described in detail, it is apparent that modifications and adaptations of those embodiments will
5 occur to those skilled in the art. It is to be expressly understood, however, that such modifications and adaptations are within the scope of the present invention, as set forth in the following claims.

What is claimed is:

1. An isolated nucleic acid molecule selected from the group consisting of:
 - (a) a nucleic acid molecule comprising at least about 150
5 nucleotides, wherein said nucleic acid molecule comprising at least about 150 nucleotides hybridizes, in a solution comprising 1X SSC and 0% formamide, at a temperature of about 50°C, to a nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, and a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:33 and a complement thereof; and
 - (b) a nucleic acid molecule comprising a fragment of any of said nucleic acid molecules of (a) wherein said fragment comprises at least about 15
15 nucleotides.
2. The nucleic acid molecule of Claim 1, wherein said nucleic acid molecule comprises a nucleic acid sequence that encodes a *Der* HMW-map protein.
3. The nucleic acid molecule of Claim 1, wherein said nucleic acid molecule is selected from the group consisting of nDerf98₁₇₃₂, nDerf98₁₆₆₅, nDerf98₁₆₀₈,
20 nDerp98₁₆₂₁, nDerp98₁₅₂₇, nDerp98₁₄₇₀, and nDerf60₅₁₀.
4. The nucleic acid molecule of Claim 1, wherein said nucleic acid molecule is selected from the group consisting of:
 - (a) a nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17,
25 SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45; and
 - (b) a nucleic acid molecule comprising an allelic variant of a nucleic acid molecule of (a).
- 30 5. The nucleic acid molecule of Claim 1, wherein said nucleic acid molecule is selected from the group consisting of:

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-99-

- (a) a nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence that encodes a protein having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, and SEQ ID NO:44; and
- (b) a nucleic acid molecule comprising an allelic variant of a nucleic acid molecule encoding a protein having an amino acid sequence of (a).
6. A recombinant molecule comprising a nucleic acid molecule according to Claims 1-5.
7. A recombinant virus comprising a nucleic acid molecule according to Claims 1-5.
8. A recombinant cell comprising a nucleic acid molecule according to Claims 1-5.
9. An isolated protein encoded by a nucleic acid molecule selected from the group consisting of:
- (a) a nucleic acid molecule comprising at least about 150 nucleotides, wherein said nucleic acid molecule comprising at least about 150 nucleotides hybridizes, in a solution comprising 1X SSC and 0% formamide, at a temperature of about 50°C, to a nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:45, and a complement of a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33; and
- (b) a nucleic acid molecule comprising a fragment of any of said nucleic acid molecules of (a), wherein said fragment comprises at least about 15 nucleotides.
10. The protein of Claim 9, wherein said protein, when administered to an animal, elicits an immune response against a *Der* HMW-map protein.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-100-

11. The protein of Claim 9, wherein said protein is selected from the group consisting of:
- (a) a protein encoded by a nucleic acid molecule having a nucleic acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:43, and the coding strand of a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33; and
 - (b) a protein encoded by a nucleic acid molecule comprising an allelic variant of a nucleic acid molecule comprising any of said nucleic acid molecules of (a).
12. The protein of Claim 9, wherein said protein is selected from the group consisting of:
- (a) a protein comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, and SEQ ID NO:44; and
 - (b) a protein encoded by an allelic variant of a nucleic acid molecule encoding a protein comprising any of said amino acid sequences of (a).
13. An isolated antibody that selectively binds to a protein as set forth in Claim 9.
14. The protein of Claim 9, wherein said protein selectively binds to IgE.
15. The protein of Claim 9, wherein said protein comprises an epitope having at least one identifying characteristic selected from the group consisting of:
- (a) said epitope is resistant to β -elimination of peptides;
 - (b) said epitope is resistant to Proteinase-K digestion; and
 - (c) said epitope is reactive to a test designed to detect glycosylated proteins, wherein said epitope binds to an IgE selected from the group consisting of canine IgE from dogs allergic to mites and feline IgE from cats allergic to mites.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-101-

16. A therapeutic composition for treating an allergic response to a mite, said therapeutic composition comprising a desensitizing compound selected from the group consisting of:
- (a) an isolated protein according to Claims 9-12;
 - 5 (b) a mimotope of said mite allergenic protein;
 - (c) a mutein of said mite allergenic protein;
 - (d) an isolated nucleic acid molecule according to Claims 1-5;
 - (e) an antibody to said mite allergic protein; and
 - (f) an inhibitor of binding of said mite allergic protein to IgE.
- 10 17. The composition of Claim 16, wherein said composition further comprises a component selected from the group consisting of an excipient, an adjuvant, and a carrier.
18. The composition of Claim 16, wherein said desensitizing compound is a naked nucleic acid molecule.
- 15 19. An assay kit for testing if an animal is susceptible to or has an allergic response to a mite, said kit comprising:
- (a) an isolated protein according to Claims 9-12; and
 - (b) a means for determining if said animal is susceptible to or has said allergic response, wherein said means comprises use of said protein to identify animals susceptible to or having allergic responses to mites.

20 20. A method to identify an animal susceptible to or having an allergic response to a mite, said method comprising:

 - (a) contacting an isolated protein according to Claims 9-12 with antibodies of an animal; and
 - 25 (b) determining immunocomplex formation between said protein and said antibodies, wherein formation of said immunocomplex indicates that said animal is susceptible to or has said allergic response.

21. A method to desensitize a host animal to an allergic response to a mite, said method comprising administering to said animal a therapeutic composition according to Claim 16.

30 22. The method of Claim 21, wherein said protein comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-102-

- NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID
- 5 NO:35, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:41, and SEQ ID NO:44.
23. The method of Claim 21, wherein said therapeutic composition further comprises a component selected from the group consisting of an excipient, an adjuvant and a carrier.
24. A method to produce a mite allergenic protein, said method comprising
- 10 culturing a cell transformed with a nucleic acid molecule selected from the group consisting of: a nucleic acid molecule comprising at least about 150 nucleotides, wherein said nucleic acid molecule comprising at least about 150 nucleotides hybridizes, in a solution comprising 1X SSC and 0% formamide, at a temperature of about 50°C, to a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID
- 15 NO:16, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:45 and a complement of a nucleic acid sequence encoding a protein comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:33; and a nucleic acid molecule comprising a fragment of any of said nucleic acid molecules, wherein said fragment comprises at least about 15 nucleotides.
- 20 25. A reagent comprising a non-proteinaceous epitope having at least one identifying characteristic selected from the group consisting of:
- (a) said epitope is resistant to β -elimination of peptides;
 - (b) said epitope is resistant to Proteinase-K digestion; and
 - (c) said epitope is reactive to a test designed to detect glycosylated
- 25 proteins,
- wherein said epitope binds to an IgE selected from the group consisting of canine IgE from dogs allergic to mites and feline IgE from cats allergic to mites.
26. An isolated antibody that selectively binds to an epitope as set forth in Claim 25.
- 30 27. A therapeutic composition for treating an allergic response to a mite, said therapeutic composition comprising a desensitizing compound comprising the reagent of Claim 25.

WO 02/22807

PCT/US01/28730

-103-

28. An assay kit for testing if an animal is susceptible to or has an allergic response to a mite, said kit comprising the reagent of Claim 25 and a means for determining if said animal is susceptible to or has said allergic response, wherein said means comprises use of said reagent to identify animals susceptible to or having
5 allergic responses to mites.

29. A method to identify an animal susceptible to or having an allergic response to a mite, said method comprising:

(a) contacting the reagent of Claim 25 with antibodies of an animal;
and
10 (b) determining immunocomplex formation between said reagent and said antibodies, wherein formation of said immunocomplex indicates that said animal is susceptible to or has said allergic response.

30. A method to desensitize a host animal to an allergic response to a mite, said method comprising administering to said animal a therapeutic composition
15 comprising a desensitizing compound comprising the reagent of Claim 25.

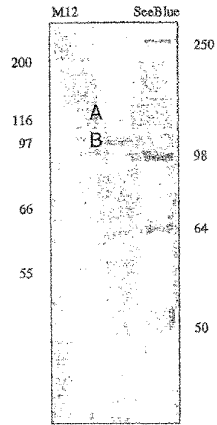


Fig. 1

WO 02/22807

PCT/US01/28730

2/2

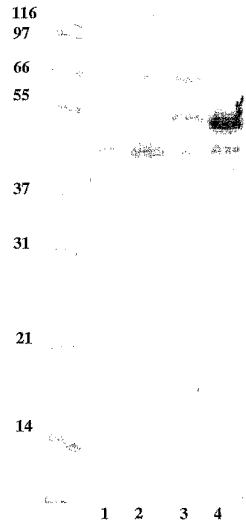


Fig. 2

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Heska Corporation
 McCall, Catherine A.
 Hunter, Shirley Wu
 Weber, Eric R.

<120> NOVEL DERMATOPHAGOIDES NUCLEIC ACID MOLECULES, PROTEINS AND USES
 THEREOF

<130> AL-2-C4-PCT

<140> not yet assigned
 <141> 2001-09-13

<150> 09/662,293
 <151> 2000-09-14

<150> 09/292,225
 <151> 1999-04-15

<150> 60/098,909
 <151> 1998-09-02

<150> 60/085,295
 <151> 1998-05-13

<150> 60/098,565
 <151> 1998-04-17

<150> 09/062,013
 <151> 1998-04-17

<160> 57

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae
 <400> 1
 Ser Ile Lys Arg Asp His Asn Asp Tyr Ser Lys Asn Pro Met
 1 5 10

<210> 2
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae
 <400> 2
 Asp Tyr Glu Tyr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ala Pro Leu
 1 5 10 15

Tyr Lys Arg Pro
 20

<210> 3
 1

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

<211> 20

<212> PRT

<213> Dermatophagoides farinae

<400> 3

Asp Ile Pro His Pro Thr Asn Ile His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Ser
 1 5 10 15

Val Asn Gly Gly
 20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Dermatophagoides farinae

<400> 4

Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser Pro Pro Gly Phe Ile Val Gly Glu Glu
 1 5 10 15

Gly Val Leu Ser
 20

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Dermatophagoides farinae

<400> 5

Asp Glu Lys Asn Ser Phe Glu Cys Ile Leu Gly Pro
 1 5 10

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Dermatophagoides farinae

<400> 6

Asp Ala Phe Glu Pro His Gly Tyr Leu Leu Thr Ala Ala Val Ser Pro
 1 5 10 15

Gly Lys

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Dermatophagoides farinae

<400> 7

Asp Lys Gln Asn Tyr Leu Ala Leu Val Arg Glu Leu Lys
 1 5 10 2

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

<210> 8
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae
 <400> 8
 Asp Met Ala Gln Asn Tyr Lys Tyr Arg Gln Gln Phe Ile Gln Ser Val
 1 5 10 15

Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg Gln
 20

<210> 9
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = any amino acid at position 3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa = any amino acid at position 7

<400> 9
 Asp Glu Xaa Asn Val Met Xaa Tyr Val Leu Tyr Thr Met His Tyr Tyr
 1 5 10 15

Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg
 20

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa = any amino acid at position 14

<400> 10
 Asp Lys Leu Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Xaa Ser Ile
 1 5 10 15

Glu

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

<210> 11
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae

<400> 11

Asp Ile Pro His Pro Thr Asn Ile His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Ser
 1 5 10 15

Val Asn Gly

<210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae

<400> 12

Asp Tyr Ala Lys Asn Pro Lys Arg Ile Val Cys Ile Val Gly Thr Glu
 1 5 10 15

Gly Val

<210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae

<400> 13

Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser Pro Pro Gly Phe Ile Val Gly Glu Glu
 1 5 10 15

Gly Val Leu Ser
 20

<210> 14
 <211> 1752
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides farinae

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1665)
 <223>

<400> 14
 atg aaa acc ata tat gca ata ctt agt att atg gcc tgc att ggc ctt 48
 Met Lys Thr Ile Tyr Ala Ile Leu Ser Ile Met Ala Cys Ile Gly Leu
 1 5 10 15

atg aat gca tcc atc aaa cga gat cat aat gat tat tcg aaa aat ccg 96
 Met Asn Ala Ser Ile Lys Arg Asp His Asn Asp Tyr Ser Lys Asn Pro
 4

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

20	25	30	
atg aga att gtt tgt tat gtt gga aca tgg tcc gta tat cat aaa gtt			144
Met Arg Ile Val Cys Tyr Val Gly Thr Trp Ser Val Tyr His Lys Val			
35	40	45	
gat cca tac act atc gaa gat att gat cca ttc aag tgt aca cat tta			192
Asp Pro Tyr Thr Ile Glu Asp Ile Asp Pro Phe Lys Cys Thr His Leu			
50	55	60	
atg tat ggt ttc gct aaa att gat gaa tac aaa tac aca att oaa gtt			240
Met Tyr Gly Phe Ala Lys Ile Asp Glu Tyr Lys Tyr Thr Ile Gln Val			
65	70	75	80
ttc gat cct tac caa gat gat aac cat aac tca tgg gaa aaa cgt ggt			288
Phe Asp Pro Tyr Gln Asp Asp Asn His Asn Ser Trp Glu Lys Arg Gly			
85	90	95	
tat gaa cgt ttc aac aac ttg cga ttg aag aat cca gaa tta acc acc			336
Tyr Glu Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Lys Asn Pro Glu Leu Thr Thr			
100	105	110	
atg att tca ctt ggt ggt tgg tat gaa ggc tgg gaa aaa tat tcc gat			384
Met Ile Ser Leu Gly Gly Trp Tyr Glu Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp			
115	120	125	
atg gct gca aat cca aca tat cgt caa caa ttc ata caa tca gtt ttg			432
Met Ala Ala Asn Pro Thr Tyr Arg Gln Gln Phe Ile Gln Ser Val Leu			
130	135	140	
gac ttt ttg caa gaa tac aag ttc gac ggt cta gat ttg gat tgg gag			480
Asp Phe Leu Gln Glu Tyr Lys Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu			
145	150	155	160
tat cct gga tct cga ttg ggt aac ccg aaa atc gat aaa caa aac tat			528
Tyr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ile Asp Lys Gln Asn Tyr			
165	170	175	
ttg gct ttg gtt aga gaa ctt aaa gac gct ttt gaa cct cat ggc tac			576
Leu Ala Leu Val Arg Glu Leu Lys Asp Ala Phe Glu Pro His Gly Tyr			
180	185	190	
ttg ttg act gct gca gta tca cca ggt aaa gac aaa atc gac cga gct			624
Leu Leu Thr Ala Ala Val Ser Pro Gly Lys Asp Lys Ile Asp Arg Ala			
195	200	205	
tat gat atc aaa gaa ttg aac aaa ttg ttc gat tgg atg aat gtc atg			672
Tyr Asp Ile Lys Glu Leu Asn Lys Leu Phe Asp Trp Met Asn Val Met			
210	215	220	
aca tat gat tac cac ggt gga tgg gaa aac ttt tac ggt csc aat gct			720
Thr Tyr Asp Tyr His Gly Gly Trp Glu Asn Phe Tyr Gly His Asn Ala			
225	230	235	240
ccg ttg tat aaa cga cca gat gaa act gat gag ttg cac act tac ttc			768
Pro Leu Tyr Lys Arg Pro Asp Glu Thr Asp Glu Leu His Thr Tyr Phe			
245	250	255	
aat gtc aac tac acc atg cac tat tat ttg aac aat ggt gcc acc aga			816
Asn Val Asn Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg			
260	265	270	
gac aaa ttg gta atg ggt gtt cca ttc tat ggc cgt gct tgg agc att			864
Asp Lys Leu Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Trp Ser Ile			
		5	

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

275	280	285	
gaa gat cga agc aaa ctc aaa ctt gga gat cca gcc aaa ggc atg tcg			912
Glu Asp Arg Ser Lys Leu Lys Leu Gly Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser			
290	295	300	
ccc cca ggt ttc att tct ggt gaa gaa ggt gtc ctc tca tat ata gaa			960
Pro Pro Gly Phe Ile Ser Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser Tyr Ile Glu			
305	310	315	320
ttg tgt caa ttg ttt caa aaa gaa gaa tgg cat atc caa tac gat gaa			1008
Leu Cys Gln Leu Phe Gln Lys Glu Glu Trp His Ile Gln Tyr Asp Glu			
325	330	335	
tat tac aat gct cca tat ggt tac aat gat aaa atc tgg gtc ggt tac			1056
Tyr Tyr Asn Ala Pro Tyr Gly Tyr Asn Asp Lys Ile Trp Val Gly Tyr			
340	345	350	
gat gat ctg gcc agt ata tca tgc aag ttg gct ttc ctg aaa gaa tta			1104
Asp Asp Leu Ala Ser Ile Ser Cys Lys Leu Ala Phe Leu Lys Glu Leu			
355	360		
ggc gtt tct ggt gtc atg gtt tgg tca ttg gaa aat gat gat ttc aaa			1152
Gly Val Ser Gly Val Met Val Trp Ser Leu Glu Asn Asp Asp Phe Lys			
370	375	380	
ggt cac tgc gga cag aaa aat cca ttg ttg aac aaa gtt cat aat atg			1200
Gly His Cys Gly Pro Lys Asn Pro Leu Leu Asn Lys Val His Asn Met			
385	390	395	400
att aat ggc gat gaa aag aac tct ttc gaa tgc att ttg ggt cca agt			1248
Ile Asn Gly Asp Glu Lys Asn Ser Phe Glu Cys Ile Leu Gly Pro Ser			
405	410	415	
aca acg aca cca act cca acg acg aca ccc aca acc ccg act aca acg			1296
Thr Thr Thr Pro Thr Pro Thr Thr Thr Pro Thr Thr Pro Thr Thr Thr			
420	425	430	
cca aca act cct tct ccc acc acc ccg aca aca acc cct tct ccc acc			1344
Pro Thr Thr Pro Ser Pro Thr Thr Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr			
435	440	445	
acc ccg aca aca acc cct tct ccc acc aca ccg aca aca act cct tct			1392
Thr Pro Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Thr Thr Pro Thr Thr Pro Ser			
450	455	460	
ccc acc aca cca aca cca aca aca cca aca cca gcc cct aca aca tcg			1440
Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Ala Pro Thr Thr Ser			
465	470	475	480
aca cct tcg cca acc acg acc gaa cac aca agc gaa aca cca aaa tat			1488
Thr Pro Ser Pro Thr Thr Thr Glu His Thr Ser Glu Thr Pro Lys Tyr			
485	490	495	
aca acc tat gtc gat gga cat ctt atc aaa tgt tac aag gaa ggt gat			1536
Thr Thr Tyr Val Asp Gly His Leu Ile Lys Cys Tyr Lys Glu Gly Asp			
500	505	510	
atc cca cat cca acc aat ata cac aaa tat ttg gtc tgt gaa ttt gtt			1584
Ile Pro His Pro Thr Asn Ile His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Phe Val			
515	520	525	
aat ggt ggc tgg tgg gtt cat att atg ccc tgt cca ccg gcc act att			1632
Asn Gly Gly Trp Trp Val His Ile Met Pro Cys Pro Pro Gly Thr Ile			

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

530 535 540

tgg tgt caa gaa aaa ttg act tgt ata ggc gaa taattctgaa aaaaaaatc 1685
 Trp Cys Gln Glu Lys Leu Thr Cys Ile Gly Glu
 545 550 555

aattaaaatt taaaattcaa tttttaatat gaaaaattca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1745
 aaaaaaa 1752

<210> 15
 <211> 555
 <212> - PRT
 <213> Dermatophagoides farinae

<400> 15

Met Lys Thr Ile Tyr Ala Ile Leu Ser Ile Met Ala Cys Ile Gly Leu
 1 5 10 15

Met Asn Ala Ser Ile Lys Arg Asp His Asn Asp Tyr Ser Lys Asn Pro
 20 25 30

Met Arg Ile Val Cys Tyr Val Gly Thr Trp Ser Val Tyr His Lys Val
 35 40 45

Asp Pro Tyr Thr Ile Glu Asp Ile Asp Pro Phe Lys Cys Thr His Leu
 50 55 60

Met Tyr Gly Phe Ala Lys Ile Asp Glu Tyr Lys Tyr Thr Ile Gln Val
 65 70 75 80

Phe Asp Pro Tyr Gln Asp Asp Asn His Asn Ser Trp Glu Lys Arg Gly
 85 90 95

Tyr Glu Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Lys Asn Pro Glu Leu Thr Thr
 100 105 110

Met Ile Ser Leu Gly Gly Trp Tyr Glu Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp
 115 120 125

Met Ala Ala Asn Pro Thr Tyr Arg Gln Gln Phe Ile Gln Ser Val Leu
 130 135 140

Asp Phe Leu Gln Glu Tyr Lys Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu
 145 150 155 160

Tyr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ile Asp Lys Gln Asn Tyr
 165 170 175

Leu Ala Leu Val Arg Glu Leu Lys Asp Ala Phe Glu Pro His Gly Tyr
 180 185 190

7

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Leu Leu Thr Ala Ala Val Ser Pro Gly Lys Asp Lys Ile Asp Arg Ala
195 200 205

Tyr Asp Ile Lys Glu Leu Asn Lys Leu Phe Asp Trp Met Asn Val Met
210 215 220

Thr Tyr Asp Tyr His Gly Gly Trp Glu Asn Phe Tyr Gly His Asn Ala
225 230 235 240

Pro Leu Tyr Lys Arg Pro Asp Glu Thr Asp Glu Leu His Thr Tyr Phe
245 250 255

Asn Val Asn Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg
260 265 270

Asp Lys Leu Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Trp Ser Ile
275 280 285

Glu Asp Arg Ser Lys Leu Lys Leu Gly Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser
290 295 300

Pro Pro Gly Phe Ile Ser Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser Tyr Ile Glu
305 310 315

Leu Cys Gln Leu Phe Gln Lys Glu Glu Trp His Ile Gln Tyr Asp Glu
325 330 335

Tyr Tyr Asn Ala Pro Tyr Gly Tyr Asn Asp Lys Ile Trp Val Gly Tyr
340 345 350

Asp Asp Leu Ala Ser Ile Ser Cys Lys Leu Ala Phe Leu Lys Glu Leu
355 360 365

Gly Val Ser Gly Val Met Val Trp Ser Leu Glu Asn Asp Asp Phe Lys
370 375 380

Gly His Cys Gly Pro Lys Asn Pro Leu Leu Asn Lys Val His Asn Met
385 390 395 400

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

Thr Thr Thr Pro Thr Pro Thr Thr Thr Pro Thr Thr Pro Thr Thr Thr
420 425 430

Pro Thr Thr Pro Ser Pro Thr Thr Pro Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr
435 440 445

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Thr Pro Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Thr Pro Thr Thr Thr Pro Ser
 450 455 460

Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Ala Pro Thr Thr Ser
 465 470 475 480

Thr Pro Ser Pro Thr Thr Thr Glu His Thr Ser Glu Thr Pro Lys Tyr
 485 490 495

Thr Thr Tyr Val Asp Gly His Leu Ile Lys Cys Tyr Lys Glu Gly Asp
 500 505 510

Ile Pro His Pro Thr Asn Ile His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Phe Val
 515 520 525

Asn Gly Gly Trp Trp Val His Ile Met Pro Cys Pro Pro Gly Thr Ile
 530 535 540

Trp Cys Gln Glu Lys Leu Thr Cys Ile Gly Glu
 545 550 555

<210> 16
 <211> 1752
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides farinae

<400> 16
 tttttttttt tttttttttt ttttttttga atttttcata ttasaaattg aattttaaat 60
 ttttaattgaa tttttttttc agaattattc gcctatacaa gtcaattttt ctgacacca 120
 aatagtgcc ccgtygacagg gcataatatg aaccaccag ccaccattaa caaattca 180
 gacaaatat ttgttatat tggttgatg tgggataca ccttcottgt aacattgat 240
 aagatgccca tcgacatagg ttgtatattt tggtgtttcg cttgtgtgtt cggtcgtgt 300
 tggcgaaggt gtcgatgttg tagggctgg tggtgtgtt gttggtgtg gtgtgtgtg 360
 agaaggagtt gttgtcgtg tggtgggaga aggggttgtt gtcgggtgg tgggagaag 420
 ggtgtgttc ggggtggtg gagaaggagt tgttggcgtt gtatcgggg ttgtggtgt 480
 cgtcgttga gttggtgctg ttgtacttgg acccaaatg cattcgaag agttcttttc 540
 atgcacatta atcatattat gaactttgtt caacaatgga tttttcggtc cgcagtgacc 600
 ttgaaatca tcattttcca atgaccaaac catgacacca gaaacgcta attctttcag 660
 gaaagcaaac ttgcatgata tactggccag atcatogtaa ccgaccaga tttttatcatt 720
 gtaaccatat ggagcattgt aatattcctc gtattggata tgccattctt ctttttgaaa 780
 caattgacac aattctatat atgagaggac accttattca ccagaatga aacctggggg 840

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AI-2-C4-PCT.ST25.txt
 cgacatgacct ttggctggat ctccaagttt gagtttgctt cgatcttcaa tgcctcaagc 900
 acggccatag aatggaacac ccattaccac tttgtctctg gtggcaccat tgttcaata 960
 atagtgcacg gtgtagtga cattgaagta agtgtgcaac tcatcagttt catctggctg 1020
 ttatacaac ggagcattgt gaccgtaaaa gttttcccat coaccgtggt aatcatatgt 1080
 catgacattc atccaatcga acaatttgtt caattctttg atatcataag ctoggtcgat 1140
 ttgtcttta cclggtgata ctgcagcagt caacaagtag coatgaggtt caaagcgtc 1200
 ttaagtctt ctaaccaaaag ccaaatagtt ttgtttatcg attttcgggt taccoaatcg 1260
 agatccagga tactccaat ccaaatctag accgtogaac ttgtattctt gcaaaaagtc 1320
 caaaactgat tgtatgaatt gttgacgata tgttggattt gcagccatat cggaaatatt 1380
 ttccgagcct tcataccaac caccaagtga aatcatgggt gtttaattctg gattcttcaa 1440
 tcgcaagttg ttgaaacgtt cataaccacg tttttcccat gatttatggt tcatccttg 1500
 gtaaggatcg aaaacttgaa ttgtgtattt gtattcatca attttagcga aaccatacat 1560
 taaagtgtga cacttgaatg gatcaatctc ttcgatagtg tatggatcaa ctttatgata 1620
 tacggaccat gttccaacat aacaacaat tctcatcgga tttttcgaat aatcattatg 1680
 atctcgtttg atggatgcat tcatcaggcc aatgcaggcc ataatactaa gtattgcata 1740
 tatggttttc at 1752

<210> 17
 <211> 1665
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides farinae

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1665)
 <223>

<400> 17
 atg aaa acc ata tat gca ata ctt agt att atg gcc tgc att ggc ctt 48
 Met Lys Thr Ile Tyr Ala Ile Leu Ser Ile Met Ala Cys Ile Gly Leu
 1 5 10 15
 atg aat gca tcc atc aaa cga gat cat aat gat tat tgc aaa aat ccg 96
 Met Asn Ala Ser Ile Lys Arg Asp His Asn Asp Tyr Ser Lys Asn Pro
 20 25 30
 atg aga att gtt tgt tat gtt gga aca tgg tcc gta tat cat aaa gtt 144
 Met Arg Ile Val Cys Tyr Val Gly Thr Trp Ser Val Tyr His Lys Val
 35 40 45
 gat cca tac act atc gaa gat att gat cca ttc aag tgt aca cat tta 192
 Asp Pro Tyr Thr Ile Glu Asp Ile Asp Pro Phe Lys Cys Thr His Lew
 50 55 60
 atg tat ggt ttc gct aaa att gat gaa tac aaa tac aca att caa gtt 240
 Met Tyr Gly Phe Ala Lys Ile Asp Glu Tyr Lys Tyr Thr Ile Gln Val
 65 70 75 80

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

ttc gat cct tac caa gat gat aac cat aac tca tgg gaa aaa cgt ggt      288
Phe Asp Pro Tyr Gln Asp Asp Asn His Asn Ser Trp Glu Lys Arg Gly
85                                     90                                     95

tat gaa cgt ttc aac aac ttg cga ttg aag aat cca gaa tta acc acc      336
Tyr Glu Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Lys Asn Pro Glu Leu Thr Thr
100                                    105                                    110

atg att tca ctt ggt ggt tgg tat gaa ggc tgg gaa aaa tat tcc gat      384
Met Ile Ser Leu Gly Gly Trp Tyr Glu Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp
115                                    120                                    125

atg gct gca aat cca aca tat cgt caa caa ttc ata caa tca gtt ttg      432
Met Ala Ala Asn Pro Thr Tyr Arg Gln Gln Phe Ile Gln Ser Val Leu
130                                    135                                    140

gac ttt ttg caa gaa tac aag ttc gac ggt cta gat ttg gat tgg gag      480
Asp Phe Leu Gln Glu Tyr Lys Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Asp
145                                    150                                    155

tat cct gga tct cga ttg ggt aac ccg aaa atc gat aaa caa aac tat      528
Tyr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ile Asp Lys Glu Asn Tyr
165                                    170                                    175

ttg gct ttg gtt aga gaa ctt aaa gac gct ttt gaa cct cat gcc tac      576
Leu Ala Leu Val Arg Glu Leu Lys Asp Ala Phe Glu Pro His Gly Tyr
180                                    185                                    190

ttg ttg act gct gca gta tca cca ggt aaa gac aaa atc gac cga got      624
Leu Leu Thr Ala Ala Val Ser Pro Gly Lys Asp Lys Ile Asp Arg Ala
195                                    200                                    205

tat gat atc aaa gaa ttg aac aaa ttg ttc gat tgg atg aat gtc atg      672
Tyr Asp Ile Lys Glu Leu Asn Lys Leu Phe Asp Trp Met Asn Val Met
210                                    215                                    220

aca tat gat tac cac ggt gga tgg gaa aac ttt tac ggt cac aat gct      720
Thr Tyr Asp Tyr His Gly Gly Trp Glu Asn Phe Tyr Gly His Asn Ala
225                                    230                                    235

ccg ttg tat aaa cga cca gat gaa act gat gag ttg cac act tac ttc      768
Pro Leu Tyr Lys Arg Pro Asp Glu Thr Asp Glu Leu His Thr Tyr Phe
245                                    250                                    255

aat gtc aac tac acc atg cac tat tat ttg aac aat ggt gcc acc aga      816
Asn Val Asn Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg
260                                    265                                    270

gac aaa ttg gta atg ggt gtt cca ttc tat ggc cgt gct tgg agc att      864
Asp Lys Leu Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Trp Ser Ile
275                                    280                                    285

gaa gat cga agc aaa ctc aaa ctt gga gat cca gcc aaa ggc atg tgg      912
Glu Asp Arg Ser Lys Leu Lys Leu Gly Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser
290                                    295                                    300

ccc cca ggt ttc att tct ggt gaa gaa ggt gtc ctc tca tat ata gaa      960
Pro Pro Gly Phe Ile Ser Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser Tyr Ile Glu
305                                    310                                    315

ttg tgt caa ttg ttt caa aaa gaa gaa tgg cat atc caa tac gat gaa      1008
Leu Cys Gln Leu Phe Gln Lys Glu Glu Trp His Ile Gln Tyr Asp Glu
325                                    330                                    335

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

tat tac aat gct cca tat ggt tac aat gat aaa atc tgg gtc ggt tac 1056
 Tyr Tyr Asn Ala Pro Tyr Gly Tyr Asn Asp Lys Ile Trp Val Gly Tyr
 340 345 350
 gat gat ctg gcc agt ata tca tgc aag ttg gct ttc ctg aaa gaa tta 1104
 Asp Asp Leu Ala Ser Ile Ser Cys Lys Leu Ala Phe Leu Lys Glu Leu
 355 360 365
 ggc gtt tct ggt gtc atg gtt tgg tca ttg gaa aat gat gat ttc aaa 1152
 Gly Val Ser Gly Val Met Val Trp Ser Leu Glu Asn Asp Asp Phe Lys
 370 375 380
 ggt cac tgc gga cgg aaa aat cca ttg ttg aac aaa gtt cat aat atg 1200
 Gly His Cys Gly Pro Lys Asn Pro Leu Leu Asn Lys Val His Asn Met
 385 390 395 400
 att aat ggc gat gaa aag aac tct ttc gaa tgc att ttg ggt cca agt 1248
 Ile Asn Gly Asp Glu Lys Asn Ser Phe Glu Cys Ile Leu Gly Pro Ser
 405 410 415
 aca acg aca cca act cca acg acg aca ccc aca acc cgg act aca acg 1296
 Thr Thr Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Thr Pro Thr Thr Thr
 420 425 430
 cca aca act cct tct ccc acc acc cgg aca aca acc cct tct ccc acc 1344
 Pro Thr Thr Pro Ser Pro Thr Thr Pro Thr Thr Pro Ser Pro Thr
 435 440 445
 acc cgg aca aca acc cct tct ccc acc aca cgg aca aca act cct tct 1392
 Thr Pro Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Thr Pro Thr Thr Pro Ser
 450 455 460
 ccc acc aca cca aca cca aca aca cca aca cca gcc cct aca aca tcy 1440
 Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Ala Pro Thr Thr Ser
 465 470 475 480
 aca cct tcy cca acc acg acc gaa cac aca agc gaa aca cca aaa tat 1488
 Thr Pro Ser Pro Thr Thr Thr Glu His Thr Ser Glu Thr Pro Lys Tyr
 485 490 495
 aca acc tat gtc gat gga cat ctt atc aaa tgt tac aag gaa ggt gat 1536
 Thr Thr Tyr Val Asp Gly His Leu Ile Lys Cys Tyr Lys Glu Gly Asp
 500 505 510
 atc cca cat cca acc aat ata cac aaa tat ttg gtc tgt gaa ttt gtt 1584
 Ile Pro His Pro Thr Asn Ile His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Phe Val
 515 520 525
 aat ggt ggc tgg tgg gtt cat att atg ccc tgt cca cgg ggc act att 1632
 Asn Gly Gly Trp Trp Val His Ile Met Pro Cys Pro Pro Gly Thr Ile
 530 535 540
 tgg tgt caa gaa aaa ttg act tgt ata ggc gaa 1665
 Trp Cys Glu Glu Lys Leu Thr Cys Ile Gly Glu
 545 550 555

<210> 18
 <211> 555
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae
 <400> 18

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Met Lys Thr Ile Tyr Ala Ile Leu Ser Ile Met Ala Cys Ile Gly Leu
1 5 10 15

Met Asn Ala Ser Ile Lys Arg Asp His Asn Asp Tyr Ser Lys Asn Pro
20 25 30

Met Arg Ile Val Cys Tyr Val Gly Thr Trp Ser Val Tyr His Lys Val
35 40 45

Asp Pro Tyr Thr Ile Glu Asp Ile Asp Pro Phe Lys Cys Thr His Leu
50 55 60

Met Tyr Gly Phe Ala Lys Ile Asp Glu Tyr Lys Tyr Thr Ile Gln Val
65 70 75 80

Phe Asp Pro Tyr Gln Asp Asp Asn His Asn Ser Trp Glu Lys Arg Gly
85 90 95

Tyr Glu Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Lys Asn Pro Glu Leu Thr Thr
100 105 110

Met Ile Ser Leu Gly Gly Trp Tyr Glu Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp
115 120 125

Met Ala Ala Asn Pro Thr Tyr Arg Gln Gln Phe Ile Gln Ser Val Leu
130 135 140

Asp Phe Leu Gln Glu Tyr Lys Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu
145 150 155 160

Tyr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ile Asp Lys Gln Asn Tyr
165 170 175

Leu Ala Leu Val Arg Glu Leu Lys Asp Ala Phe Glu Pro His Gly Tyr
180 185 190

Leu Leu Thr Ala Ala Val Ser Pro Gly Lys Asp Lys Ile Asp Arg Ala
195 200 205

Tyr Asp Ile Lys Glu Leu Asn Lys Leu Phe Asp Trp Met Asn Val Met
210 215 220

Thr Tyr Asp Tyr His Gly Gly Trp Glu Asn Phe Tyr Gly His Asn Ala
225 230 235 240

Pro Leu Tyr Lys Arg Pro Asp Glu Thr Asp Glu Leu His Thr Tyr Phe
245 250 255

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Asn Val Asn Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg
260 265 270

Asp Lys Leu Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Trp Ser Ile
275 280 285

Glu Asp Arg Ser Lys Leu Lys Leu Gly Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser
290 295 300

Pro Pro Gly Phe Ile Ser Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser Tyr Ile Glu
305 310 315 320

Leu Cys Gln Leu Phe Gln Lys Glu Glu Trp His Ile Gln Tyr Asp Glu
325 330 335

Tyr Tyr Asn Ala Pro Tyr Gly Tyr Asn Asp Lys Ile Trp Val Gly Tyr
340 345 350

Asp Asp Leu Ala Ser Ile Ser Cys Lys Leu Ala Phe Leu Lys Glu Leu
355 360 365

Gly Val Ser Gly Val Met Val Trp Ser Leu Glu Asn Asp Asp Phe Lys
370 375 380

Gly His Cys Gly Pro Lys Asn Pro Leu Leu Asn Lys Val His Asn Met
385 390 395 400

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

Thr Thr Thr Pro Thr Thr Thr Thr Pro Thr Thr Pro Thr Thr Thr
420 425 430

Pro Thr Thr Pro Ser Pro Thr Thr Pro Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr
435 440 445

Thr Pro Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Thr Pro Thr Thr Thr Pro Ser
450 455 460

Pro Thr Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Ala Pro Thr Thr Ser
465 470 475 480

Thr Pro Ser Pro Thr Thr Thr Glu His Thr Ser Glu Thr Pro Lys Tyr
485 490 495

Thr Thr Tyr Val Asp Gly His Leu Ile Lys Cys Tyr Lys Glu Gly Asp
500 505 510

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Ile Pro His Pro Thr Asn Ile His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Phe Val
 515 520 525

Asn Gly Gly Trp Trp Val His Ile Met Pro Cys Pro Pro Gly Thr Ile
 530 535 540

Trp Cys Gln Glu Lys Leu Thr Cys Ile Gly Glu
 545 550 555

<210> 19

<211> 1665

<212> DNA

<213> Dermatophagoides farinae

<400> 19

```

ttcgctata caagtcatt ttcttgaca ccaaatagtg cccggtggac agggcataat 60
atgaaccac cagccacat taacaaattc acagaccasa tatttgtgta tattggttg 120
atgtgggata tcaccttctt tgtaacattt gataagatgt ccatacgacat aggttgata 180
ttttggtgtt tcgcttgtgt gttcggctgt ggttggcgaa ggtgtcgatg ttgtaggggc 240
tggtgttggg gttgttgggt ttggtgtggt gggagaagga gttgttctcg gtgtgttggg 300
agaaggggtt gttgtcgggg tggtgggaga aggggttgtt gtcggggtgg tgggagaagg 360
agttgttggc gttgtagtcg ggttgtggg gtcgtcgtt ggaattgggt tcglttgaact 420
tggaccocaaa atgcattcga aagagttcct ttcctcgcca ttaatcata: tatgaacttt 480
gttcaacaat ggatttttctg gtccgcagtg acctttgaaa tcatcatttt ccaatgacca 540
aaccatgaca ccagaaacgc ctaattcttt cgggaaagcc aacttgcag atatactggc 600
cagatcatcg taaccgacco agattttatc attgtaacca tatggagcat tgtaataatc 660
atcgtattgg atatgccatt ctctcttttg aaacaattga cacaattcta tatatgagag 720
gacaccttct tcaccagaaa tgaaacctgg gggcgacatg cctttggctg gatctccaag 780
tttgagtttg ctctgatctt caatgtcca agcacggcca tagaatggaa caccattac 840
caatttgtct ctggtggcac cattgttcaa ataatagtc atggtgtagt tgacattgaa 900
gtaagtytgc aactcatcag ttcatctgg tcgtttatac aacggagcat tgtgaccgta 960
aaagtittcc catccacgtt ggtaatcata tgcctgaca ttcattcaat cgaacaattt 1020
gttcaattct ttgatatcat aagctcggtc gattttgtct ttacctgggt atactgcagc 1080
agtcaacaag tagccatgag gttcaaaagc gctttaagt tctctaacca aagcacaata 1140
gtttgttta tcgattttct ggttaccocaa tcgagatcca ggatactccc aatcacaatc 1200
tagaccgtcg aacttgtatt ctgcacaaa gtccaaaact gattgtatga attgttgacg 1260
atatgttggg tttgcagoca tctcgaata tttttccgag cttcatacc aaccaccaag 1320
tgaatcatg gttgtaatt ctggattcct caatcgaag ttgttgaac gttcataacc 1380

```

15

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

acgtttttcc catgagttat ggttatcacc ttggttaagga tcgaaaactt gaattgtgta 1440
tttgtattca tcaatttttag cgaaaccata cattaatgt gtacacttga atggatcaat 1500
atcttggata gtgtatggat caactttatg atatacggac catgttccaa cataacaac 1560
aattctcacc ggatttttcc aataatcatt atgatctcgt ttgatggatg cattcataag 1620
gccaatgcag gccataatac taagtattgc atatatggtt ttcac 1665

```

```

<210> 20
<211> 1608
<212> DNA
<213> Dermatophagoides farinae

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1608)
<223>

```

```

<400> 20
tcc atc aaa cga gat cat aat gat tat tgc aaa aat cag atg aga att 48
Ser Ile Lys Arg Asp His Asn Asp Tyr Ser Lys Asn Pro Met Arg Ile
1 5 10 15
gtt tgt tat gtt gga aca tgg tcc gta tat cat aaa gtt gat cca tac 96
Val Cys Tyr Val Gly Thr Trp Ser Val Tyr His Lys Val Asp Pro Tyr
20 25 30
act atc gaa gat att gat cca ttc aag tgt aca cat tta atg tat ggt 144
Thr Ile Glu Asp Ile Asp Pro Phe Lys Cys Thr His Leu Met Tyr Gly
35 40 45
ttc gct aaa att gat gaa tac aaa tac aca att caa gtt ttc gat cct 192
Phe Ala Lys Ile Asp Glu Tyr Lys Tyr Thr Ile Gln Val Phe Asp Pro
50 55 60
tac caa gat gat aac cat aac tca tgg gaa aaa cgt ggt tat gaa cgt 240
Tyr Gln Asp Asp Asn His Asn Ser Trp Glu Lys Arg Gly Tyr Glu Arg
65 70 75 80
ttc aac aac ttg cga ttg aag aat cca gaa tta acc acc atg att tca 288
Phe Asn Asn Leu Arg Leu Lys Asn Pro Glu Leu Thr Thr Met Ile Ser
85 90 95
ctt ggt ggt tgg tat gaa ggc tgc gaa aaa tat tcc gat atg gct gca 336
Leu Gly Gly Trp Tyr Glu Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp Met Ala Ala
100 105 110
aat cca aca tat cgt caa caa ttc ata caa tca gtt ttg gac ttt ttg 384
Asn Pro Thr Tyr Arg Gln Gln Phe Ile Gln Ser Val Leu Asp Phe Leu
115 120 125
caa gaa tac aag ttc gac ggt cta gat ttg gat tgg gag tat cct gga 432
Gln Glu Tyr Lys Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly
130 135 140
tct cga ttg ggt aac cag aaa atc gat aaa caa aac tat ttg gct ttg 480
Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ile Asp Lys Gln Asn Tyr Leu Ala Leu
145 150 155

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AI-2-C4-PCT.ST25.txt

```

ggt aga gaa ctt aaa gac gct ttt gaa cct cat ggc tac ttg ttg act 528
Val Arg Glu Leu Lys Asp Ala Phe Glu Pro His Gly Tyr Leu Leu Thr
165 170 175

gct gca gta tca cca ggt aaa gac aaa atc gac cga gct tat gat atc 576
Ala Ala Val Ser Pro Gly Lys Asp Lys Ile Asp Arg Ala Tyr Asp Ile
180 185 190

aaa gaa ttg aac aaa ttg ttc gat tgg atg aat gtc atg aca tat gat 624
Lys Glu Leu Asn Lys Leu Phe Asp Trp Met Asn Val Met Thr Tyr Asp
195 200 205

tac cac ggt gga tgg gaa aac ttt tac ggt cac aat gct cgg ttg tat 672
Tyr His Gly Gly Trp Glu Asn Phe Tyr Gly His Asn Ala Pro Leu Tyr
210 215 220

aaa cga cca gat gaa act gat ggg ttg cac act tac ttc aat gtc aac 720
Lys Arg Pro Asp Glu Thr Asp Glu Leu His Thr Tyr Phe Asn Val Asn
225 230 235

tac acc atg cac tat tat ttg aac aat ggt gcc acc aga gac aaa ttg 768
Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg Asp Lys Leu
245 250 255

gta atg ggt gtt cca ttc tat ggc cgt gct tgg agc att gaa gat cga 816
Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Trp Ser Ile Glu Asp Arg
260 265 270

agc aaa ctc aaa ctt gga gat cca gcc aaa ggc atg tgc ccc cca ggt 864
Ser Lys Leu Lys Leu Gly Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser Pro Pro Gly
275 280 285

ttc att tct ggt gaa gaa ggt gtc ctc tca tat ata gaa ttg tgt caa 912
Phe Ile Ser Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser Tyr Ile Glu Leu Cys Gln
290 295 300

ttg ttt caa aaa gaa gaa tgg cat atc caa tac gat gaa tat tac aat 960
Leu Phe Gln Lys Glu Glu Trp His Ile Gln Tyr Asp Glu Tyr Tyr Asn
305 310 315

gct cca tat ggt tac aat gat aaa atc tgg gtc ggt tac gat gat ctg 1008
Ala Pro Tyr Gly Tyr Asn Asp Lys Ile Trp Val Gly Tyr Asp Asp Leu
325 330 335

gcc agt ata tca tgc aag ttg gct ttc ctg aaa gaa tta ggc gtt tct 1056
Ala Ser Ile Ser Cys Lys Leu Ala Phe Leu Lys Glu Leu Gly Val Ser
340 345 350

ggt gtc atg gtt tgg tca ttg gaa aat gat gat ttc aaa ggt cac tgc 1104
Gly Val Met Val Trp Ser Leu Glu Asn Asp Asp Phe Lys Gly His Cys
355 360 365

gga ccg aaa aat cca ttg ttg aac aaa gtt cat aat atg att aat ggc 1152
Gly Pro Lys Asn Pro Leu Leu Asn Lys Val His Asn Met Ile Asn Gly
370 375 380

gat gaa aag aac tct ttc gaa tgc att ttg ggt cca agt aca acg aca 1200
Asp Glu Lys Asn Ser Phe Glu Cys Ile Leu Gly Pro Ser Thr Thr Thr
385 390 395

cca act cca acg acg aca ccc aca acc ccg act aca acg cca aca act 1248
Pro Thr Pro Thr Thr Thr Pro Thr Thr Pro Thr Thr Thr Pro Thr Thr
405 410 415

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

cct tct ccc acc acc ccg aca aca acc cct tct ccc acc acc ccg aca 1296
 Pro Ser Pro Thr Thr Pro Thr Thr Pro Thr Thr Pro Ser Pro Thr Thr Pro Thr
 420 425 430

aca acc cct tct ccc acc aca ccg aca aca act cct tct ccc acc aca 1344
 Thr Thr Pro Ser Pro Thr Thr Pro Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Thr Thr
 435 440 445

cca aca cca aca aca cca aca cca gcc cct aca aca tcg aca cct tcg 1392
 Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Ala Pro Thr Thr Ser Thr Pro Ser
 450 455 460

cca acc acg acc gaa cac aca agc gaa aca cca aaa tat aca acc tat 1440
 Pro Thr Thr Thr Thr Glu His Thr Ser Glu Thr Pro Lys Tyr Thr Thr Tyr
 465 470 475 480

gtc gat gga cat ctt atc aaa tgt tac aag gaa ggt gat atc cca cat 1488
 Val Asp Gly His Leu Ile Lys Cys Tyr Lys Glu Gly Asp Ile Pro His
 485 490 495

cca acc aat ata cac aaa tat ttg gtc tgt gaa ttt gtt aat ggt ggc 1536
 Pro Thr Asn Ile His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Phe Val Asn Gly Gly
 500 505 510

tgg tgg gtt cat att atg ccc tgt cca ccg gcc act att tgg tgt caa 1584
 Trp Trp Val His Ile Met Pro Cys Pro Pro Gly Thr Ile Trp Cys Gln
 515 520 525

gaa aaa ttg act tgt ata gcc gaa 1608
 Glu Lys Leu Thr Cys Ile Gly Glu
 530 535

<210> 21
 <211> 536
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae

<400> 21

Ser Ile Lys Arg Asp His Asn Asp Tyr Ser Lys Asn Pro Met Arg Ile
 1 5 10 15

Val Cys Tyr Val Gly Thr Trp Ser Val Tyr His Lys Val Asp Pro Tyr
 20 25 30

Thr Ile Glu Asp Ile Asp Pro Phe Lys Cys Thr His Leu Met Tyr Gly
 35 40 45

Phe Ala Lys Ile Asp Glu Tyr Lys Tyr Thr Ile Gln Val Phe Asp Pro
 50 55 60

Tyr Gln Asp Asp Asn His Asn Ser Trp Glu Lys Arg Gly Tyr Glu Arg
 65 70 75 80

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

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Leu Gly Gly Trp Tyr Glu Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp Met Ala Ala
100 105 110

Asn Pro Thr Tyr Arg Gln Gln Phe Ile Gln Ser Val Leu Asp Phe Leu
115 120 125

Gln Glu Tyr Lys Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly
130 135 140

Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ile Asp Lys Gln Asn Tyr Leu Ala Leu
145 150 155 160

Val Arg Glu Leu Lys Asp Ala Phe Glu Pro His Gly Tyr Leu Leu Thr
165 170 175

Ala Ala Val Ser Pro Gly Lys Asp Lys Ile Asp Arg Ala Tyr Asp Ile
180 185 190

Lys Glu Leu Asn Lys Leu Phe Asp Trp Met Asn Val Met Thr Tyr Asp
195 200 205

Tyr His Gly Gly Trp Glu Asn Phe Tyr Gly His Asn Ala Pro Leu Tyr
210 215 220

Lys Arg Pro Asp Glu Thr Asp Glu Leu His Thr Tyr Phe Asn Val Asn
225 230 235 240

Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg Asp Lys Leu
245 250 255

Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Trp Ser Ile Glu Asp Arg
260 265 270

Ser Lys Leu Lys Leu Gly Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser Pro Pro Gly
275 280 285

Phe Ile Ser Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser Tyr Ile Glu Leu Cys Gln
290 295 300

Leu Phe Gln Lys Glu Glu Trp His Ile Gln Tyr Asp Glu Tyr Tyr Asn
305 310 315 320

Ala Pro Tyr Gly Tyr Asn Asp Lys Ile Trp Val Gly Tyr Asp Asp Leu
325 330 335

Ala Ser Ile Ser Cys Lys Leu Ala Phe Leu Lys Glu Leu Gly Val Ser
340 345 350

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Gly Val Met Val Trp Ser Leu Glu Asn Asp Asp Phe Lys Gly His Cys
355 360 365

Gly Pro Lys Asn Pro Leu Leu Asn Lys Val His Asn Met Ile Asn Gly
370 375 380

Asp Glu Lys Asn Ser Phe Glu Cys Ile Leu Gly Pro Ser Thr Thr Thr
385 390 395 400

Pro Thr Pro Thr Thr Thr Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
405 410 415

Pro Ser Pro Thr Thr Pro Thr Thr Thr Pro Ser Pro Thr Thr Thr Thr
420 425 430

Thr Thr Pro Ser Pro Thr Thr Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
435 440 445

Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr Pro Ala Pro Thr Thr Ser Thr Pro Ser
450 455 460

Pro Thr Thr Thr Glu His Thr Ser Glu Thr Pro Lys Tyr Thr Thr Tyr
465 470 475 480

Val Asp Gly His Leu Ile Lys Cys Tyr Lys Glu Gly Asp Ile Pro His
485 490 495

Pro Thr Asn Ile His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Phe Val Asn Gly Gly
500 505 510

Trp Trp Val His Ile Met Pro Cys Pro Pro Gly Thr Ile Trp Cys Gln
515 520 525

Glu Lys Leu Thr Cys Ile Gly Glu
530 535

<210> 22
<211> 1608
<212> DNA
<213> Dermatophagoides farinae

<400> 22
ttcgctata caagtcatt tttctgaca ccaaatagtg cccggtggac agggcataat 60
atgaaccac cagccaccat taacaaattc acagacaaa tatttgta tattggttg 120
atgtggata tcaccttctc tgtacattt gataagatgt ccatcgacat aggtgtata 180
ttttggtgt tcgcttgtgt gttcgtcgt gttggcga ggtctgatg ttgtaggggc 240
tgggttgggt gttgttgggt ttggttgggt gggagaagga sttgttctcg gtgtgtggg 300

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

agaaggggtt gttgtcgggg tgggtgggaga aggggttgtt gtcgggggtg tgggagaagg 360
agttgttggc gttgtagtcg ggggttgggg tgtcgtcgtt ggaattgggtg tcgttgtact 420
tggaccocaaa atgcattcga aagagttctt ttcacogcca ttaatcatat tatgaacttt 480
gttcaacaat ggatttttcg gtccgcagtg acctttgaaa tcatcatttt ccaatgacca 540
aaccatgaca ccagaaacgc ctaattcttt caggaaagcc aacttgcagc atabactggc 600
cagatcatcg taaccgacc agattttatc attgtaacca tatggagcat tgaataatc 660
atcgtattgy atatgccatt cttctttttg aaacaattga cacaattcta tatatgagag 720
gacaccttct tcaccagaaa tgaaacctgg gggcgacatg ccittggctg gatctccaag 780
tttgagtttg cttcgtatct caatgctcca agcacggcca tagaatggaa cccccattac 840
caatttgtct ctggtggcac cattgttcaa ataattgtgc atgggttagt tgcattgaa 900
gtaagtgtgc aactcatcag ttcatctgg tcgtttatac aacggagcat tgtgaccgta 960
aaagttttcc catccaccgt ggtaatacata tgcacagaca ttcacccaat cgacaattt 1020
gttcaattct ttgatatcat aagctcggtc gattttgtct ttacctggtg atactgcagc 1080
agtcaacaag tagccatgag gttcaaaagc gtctttaagt tctctascca aagccaaata 1140
gtttttgtta tcgattttcg ggttaoccaa tcgagatcca ggatactccc aatccaaatc 1200
tagaccgtcg aacttgatt ctgcacaaaa gtccaaaact gattgtatga attgttgacg 1260
atatgttggg ttgcagcca tateggaata tttttccgag ccttcatacc aaccaccaag 1320
tgaatcatg gtggtaatt ctggattctt caatcgcaag ttgttgsaac gttcataacc 1380
acgtttttcc catgagttat ggttatcctc ttggttaagga tcgaaaactt gaattgtgta 1440
tttgtattca tcaattttag cgaaaccata cattaaatgt gtacacttga atggatcaat 1500
atcttggata gtgtatggat caactttatg atatacggac catgttccaa cataacaaac 1560
aattctcctc ggatttttcg aataatcatt atgatctcgt ttgatgga 1608

```

```

<210> 23
<211> 25
<212> PRT
<213> Dermatophagoides farinae

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = any amino acid at position 1

```

```

<400> 23
Xaa Leu Glu Pro Lys Thr Val Cys Tyr Tyr Glu Ser Trp Val His His
1 5 10 15

```

```

Arg Gln Gly Glu Gly Lys Met Asp Pro
20 25
21

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

<210> 24
<211> 33
<212> PRP
<213> Dermatophagoides farinae

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> Xaa = any amino acid at position 18

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> Xaa = any amino acid at position 28

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> Xaa = any amino acid at position 31

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> Xaa = any amino acid at position 32

<400> 24
Ser Ile Lys Arg Asp His Asn Asp Tyr Ser Lys Asn Pro Met Met Ile
1 5 10 15

Val Xaa Tyr Gly Gly Ser Ser Gly Tyr Gln Ser Xaa Lys Arg Xaa Xaa
20 25 30

Thr

<210> 25
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> n = a, c, t or g at position 24

<400> 25
aaacgtgatc ataaygatta ytcnaaraay c 31

<210> 26
22

```

WO 02/28807

PCT/US01/28730

AI-2-C4-PCT.ST25.txt

```

<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Primer

<400> 26
aacgtgatc ataaygatta yagyaaraay c                               31

<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n = a, c, t or g at position 12

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n = a, c, t or g at position 21

<400> 27
ecttcttcac cnacratcaa ncc                                       23

<210> 28
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n = a, c, t or g at position 12

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n = a, c, t or g at position 21

<400> 28
ecttcttcac cnacratgaa ncc                                       23

<210> 29
<211> 13
<212> PFT
<213> Dermatophagoides farinae

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

<400> 29

Gln Tyr Gly Val Thr Gln Ala Val Val Thr Gln Pro Ala
1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Dermatophagoides farinae

<400> 30

Asp Glu Leu Leu Met Lys Ser Gly Pro Gly Pro
1 5 10

<210> 31

<211> 24

<212> PRT

<213> Dermatophagoides farinae

<400> 31

Asp Met Glu His Phe Thr Gln His Lys Gly Asn Ala Lys Ala Met Ile
1 5 10 15Ala Val Gly Gly Ser Thr Met Ser
20

<210> 32

<211> 21

<212> PRT

<213> Dermatophagoides farinae

<400> 32

Asp Ala Asn Glu Glu Ala Arg Ser Gln Leu Pro Glu Thr Ala Met Val
1 5 10 15Leu Ile Lys Ser Gln
20

<210> 33

<211> 21

<212> PRT

<213> Dermatophagoides farinae

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa = any amino acid at position 11

<400> 33

Gln Ser Arg Asp Arg Asn Asp Lys Pro Tyr Xaa Ile Val Lys Lys Lys
1 5 10 15

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Lys Lys Ala Leu Asp
20

<210> 34
<211> 1621
<212> DNA
<213> Dermatophagoides farinae

<220>
<221> CDS
<222> (14)..(1540)
<223>

<400> 34
agaacttatg aaa atg aaa acg aca ttt gca tgg ttt tgt ata tgg gcc 49
Met Lys Thr Thr Phe Ala Leu Phe Cys Ile Trp Ala
1 5 10

tgc att ggc ttg atg aat gcg gcc act aaa cga gat cac aat aat tat 97
Cys Ile Gly Leu Met Asn Ala Ala Thr Lys Arg Asp His Asn Asn Tyr
15 20 25

tcg aaa aat cca atg cga atc gta tgt tat gtt gga aca tgg tcc gtt 145
Ser Lys Asn Pro Met Arg Ile Val Cys Tyr Val Gly Thr Trp Ser Val
30 35 40

tat cat aaa gtt gat cca tac aca att gaa gat att gat cct ttc aaa 193
Tyr His Lys Val Asp Pro Tyr Thr Ile Glu Asp Ile Asp Pro Phe Lys
45 50 55 60

tgt act cat ttg atg tat ggt ttt gct aaa atc gat gaa tac aaa tac 241
Cys Thr His Leu Met Tyr Gly Phe Ala Lys Ile Asp Glu Tyr Lys Tyr
65 70 75

acc att caa gtt ttt gat cca ttt caa gat gat aac cat aac tca tgg 289
Thr Ile Gln Val Phe Asp Pro Phe Gln Asp Asp Asn His Asn Ser Trp
80 85 90

gaa aaa cac ggg tat gaa cgt ttc aac aac ttg aga ttg aag aat cca 337
Glu Lys His Gly Tyr Glu Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Lys Asn Pro
95 100 105

gaa ttg acc acc atg att tca ttg ggt ggt tgg tat gaa ggt tca gaa 385
Glu Leu Thr Thr Met Ile Ser Leu Gly Gly Trp Tyr Glu Gly Ser Glu
110 115 120

aaa tat tgg gat atg gca gcc aat cca aca tat cgt cag caa ttt gtt 433
Lys Tyr Ser Asp Met Ala Ala Asn Pro Thr Tyr Arg Gln Gln Phe Val
125 130 135 140

caa tca gtt ttg gac ttt ttg caa gaa tac aaa ttc gat ggc cta gat 481
Gln Ser Val Leu Asp Phe Leu Gln Glu Tyr Lys Phe Asp Gly Leu Asp
145 150 155

ttg gat tgg gaa tat cct gga tca cgg tta ggc aat cct aaa atc gat 529
Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ile Asp
160 165 170

aaa caa aac tat tta aca tta gtt aga gaa ott aaa gag gca ttt gaa 577
Lys Gln Asn Tyr Leu Thr Leu Val Arg Glu Leu Lys Glu Ala Phe Glu
175 180 185

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

cct ttc ggc tac ttg ttg act gcc gca gta tca ccc ggt aaa gat aaa 625
 Pro Phe Gly Tyr Leu Leu Thr Ala Ala Val Ser Pro Gly Lys Asp Lys
 190 195 200

att gac gta gct tat gag ctc aaa gaa ttg aac cea ttg ttc gat tgg 673
 Ile Asp Val Ala Tyr Glu Leu Lys Glu Leu Asn Gln Leu Phe Asp Trp
 205 210 215 220

atg aat gtc atg act tat gat tac cat gcc gga tgg gaa aat gtt ttc 721
 Met Asn Val Met Thr Tyr Asp Tyr His Gly Gly Trp Glu Asn Val Phe
 225 230 235

ggc cat aat gct ccg ttg tat aaa cga ccc gat gaa acg gat gaa ttg 769
 Gly His Asn Ala Pro Leu Tyr Lys Arg Pro Asp Glu Thr Asp Glu Leu
 240 245 250

cac act tac ttc aat gtc aac tac acc atg cac tat tat ttg aac aat 817
 His Thr Tyr Phe Asn Val Asn Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn
 255 260 265

ggc gct act cga gac aaa ctt gtt atg ggt gtt cca ttc tat ggt cgt 865
 Gly Ala Thr Arg Asp Lys Leu Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg
 270 275 280

gct tgg agc atc gaa gat cga agc aaa gtc aaa ctt ggc gat ccg gcc 913
 Ala Trp Ser Ile Glu Asp Arg Ser Lys Val Lys Leu Gly Asp Pro Ala
 285 290 295 300

aaa ggc atg tct cct cct ggt ttt att act ggt gaa gaa ggt gtt ctc 961
 Lys Gly Met Ser Pro Pro Gly Phe Ile Thr Gly Glu Glu Gly Val Leu
 305 310 315

tca tac atc gaa ttg tgt cag tta ttc cag aaa gaa gaa tgg cat att 1009
 Ser Tyr Ile Glu Leu Cys Gln Leu Phe Gln Lys Glu Glu Trp His Ile
 320 325 330

caa tac gat gaa tat tac aat gct cca tac gga tat aat gat aaa atc 1057
 Gln Tyr Asp Glu Tyr Tyr Asn Ala Pro Tyr Gly Tyr Asn Asp Lys Ile
 335 340 345

tgg gtt ggt tac gat gat ctg gct agt ata tca tgc aag ttg gcc ttt 1105
 Trp Val Gly Tyr Asp Asp Leu Ala Ser Ile Ser Cys Lys Leu Ala Phe
 350 355 360

ctc aaa gaa ttg ggc gtc tct gcc gtt atg ata tgg tca ttg gaa aac 1153
 Leu Lys Glu Leu Gly Val Ser Gly Val Met Ile Trp Ser Leu Glu Asn
 365 370 375 380

gat gat ttc aaa ggt cat tgc gga ccg aaa tat cca ttg ttg aac aaa 1201
 Asp Asp Phe Lys Gly His Cys Gly Pro Lys Tyr Pro Leu Leu Asn Lys
 385 390 395

gtt cac aat atg atc aat ggt gat gaa aag aac tct tac gaa tgt ctt 1249
 Val His Asn Met Ile Asn Gly Asp Glu Lys Asn Ser Tyr Glu Cys Leu
 400 405 410

ttg ggc cca agt aca acc aca cca aca cca acc acc ccg tca act act 1297
 Leu Gly Pro Ser Thr Thr Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ser Thr Thr
 415 420 425

tcg act acc aca cca acg cct acc acc acc gat agc aca agc gaa aca 1345
 Ser Thr Thr Thr Pro Thr Pro Thr Thr Thr Asp Ser Thr Ser Glu Thr
 430 435 440

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

cca aaa tac act acg tat att gat gga cat ttg att aaa tgc tat aaa 1393
 Pro Lys Tyr Thr Thr Tyr Ile Asp Gly His Leu Ile Lys Cys Tyr Lys
 445 450 455 460

caa ggt tat ctt cca cat cca act gat gtt cat aaa tat tta gtt tgt 1441
 Gln Gly Tyr Leu Pro His Pro Thr Asp Val His Lys Tyr Leu Val Cys
 465 470 475

gaa tat att gcc aca cca aac ggt ggt tgg tgg gta cac att atg gat 1489
 Glu Tyr Ile Ala Thr Pro Asn Gly Gly Trp Trp Val His Ile Met Asp
 480 485 490

tgt cca aaa gga act aga tgg cac gca aca tta aaa aat tgt att caa 1537
 Cys Pro Lys Gly Thr Arg Trp His Ala Thr Leu Lys Asn Cys Ile Gln
 495 500 505

gaa tgatctgata tatttgaac tgttttttgc taaatgaaat taaataaaa 1590
 Glu

ttatttgaat ccattaaaaa aaaaaaaaa a 1621

<210> 35
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae

<400> 35

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

Met Asn Ala Ala Thr Lys Arg Asp His Asn Asn Tyr Ser Lys Asn Pro
 20 25 30

Met Arg Ile Val Cys Tyr Val Gly Thr Trp Ser Val Tyr His Lys Val
 35 40 45

Asp Pro Tyr Thr Ile Glu Asp Ile Asp Pro Phe Lys Cys Thr His Leu
 50 55 60

Met Tyr Gly Phe Ala Lys Ile Asp Glu Tyr Lys Tyr Thr Ile Gln Val
 65 70 75 80

Phe Asp Pro Phe Gln Asp Asp Asn His Asn Ser Trp Glu Lys His Gly
 85 90 95

Tyr Glu Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Lys Asn Pro Glu Leu Thr Thr
 100 105 110

Met Ile Ser Leu Gly Gly Trp Tyr Glu Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp
 115 120 125

Met Ala Ala Asn Pro Thr Tyr Arg Gln Gln Phe Val Gln Ser Val Leu
 130 135 140

27

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Asp Phe Leu Gln Glu Tyr Lys Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu
 145 150 155 160
 Tyr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ile Asp Lys Gln Asn Tyr
 165 170 175
 Leu Thr Leu Val Arg Glu Leu Lys Glu Ala Phe Glu Pro Phe Gly Tyr
 180 185 190
 Leu Leu Thr Ala Ala Val Ser Pro Gly Lys Asp Lys Ile Asp Val Ala
 195 200 205
 Tyr Glu Leu Lys Glu Leu Asn Gln Leu Phe Asp Trp Met Asn Val Met
 210 215 220
 Thr Tyr Asp Tyr His Gly Gly Trp Glu Asn Val Phe Gly His Asn Ala
 225 230 235 240
 Pro Leu Tyr Lys Arg Pro Asp Glu Thr Asp Glu Leu His Thr Tyr Phe
 245 250 255
 Asn Val Asn Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg
 260 265 270
 Asp Lys Leu Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Trp Ser Ile
 275 280 285
 Glu Asp Arg Ser Lys Val Lys Leu Gly Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser
 290 295 300
 Pro Pro Gly Phe Ile Thr Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser Tyr Ile Glu
 305 310 315 320
 Leu Cys Gln Leu Phe Gln Lys Glu Glu Trp His Ile Gln Tyr Asp Glu
 325 330 335
 Tyr Tyr Asn Ala Pro Tyr Gly Tyr Asn Asp Lys Ile Trp Val Gly Tyr
 340 345 350
 Asp Asp Leu Ala Ser Ile Ser Cys Lys Leu Ala Phe Leu Lys Glu Leu
 355 360 365
 Gly Val Ser Gly Val Met Ile Trp Ser Leu Glu Asn Asp Asp Phe Lys
 370 375 380
 Gly His Cys Gly Pro Lys Tyr Pro Leu Leu Asn Lys Val His Asn Met
 385 390 395 400
 28

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Ile Asn Gly Asp Glu Lys Asn Ser Tyr Glu Cys Leu Leu Gly Pro Ser
 405 410 415

Thr Thr Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ser Thr Thr Ser Thr Thr Thr
 420 425 430

Pro Thr Pro Thr Thr Thr Asp Ser Thr Ser Glu Thr Pro Lys Tyr Thr
 435 440 445

Thr Tyr Ile Asp Gly His Leu Ile Lys Cys Tyr Lys Gln Gly Tyr Leu
 450 455 460

Pro His Pro Thr Asp Val His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Tyr Ile Ala
 465 470 475 480

Thr Pro Asn Gly Gly Trp Trp Val His Ile Met Asp Cys Pro Lys Gly
 485 490 495

Thr Arg Trp His Ala Thr Leu Lys Asn Cys Ile Gln Glu
 500 505

<210> 36
 <211> 1621
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides farinae

<400> 36
 tttttttttt ttttttaatg gattcaata attttattta aatttcattt agcaaaaaac 60
 agttacaat atactagatc attcttgaat acaatttttt aatgttgcgt gccatctagt 120
 tccttttga caatccataa tgtgtaccoca ccaaccacog tttgtgtggy caatatatto 180
 acaaaactaaâ tttttatgaa catcagttgg atgtggaaga taacctgttt tatagcattt 240
 aatcaaatgt ccatcaatat acgtagtgyta ttttgggttt tgccttgtgc tategtgggt 300
 ggtaggcggt ggtgtgtag tagaagtagt tgacggggtg gttggtgtt gttgtgttgt 360
 acttgggccc aaaagacatt cgtagagatt cttttcatca ccattgatca tattgtgaac 420
 tttgttcaac aatggatatt tgggtccgca atgacctttg aaatcatcgt tttccaatga 480
 ccatacata acgccaagaga cgcaccaattc tttgagaag gcaacttgc atgataact 540
 agccagatca tcgtaaccaa cccagatttt atcattatat ccgtatggag cattgtaata 600
 ttcacgtat tgaatatgcc attcttcttt ctggaataac tgacacaatt cगतgtatga 660
 gagaacacct tcttcaccag taataaaacc aggaggagac atgoccttgg cgggatcggc 720
 aagtttgact ttgcttcgat cttcagatct ccaagcacga ccatagaatg gaacaccat 780
 acaagtttg tctcagtag cgcattgttt caaataatag tgcattgtgt agttgacatt 840

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

gaagtaagtg tgcaattcat cgtttcctc gggtcgttta tacaacggag cattatggcc 900
gaaaacattt tcccatccgc catggtaatc ataagtcctg acattcatcc aatcgaacaa 960
ttggttcaat tctttgagct cataagctac gtcaatttta tctttaccgg gtgatactgc 1020
ggcagtcac aagtagccga aaggttcaaa tgcctcttia agttctctaa ctaatgttaa 1080
atagttttgt ttatcgattt taggattgcc taacctgat coaggatatt cccaatccaa 1140
atctaggcca tcgaatttgt attcttgcaa aaagtccaaa actgattgea caaattgctg 1200
acgatatggt ggattggctg ccatatccga atattttctt gaaccttcat accaaccacc 1260
caatgaaatc atgggtgtca attctggatt cttcaatctc aagtgttga aacgttcaata 1320
cccgtgtttt tcccatgagt tatggttatc atcttgaat ggatcaaaaa cttgaatggt 1380
gtatattgat tcaatcgattt tagcaaaacc atacatcaaa tgagtacatt tgaaggatc 1440
aatatcttca atgtgtatg gatcaacttt atgataaacg gacctgttc caacataaca 1500
tacgattcgc attgattttt tcgaataatt attgtgatct cgtttagtg cygcattcat 1560
caagccaatg caggcccaata tacaatacaa tgcaaatgtc gttttcattt tcataagttc 1620
t 1621

<210> 37
<211> 1527
<212> DNA
<213> Dermatophagoides farinae

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1527)
<223>

<400> 37
atg aaa acg aca ttt gca ttg ttt tgt ata tgg gcc tgc att ggc ttg 48
Met Lys Thr Thr Phe Ala Leu Phe Cys Ile Trp Ala Cys Ile Gly Leu
1 5 10 15
atg aat gcg gcc act aaa cga gat cac aat aat tat tgc aaa aat cca 96
Met Asn Ala Ala Thr Lys Arg Asp His Asn Asn Tyr Ser Lys Asn Pro
20 25 30
atg cga atc gta tgt tat gtt gga aca tgg tcc gtt tat cat aaa gtt 144
Met Arg Ile Val Cys Tyr Val Gly Thr Trp Ser Val Tyr His Lys Val
35 40 45
gat cca tac aca att gaa gat att gat cct ttc aaa tgt act cat ttg 192
Asp Pro Tyr Thr Ile Glu Asp Ile Asp Pro Phe Lys Cys Thr His Leu
50 55 60
atg tat ggt ttt gct aaa atc gat gaa tac aaa tac acc att caa gtt 240
Met Tyr Gly Phe Ala Lys Ile Asp Glu Tyr Lys Tyr Thr Ile Gln Val
65 70 75 80
ttt gat cca ttt caa gat gat aac cat aac tca tgg gaa aaa cac ggg 288
Phe Asp Pro Phe Gln Asp Asp Asn His Asn Ser Trp Glu Lys His Gly
85 90 95
30

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

tat gaa cgt ttc aac aac ttg aga ttg aag aat cca gaa ttg acc acc Tyr Glu Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Lys Asn Pro Glu Leu Thr Thr	336
100 105 110	
atg att tca ttg ggt ggt tgg tat gaa ggt tca gaa aaa tat tog gat Met Ile Ser Leu Gly Gly Trp Tyr Glu Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp	384
115 120 125	
atg gca gcc aat cca aca tat cgt cag caa ttt gtt caa tca gtt ttg Met Ala Ala Asn Pro Thr Tyr Arg Gln Gln Phe Val Gln Ser Val Leu	432
130 135 140	
gac ttt ttg caa gaa tac aaa ttc gat ggc cta gat ttg gat tgg gaa Asp Phe Leu Gln Glu Tyr Lys Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu	480
145 150 155 160	
tat cct gga tca cgg tta ggc aat cct aaa atc gat aaa caa aac tat Tyr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ile Asp Lys Gln Asn Tyr	528
165 170 175	
tta aca tta gtt aga gaa ctt aaa gag gca ttt gaa cct ttc ggc tac Leu Thr Leu Val Arg Glu Leu Lys Glu Ala Phe Glu Pro Phe Gly Tyr	576
180 185 190	
ttg ttg act gcc gca gta tca ccc ggt aaa gat aaa att gac gta gct Leu Leu Thr Ala Ala Val Ser Pro Gly Lys Asp Lys Ile Asp Val Ala	624
195 200 205	
tat gag ctc aaa gaa ttg aac caa ttg ttc gat tgg atg aat gtc atg Tyr Glu Leu Lys Glu Leu Asn Gln Leu Phe Asp Trp Met Asn Val Met	672
210 215 220	
act tat gat tac cat ggc gga tgg gaa aat gtt ttc ggc cat aat gct Thr Tyr Asp Tyr His Gly Gly Trp Glu Asn Val Phe Gly His Asn Ala	720
225 230 235 240	
ccg ttg tat aaa cga ccc gat gaa acg gat gaa ttg cac act tac ttc Pro Leu Tyr Lys Arg Pro Asp Glu Thr Asp Glu Leu His Thr Tyr Phe	768
245 250 255	
aat gtc aac tac acc atg cac tat tat ttg aac aat ggc gct act cga Asn Val Asn Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg	816
260 265 270	
gac aaa ctt gtt atg ggt gtt cca ttc tat ggt cgt gct tgg agc atc Asp Lys Leu Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Trp Ser Ile	864
275 280 285	
gaa gat cga agc aaa gtc aaa ctt ggc gat cgc gcc aaa ggc atg tct Glu Asp Arg Ser Lys Val Lys Leu Gly Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser	912
290 300	
cct cct ggt ttt att act ggt gaa gaa ggt gtt ctc tca tac atc gaa Pro Pro Gly Phe Ile Thr Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser Tyr Ile Glu	960
305 310 315 320	
ttg tgt cag tta ttc cag aaa gaa gaa tgg cat att caa tac gat gaa Leu Cys Gln Leu Phe Gln Lys Glu Glu Trp His Ile Gln Tyr Asp Glu	1008
325 330 335	
tat tac aat gct cca tac gga tat aat gat aaa atc tgg gtt ggt tac Tyr Tyr Asn Ala Pro Tyr Gly Tyr Asn Asp Lys Ile Trp Val Gly Tyr	1056
340 345 350	

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

gat gat ctg gct agt ata tca tgc aag ttg gcc ttt ctc aaa gaa ttg 1104
Asp Asp Leu Ala Ser Ile Ser Cys Lys Leu Ala Phe Leu Lys Glu Leu
355 360 365

ggc gtc tct ggc gtt atg ata tgg tca ttg gaa aac gat gat ttc aaa 1152
Gly Val Ser Gly Val Met Ile Trp Ser Leu Glu Asn Asp Asp Phe Lys
370 375 380

ggt cat tgc gga cgg aaa tat cca ttg ttg aac aaa gtt cac aat atg 1200
Gly His Cys Gly Pro Lys Tyr Pro Leu Leu Asn Lys Val His Asn Met
385 390 395

atc aat ggt gat gaa aag aac tct tac gaa tgt ctt ttg ggc cca agt 1248
Ile Asn Gly Asp Glu Lys Asn Ser Tyr Glu Cys Leu Leu Gly Pro Ser
405 410 415

aca acc aca cca aca cca acc acc cgg tca act act tgg act acc aca 1296
Thr Thr Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ser Thr Thr Ser Thr Thr Thr
420 425 430

cca acg cct acc acc acc gat agc aca agc gaa aca cca aaa tac act 1344
Pro Thr Pro Thr Thr Thr Asp Ser Thr Ser Glu Thr Pro Lys Tyr Thr
435 440 445

acg tat att gat gga cat ttg att aaa tgc tat aaa caa ggt tat ctt 1392
Thr Tyr Ile Asp Gly His Leu Ile Lys Cys Tyr Lys Gln Gly Tyr Leu
450 455 460

cca cat cca act gat gtt cat aaa tat tta gtt tgt gaa tat att gcc 1440
Pro His Pro Thr Asp Val His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Tyr Ile Ala
465 470 475

aca cca aac ggt ggt tgg tgg gta cac att atg gat tgt cca aaa gga 1488
Thr Pro Asn Gly Gly Trp Trp Val His Ile Met Asp Cys Pro Lys Gly
485 490 495

act aga tgg cac gca aca tta aaa aat tgt att caa gaa 1527
Thr Arg Trp His Ala Thr Leu Lys Asn Cys Ile Gln Glu
500 505

<210> 38
<211> 509
<212> PRT
<213> Dermatophagoides farinae

<400> 38
Met Lys Thr Thr Phe Ala Leu Phe Cys Ile Trp Ala Cys Ile Gly Leu
1 5 10 15

Met Asn Ala Ala Thr Lys Arg Asp His Asn Asn Tyr Ser Lys Asn Pro
20 25 30

Met Arg Ile Val Cys Tyr Val Gly Thr Trp Ser Val Tyr His Lys Val
35 40 45

Asp Pro Tyr Thr Ile Glu Asp Ile Asp Pro Phe Lys Cys Thr His Leu
50 55 60

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Met Tyr Gly Phe Ala Lys Ile Asp Glu Tyr Lys Tyr Thr Ile Gln Val
65 70 75 80

Phe Asp Pro Phe Gln Asp Asp Asn His Asn Ser Trp Glu Lys His Gly
85 90 95

Tyr Glu Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Lys Asn Pro Glu Leu Thr Thr
100 105 110

Met Ile Ser Leu Gly Gly Trp Tyr Glu Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp
115 120 125

Met Ala Ala Asn Pro Thr Tyr Arg Gln Gln Phe Val Gln Ser Val Leu
130 135 140

Asp Phe Leu Gln Glu Tyr Lys Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu
145 150 155 160

Tyr Pro Gly Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ile Asp Lys Gln Asn Tyr
165 170 175

Leu Thr Leu Val Arg Glu Leu Lys Glu Ala Phe Glu Pro Phe Gly Tyr
180 185 190

Leu Leu Thr Ala Ala Val Ser Pro Gly Lys Asp Lys Ile Asp Val Ala
195 200 205

Tyr Glu Leu Lys Glu Leu Asn Gln Leu Phe Asp Trp Met Asn Val Met
210 215 220

Thr Tyr Asp Tyr His Gly Gly Trp Glu Asn Val Phe Gly His Asn Ala
225 230 235 240

Pro Leu Tyr Lys Arg Pro Asp Glu Thr Asp Glu Leu His Thr Tyr Phe
245 250 255

Asn Val Asn Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg
260 265 270

Asp Lys Leu Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Trp Ser Ile
275 280 285

Glu Asp Arg Ser Lys Val Lys Leu Gly Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser
290 295 300

Pro Pro Gly Phe Ile Thr Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser Tyr Ile Glu
305 310 315 320

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Leu Cys Gln Leu Phe Gln Lys Glu Glu Trp His Ile Gln Tyr Asp Glu
 325 330 335

Tyr Tyr Asn Ala Pro Tyr Gly Tyr Asn Asp Lys Ile Trp Val Gly Tyr
 340 345 350

Asp Asp Leu Ala Ser Ile Ser Cys Lys Leu Ala Phe Leu Lys Glu Leu
 355 360 365

Gly Val Ser Gly Val Met Ile Trp Ser Leu Glu Asn Asp Asp Phe Lys
 370 375 380

Gly His Cys Gly Pro Lys Tyr Pro Leu Leu Asn Lys Val His Asn Met
 385 390 395 400

Ile Asn Gly Asp Glu Lys Asn Ser Tyr Glu Cys Leu Leu Gly Pro Ser
 405 410 415

Thr Thr Thr Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ser Thr Thr Ser Thr Thr Thr
 420 425 430

Pro Thr Pro Thr Thr Thr Asp Ser Thr Ser Glu Thr Pro Lys Tyr Thr
 435 440 445

Thr Tyr Ile Asp Gly His Leu Ile Lys Cys Tyr Lys Gln Gly Tyr Leu
 450 455 460

Pro His Pro Thr Asp Val His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Tyr Ile Ala
 465 470 475 480

Thr Pro Asn Gly Gly Trp Trp Val His Ile Met Asp Cys Pro Lys Gly
 485 490 495

Thr Arg Trp His Ala Thr Leu Lys Asn Cys Ile Gln Glu
 500 505

<210> 39
 <211> 1527
 <212> DNA
 <213> Dermatophagoides farinae

<400> 39
 ttcttgaata caatttttta atgttgcgtg ccactctagtt ccttttgac aatccataat 60
 gtgtaccacc caaccacgt ttggtgtgac aatatattca caaactaaat atttatgaac 120
 atcagttgga tgtggaagat aaccttgttt atagcattta atcaaatgac catcaatata 180
 cgtagtgtat ttggtgttt cgtctgtgct atcgtgtgtg gtaggcgttg gtgtgtagt 240
 cgaagtagtt gacgggtgg ttggtgttgg tgtgttgtta ctgggcccc aagacattc 300

34

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

gtaagagttc ttttcatcac cattgatcat attgtgaact ttgttcaaca atggatattt 360
cgytccgcaa tgacctttga aatcatogtt ttccaatgac catatcataa cgccagagac 420
gcccaattct ttgagaaagg ccaactgca tgatatacta gccagatcat cgtaaccaac 480
ccagatttta tcattatato cgtatggagc attgtaatat tcatcgtatt gaatatgcca 540
ttcttctttc tggataaact gaaccaattc gatgtatgag agaacaacct cttcaccagt 600
aataaaacca ggaggagaca tgcccttggc cggatcgcca agtttgactt tgcttcgac 660
ttcagtgctc caagccagac catagaatgg aacaccata acaagtttgt ctcgagtacg 720
gccattgttc aaataatagt gcatgggtga gttgacattg aagtaagtgt gcaattcattc 780
cgtttcactc ggtcgtttat acaacggagc attatggccg aaaacatttt cccatccgcc 840
atggtaatca taagtcattg cattcatcca atcgaacaat tggttcaatt ctttgagctc 900
ataagctaac tcaattttat ctttacccgg tgatactcgc gcagtcaaca agtagccgaa 960
aggttcaaat gcctctttaa gttctctaac taatgtttaa tagttttgtt tctcgatttt 1020
aggattgctt aaccgtgac caggatattc ccaatccaaa tctaggccat cgaatttcta 1080
ttcttgcaaa aagtcacaaa ctgattgaac aaattgctga cgtatgttg gattggctgc 1140
catatccgaa tatttttctg aaccttcata ccaaccacc aatgaatca tgggtgtcaa 1200
ttctggattc tcaatctca agttgttgaa acgttcatac ccgtgttttt cccatgagtt 1260
atggttatca tcttgaaatg gatcaaaaac ttgaatggtg tatttgatt catcgatttt 1320
agcaaaacca tacatcaaat gactacattt gaaaggatca atatcttcaa ttgtgtatgg 1380
atcaacttta tgataaacgg accatgttc aacataacat acgattcgca ttggattttt 1440
cgaataatta ttgtgatctc gtttagtggc cgcattcacc aagccaatgc aggcccatat 1500
acaaacaat gcaaatgctg ttttcat 1527

```

```

<210> 40
<211> 1470
<212> DNA
<213> Dermatophagoides farinae

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1470)
<223>

```

```

<400> 40
gcc act aaa cga gat cac aat aat tat tcc aaa aat cca atg cga atc 48
Ala Thr Lys Arg Asp His Asn Asn Tyr Ser Lys Asn Pro Met Arg Ile
1 5 10 15
gta tgt tat gtt gga aca tgg tcc gtt tat cat aaa gtt gat cca tac 96
Val Cys Tyr Val Gly Thr Trp Ser Val Tyr His Lys Val Asp Pro Tyr
20 25 30

```

WO 02/22870

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

aca att gaa gat att gat cct ttc aaa tgt act cat ttg atg tat ggt 144
 Thr Ile Glu Asp Ile Asp Pro Phe Lys Cys Thr His Leu Met Tyr Gly
 35 40 45

ttt gct aaa atc gat gaa tac saa tac acc att caa gtt ttt gat cca 192
 Phe Ala Lys Ile Asp Glu Tyr Lys Tyr Thr Ile Gln Val Phe Asp Pro
 50 55 60

ttt caa gat gat aac cat aac tca tgg gaa aaa cac ggg tat gaa cgt 240
 Phe Gln Asp Asp Asn His Asn Ser Trp Glu Lys His Gly Tyr Glu Arg
 65 70 75 80

ttc aac aac ttg aga ttg aag aat cca gaa ttg acc acc atg att tca 288
 Phe Asn Asn Leu Arg Leu Lys Asn Pro Glu Leu Thr Thr Met Ile Ser
 85 90 95

ttg ggt ggt tgg tat gaa ggt tca gaa aaa tat tgg gat atg gca gcc 336
 Leu Gly Gly Trp Tyr Glu Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp Met Ala Ala
 100 105 110

aat cca aca tat cgt cag caa ttt gtt caa tca gtt ttg gac ttt ttg 384
 Asn Pro Thr Tyr Arg Gln Gln Phe Val Gln Ser Val Leu Asp Phe Leu
 115 120 125

caa gaa tac aaa ttc gat ggc cta gat ttg gat tgg gaa tat cct gga 432
 Gln Glu Tyr Lys Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly
 130 135 140

tca cgg tta ggc aat cct aaa abc gat aaa caa aac tat tta aca tta 480
 Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ile Asp Lys Gln Asn Tyr Leu Thr Leu
 145 150 155 160

ggt aga gaa ctt aaa gag gca ttt gaa cct ttc ggc tac ttg ttg act 528
 Val Arg Glu Leu Lys Glu Ala Phe Glu Pro Phe Gly Tyr Leu Leu Thr
 165 170 175

gcc gca gta tca ccc ggt aaa gat aaa att gac gta gct tat gag ctc 576
 Ala Ala Val Ser Pro Gly Lys Asp Lys Ile Asp Val Ala Tyr Glu Leu
 180 185 190

aaa gaa ttg aac caa ttg ttc gat tgg atg aat gtc atg act tat gat 624
 Lys Glu Leu Asn Gln Leu Phe Asp Trp Met Asn Val Met Thr Tyr Asp
 195 200 205

tac cat ggc gga tgg gaa aat gtt ttc ggc cat aat gct cgg ttg tat 672
 Tyr His Gly Gly Trp Glu Asn Val Phe Gly His Asn Ala Pro Leu Tyr
 210 215 220

aaa cga ccc gat gaa acg gat gaa ttg cac act tac ttc aat gtc aac 720
 Lys Arg Pro Asp Glu Thr Asp Glu Leu His Thr Tyr Phe Asn Val Asn
 225 230 235 240

tac acc atg cac tat tat ttg aac aat ggc gct act cga gac aaa ctt 768
 Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg Asp Lys Leu
 245 250 255

ggt atg ggt gtt cca ttc tat ggt cgt gct tgg agc atc gaa gat cga 816
 Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Trp Ser Ile Glu Asp Arg
 260 265 270

agc aaa gtc aaa ctt ggc gat cgg gcc aaa ggc atg tct cct cct ggt 864
 Ser Lys Val Lys Leu Gly Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser Pro Pro Gly
 275 280 285

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

ttt att act ggt gaa gaa ggt gtt ctc tca tac atc gaa ttg tgt cag 912
 Phe Ile Thr Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser Tyr Ile Glu Leu Cys Gln
 290 295 300

lta ttc cag aaa gaa gaa tgg cat att caa tac gat gaa tat tac aat 960
 Leu Phe Gln Lys Glu Glu Trp His Ile Gln Tyr Asp Glu Tyr Tyr Asn
 305 310 315 320

gct cca tac gga tat aat gat aaa atc tgg gtt ggt tac gat gat ctg 1008
 Ala Pro Tyr Gly Tyr Asn Asp Lys Ile Trp Val Gly Tyr Asp Asp Leu
 325 330 335

gct agt ata tca tgc aag ttg gcc ttt ctc aaa gaa ttg ggc gtc tct 1056
 Ala Ser Ile Ser Cys Lys Leu Ala Phe Leu Lys Glu Leu Gly Val Ser
 340 345 350

ggc gtt atg ata tgg tca ttg gaa aac gat gat ttc aaa ggt cat tgc 1104
 Gly Val Met Ile Trp Ser Leu Glu Asn Asp Asp Phe Lys Gly His Cys
 355 360

gga ccg aaa tat cca ttg ttg aac aaa gtt cac aat atg atc aat ggt 1152
 Gly Pro Lys Tyr Pro Leu Leu Asn Lys Val His Asn Met Ile Asn Gly
 370 375 380

gat gaa aag aac tct tac gaa tgt ctt ttg ggc cca agt aca acc aca 1200
 Asp Glu Lys Asn Ser Tyr Glu Cys Leu Leu Gly Pro Ser Thr Thr Thr
 385 390 395 400

cca aca cca acc acc ccg tca act act tgg act acc aca cca acg cct 1248
 Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ser Thr Thr Ser Thr Thr Thr Pro Thr Pro
 405 410 415

acc acc acc gat agc aca agc gaa aca cca aaa tac act acg tat att 1296
 Thr Thr Thr Asp Ser Thr Ser Glu Thr Pro Lys Tyr Thr Thr Tyr Ile
 420 425 430

gat gga cat ttg att aaa tgc tat aaa caa ggt tat ctt cca cat cca 1344
 Asp Gly His Leu Ile Lys Cys Tyr Lys Gln Gly Tyr Leu Pro His Pro
 435 440 445

act gat gtt cat aaa tat tta gtt tgt gaa tat att gcc aca cca aac 1392
 Thr Asp Val His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Tyr Ile Ala Thr Pro Asn
 450 455 460

ggt ggt tgg tgg gta cac att atg gat tgt cca aaa gga act aga tgg 1440
 Gly Gly Trp Trp Val His Ile Met Asp Cys Pro Lys Gly Thr Arg Trp
 465 470 475 480

cac gca aca tta aaa aat tgt att caa gaa 1470
 His Ala Thr Leu Lys Asn Cys Ile Gln Glu
 485 490

<210> 41
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae

<400> 41

Ala Thr Lys Arg Asp His Asn Asn Tyr Ser Lys Asn Pro Met Arg Ile
 1 5 10 15

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Val Cys Tyr Val Gly Thr Trp Ser Val Tyr His Lys Val Asp Pro Tyr
20 25 30

Thr Ile Glu Asp Ile Asp Pro Phe Lys Cys Thr His Leu Met Tyr Gly
35 40 45

Phe Ala Lys Ile Asp Glu Tyr Lys Tyr Thr Ile Gln Val Phe Asp Pro
50 55 60

Phe Gln Asp Asp Asn His Asn Ser Trp Glu Lys His Gly Tyr Glu Arg
65 70 75 80

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

Leu Gly Gly Trp Tyr Glu Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp Met Ala Ala
100 105 110

Asn Pro Thr Tyr Arg Gln Gln Phe Val Gln Ser Val Leu Asp Phe Leu
115 120 125

Gln Glu Tyr Lys Phe Asp Gly Leu Asp Leu Asp Trp Glu Tyr Pro Gly
130 135 140

Ser Arg Leu Gly Asn Pro Lys Ile Asp Lys Gln Asn Tyr Leu Thr Leu
145 150 155 160

Val Arg Glu Leu Lys Glu Ala Phe Glu Pro Phe Gly Tyr Leu Leu Thr
165 170 175

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

Lys Glu Leu Asn Gln Leu Phe Asp Trp Met Asn Val Met Thr Tyr Asp
195 200 205

Tyr His Gly Gly Trp Glu Asn Val Phe Gly His Asn Ala Pro Leu Tyr
210 215 220

Lys Arg Pro Asp Glu Thr Asp Glu Leu His Thr Tyr Phe Asn Val Asn
225 230 235 240

Tyr Thr Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Gly Ala Thr Arg Asp Lys Leu
245 250 255

Val Met Gly Val Pro Phe Tyr Gly Arg Ala Trp Ser Ile Glu Asp Arg
260 265 270

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-CA-PCT.ST25.txt

Ser Lys Val Lys Leu Gly Asp Pro Ala Lys Gly Met Ser Pro Pro Gly
275 280 285

Phe Ile Thr Gly Glu Glu Gly Val Leu Ser Tyr Ile Glu Leu Cys Gln
290 295 300

Leu Phe Gln Lys Glu Glu Trp His Ile Gln Tyr Asp Glu Tyr Tyr Asn
305 310 315 320

Ala Pro Tyr Gly Tyr Asn Asp Lys Ile Trp Val Gly Tyr Asp Asp Leu
325 330 335

Ala Ser Ile Ser Cys Lys Leu Ala Phe Leu Lys Glu Leu Gly Val Ser
340 345 350

Gly Val Met Ile Trp Ser Leu Glu Asn Asp Asp Phe Lys Gly His Cys
355 360 365

Gly Pro Lys Tyr Pro Leu Leu Asn Lys Val His Asn Met Ile Asn Gly
370 375 380

Asp Glu Lys Asn Ser Tyr Glu Cys Leu Leu Gly Pro Ser Thr Thr Thr
385 390 395 400

Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ser Thr Thr Ser Thr Thr Thr Pro Thr Pro
405 410 415

Thr Thr Thr Asp Ser Thr Ser Glu Thr Pro Lys Tyr Thr Thr Tyr Ile
420 425 430

Asp Gly His Leu Ile Lys Cys Tyr Lys Gln Gly Tyr Leu Pro His Pro
435 440 445

Thr Asp Val His Lys Tyr Leu Val Cys Glu Tyr Ile Ala Thr Pro Asn
450 455 460

Gly Gly Trp Trp Val His Ile Met Asp Cys Pro Lys Gly Thr Arg Trp
465 470 475 480

His Ala Thr Leu Lys Asn Cys Ile Gln Glu
485 490

<210> 42
<211> 1470
<212> DNA
<213> Dermatophagoides farinae

<400> 42
ttcttgaata caatttttta atgttgogtg coacttagtg ccttttggec aatccataat 60

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

gtgtaccocac caaccaccgt ttggtgtggc aatatattca caaactaaat atttatgaac 120
atcagttgga tgtggaagat aaccttgttt atagcattta atcaaatgtc catcaatata 180
cgtagtgtat tttggtgttt cgcttctgct atcgggtggg gtaggcgttg gtgtggtagt 240
cgaagtgtt gacggggtgg ttggtgttgg tgtggttga cttgggcccc aaagacattc 300
gtaagagttc ttttcatcac cattgacat attgtgaact ttgttcaaca atggatattt 360
cggtccgcaa tgaccttga aatcatcgtt ttccaatgac catatcataa cgcagagac 420
gcccaattct ttgagaaagg ccaacttgca tgatatacta gccagatcat cgtaaccaac 480
ccagatttta tcattabato cgtatggagc attgtaatat tcatcgtatt gaatatgcca 540
ttcttcttcc tggataact gacacaattc gatgtatgag agaacacctt cttcaccagt 600
aataaaacca ggaggagaca tgcctttggc cggatcgcca agtttgactt tgccttcgac 660
ttgatgctc caagcacgac catagaatgg aacaccata ccaagtttgt ctcgagtgc 720
gccattgttc aaataatagt gcatggtgta gttgacattg aagtaagtgt gcaattcaco 780
cgtttcatcg ggtcgtttat acaacggagc attatggccg aaaacatttt cccatccgcc 840
atggtaatca taagcatga cttcatcca atcgaacaat tggttcaatt ctttgagctc 900
ataagctacg tcaattttat ctttaccggg tgatactgcy gcagtcaca agtagccgaa 960
aggttcaaat gcctctttaa gtctctaac taatgtttaa tagttttgtt tctcgatttt 1020
aggattgctt aaccgtgac caggatattc ccaatecaaa tctaggccat cgaatttgta 1080
ttcttgcaaa aagtccaaaa ctgattgaac aaattgctga cगतatgttg gattggctgc 1140
catatccgaa tatttttctg aaccttata ccaaccacc aatgaatca tgggtgtcaa 1200
ttctggattc ttcaatctca agttgttga aegttcatal ccgtgttttt cccatgagtt 1260
atggttatca tcttgaatg gatcaaaaac ttgatggtg tatttgatt catcgatttt 1320
agcaaaacca tacatcaaat ggttacattt gaaggatca atatcttcaa ttggtatgg 1380
atcaacttta tgataaacg accatgttcc aacatacat acgattcgca ttggattttt 1440
cgaataatta ttgtgatctc gtttagtggc 1470

```

```

<210> 43
<211> 510
<212> DNA
<213> Dermatophagoides farinae

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(510)
<223>

```

```

<400> 43
gat atg gaa cat ttt aca caa cat aag ggc aac gcc aaa gcc atg atc 48
Asp Met Glu His Phe Thr Gln His Lys Gly Asn Ala Lys Ala Met Ile
1 5 10 15
40

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

gcc gtc ggt ggt tgc act atg tcc gat caa ttt tcc aag act gca gcg      96
Ala Val Gly Gly Ser Thr Met Ser Asp Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala
      20                25                30

gta gaa cab tat cgg gaa acg ttt gtt gtt agc aca gtt gat ctt atg      144
Val Glu His Tyr Arg Glu Thr Phe Val Val Ser Thr Val Asp Leu Met
      35                40                45

act cgt tat ggt ttc gat ggt gtc atg att gat tgg tct ggc atg caa      192
Thr Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Val Met Ile Asp Trp Ser Gly Met Gln
      50                55                60

gcc aaa gat agt gat aat ttc att aaa ttg ttg gac aaa ttc gac gaa      240
Ala Lys Asp Ser Asp Asn Phe Ile Lys Leu Leu Asp Lys Phe Asp Glu
      65                70                75                80

aag ttt gct cac acc tgc ttt gtg atg ggt gtt acc ttg ccg gca acg      288
Lys Phe Ala His Thr Ser Phe Val Met Gly Val Thr Leu Pro Ala Thr
      85                90                95

atc gca tca tac gat aac tat aac att cct gcc atc tcc aac tat gtc      336
Ile Ala Ser Tyr Asp Asn Tyr Asn Ile Pro Ala Ile Ser Asn Tyr Val
      100                105                110

gat ttt atg aac gtg ctt agt ctg gat tac act gga tca tgg gcc cat      384
Asp Phe Met Asn Val Leu Ser Leu Asp Tyr Thr Gly Ser Trp Ala His
      115                120                125

acg gtc ggt cat gct tct ccg ttt cct gaa caa ctc aca acg cta gaa      432
Thr Val Gly His Ala Ser Pro Phe Pro Glu Gln Leu Lys Thr Leu Glu
      130                135                140

gct tac cac aaa cga ggc gct cca cgt cat aag atg gtc atg gct gta      480
Ala Tyr His Lys Arg Gly Ala Pro Arg His Lys Met Val Met Ala Val
      145                150                155                160

cca ttt tat gca cgt acc tgg att ctc gag                                510
Pro Phe Tyr Ala Arg Thr Trp Ile Leu Glu
      165                170

<210> 44
<211> 170
<212> PRT
<213> Dermatophagoides farinae

<400> 44
Asp Met Glu His Phe Thr Gln His Lys Gly Asn Ala Lys Ala Met Ile
1
      5                10                15

Ala Val Gly Gly Ser Thr Met Ser Asp Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala
20
      25                30

Val Glu His Tyr Arg Glu Thr Phe Val Val Ser Thr Val Asp Leu Met
35
      40                45

Thr Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Val Met Ile Asp Trp Ser Gly Met Gln
50
      55                60

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Ala Lys Asp Ser Asp Asn Phe Ile Lys Leu Leu Asp Lys Phe Asp Glu
65 70 75 80

Lys Phe Ala His Thr Ser Phe Val Met Gly Val Thr Leu Pro Ala Thr
85 90 95

Ile Ala Ser Tyr Asp Asn Tyr Asn Ile Pro Ala Ile Ser Asn Tyr Val
100 105 110

Asp Phe Met Asn Val Leu Ser Leu Asp Tyr Thr Gly Ser Trp Ala His
115 120 125

Thr Val Gly His Ala Ser Pro Phe Pro Glu Gln Leu Lys Thr Leu Glu
130 135 140

Ala Tyr His Lys Arg Gly Ala Pro Arg His Lys Met Val Met Ala Val
145 150 155 160

Pro Phe Tyr Ala Arg Thr Trp Ile Leu Glu
165 170

<210> 45
<211> 510
<212> DNA
<213> Dermatophagoides farinae

<400> 45
ctcgagaatc caggtacgtg cataaaatgg tacagccatg accatcttat gacgtggagc 60
gcctcgtttg tggtaagcct ctacggtttt gaggtttca ggaacggag aagcatgacc 120
gacgtagtg gccatgac cagtgtatc cagcctaagc acgttcataa aatcgacata 180
gttggagatg gcaggaatgt tatagttatc gtatgatcgc atcgttgccg gcaaggtaac 240
accatcaca aacgaggtgt gagcaaacct ttcgtcgaat ttgtccaaca atttaatgaa 300
attatacata tctttggcct gcaigccaga ccaatcaanc atgacaccat cgaaccata 360
acgagtcata agatcaactg tgctaacaac aaacgtttcc cgataatggt ctaccgctgc 420
agtottgaa aattgatcgg acatagtcga accaccgacg gcgatcatgg ctttggcgtt 480
gccottatgt tgtgtaaaat gttccatata 510

<210> 46
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Primer

<220>
<221> misc_feature

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

<222> (15)..(15)
<223> n = a, c, t, or g at position 15

<400> 46
gaacccaaaa chgtntgyta ytayg 25

<210> 47
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Primer

<400> 47
gtaaacgac ggccagt 17

<210> 48
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Primer

<400> 48
gatatggaac atttyachca acayaargg 29

<210> 49
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Primer

<400> 49
gtaatacgc tcactatagg gc 22

<210> 50
<211> 1445
<212> DNA
<213> Dermatophagoides farinae

<220>
<221> CDS
<222> (14)..(1399)
<223>

<400> 50
atcccaata aaa atg act cga ttc tct ttg act gta ttg gcc gta ett 49
Met Thr Arg Phe Ser Leu Thr Val Leu Ala Val Leu
1 5 10

gcc gct tgt ttc ggt tca aat att cgt ccg aat gtg gca act ttg gaa 97
Ala Ala Cys Phe Gly Ser Asn Ile Arg Pro Asn Val Ala Thr Leu Glu
15 20 25

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

cct aaa act gta tgt tac tat gaa tct tgg gta cat tgg cgc caa ggt      145
Pro Lys Thr Val Cys Tyr Tyr Glu Ser Trp Val His Trp Arg Gln Gly
   30                               35                               40

gaa ggc aaa atg gat ccc gaa gac ata gat aca tgg ttg tgt act cac      193
Glu Gly Lys Met Asp Pro Glu Asp Ile Asp Thr Ser Leu Cys Thr His
   45                               50                               55

att gtc tac tct tat ttc ggc att gat gct gcc act cat gag att aaa      241
Ile Val Tyr Ser Tyr Phe Gly Ile Asp Ala Ala Thr His Glu Ile Lys
   65                               70                               75

cta ttg gat gaa tat ctt atg aaa gat tta cat gac atg gaa cat ttc      289
Leu Leu Asp Glu Tyr Leu Met Lys Asp Leu His Asp Met Glu His Phe
   80                               85                               90

acg cag cat aag ggc aac gcc aaa gcc atg atc gcc gtc ggt ggt tgg      337
Thr Gln His Lys Lys Asn Ala Lys Ala Met Ile Ala Val Gly Gly Ser
   95                               100                              105

act atg tcc gat caa ttt tcc aag act gca cgc gta gaa cat tat cgg      385
Thr Met Ser Asp Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Val Glu His Tyr Arg
  110                               115                              120

gaa acg ttt gtt gtt agc aca gtt gat ctt atg act cgt tat ggt ttc      433
Glu Thr Phe Val Val Ser Thr Val Asp Leu Met Thr Arg Tyr Gly Phe
  125                               130                              135

gat ggt gtc atg att gat tgg tct ggc atg caa gcc aaa gat agt gat      481
Asp Gly Val Met Ile Asp Trp Ser Gly Met Gln Ala Lys Asp Ser Asp
  145                               150                              155

aat ttc att aaa ttg ttg gac aaa ttc gac gaa aag ttt gct cac acc      529
Asn Phe Ile Lys Leu Leu Asp Lys Phe Asp Glu Lys Phe Ala His Thr
  160                               165                              170

tcg ttt gtg atg ggt gtt acc ttg ccg gca acg atc gca tca tac gat      577
Ser Phe Val Met Gly Val Thr Leu Pro Ala Thr Ile Ala Ser Tyr Asp
  175                               180                              185

aac tat aac att cct gcc atc tcc aac tat gtc gat ttt atg aac gtg      625
Asn Tyr Asn Ile Pro Ala Ile Ser Asn Tyr Val Asp Phe Met Asn Val
  190                               195                              200

ctt agt ctg gat tac act gga tca tgg gcc cat acg gtc ggt cat gct      673
Leu Ser Leu Asp Tyr Thr Gly Ser Trp Ala His Thr Val Gly His Ala
  205                               210                              215

tct cgg ttt cct gaa caa ctc aaa acg cta gaa gct tac cac aaa cga      721
Ser Pro Phe Pro Glu Gln Leu Lys Thr Leu Glu Ala Tyr His Lys Arg
  225                               230                              235

ggc gct cca cgt cat aag atg gtc atg gct gta cca ttt tat gca cgt      769
Gly Ala Pro Arg His Lys Met Val Met Ala Val Pro Phe Tyr Ala Arg
  240                               245                              250

acc tgg att ctc gag aaa atg aac aaa cag gac att ggc gat aaa gct      817
Thr Trp Ile Leu Glu Lys Met Asn Lys Gln Asp Ile Gly Asp Lys Ala
  255                               260                              265

agt gga cca ggc cca cga ggt cag ttt aca cag act gat ggt ttc ctt      865
Ser Gly Pro Gly Pro Arg Gly Gln Phe Thr Gln Thr Asp Gly Phe Leu
  270                               275                              280

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AJ-2-C4-PCT.ST25.txt

```

agc tac aac gaa ttg tgc gtt cag att cag gcc gaa acg aat gca ttc    913
Ser Tyr Asn Glu Leu Cys Val Gln Ile Gln Ala Glu Thr Asn Ala Phe
285                               290                               295                               300

acc att act cgt gat cat gat aat acc gca att tac gct gtc tat gtg    961
Thr Ile Thr Arg Asp His Asp Asn Thr Ala Ile Tyr Ala Val Tyr Val
305                               310                               315

cat agc aac cat gca gaa tgg atc tct ttc gaa gac cga cat aca ctt    1009
His Ser Asn His Ala Glu Trp Ile Ser Phe Glu Asp Arg His Thr Leu
320                               325                               330

ggg gaa aaa gca aaa aac ata acc caa caa gga tat gct gga atg tca    1057
Gly Glu Lys Ala Lys Asn Ile Thr Gln Gln Gly Tyr Ala Gly Met Ser
335                               340                               345

gtc tac aca ttg tcc aac gaa gat gtg cac ggc gtt tgt ggt gat aaa    1105
Val Tyr Thr Leu Ser Asn Glu Asp Val His Gly Val Cys Gly Asp Lys
350                               355                               360

aac cct ttg ttg cat gct atc caa tcg aac tat tat cat ggc gtg gta    1153
Asn Pro Leu Leu His Ala Ile Gln Ser Asn Tyr Tyr His Gly Val Val
365                               370                               375                               380

acc gaa cag acc gtc gtt aca ctt cct cca gtc aca cat aca aca gaa    1201
Thr Glu Pro Thr Val Val Thr Leu Pro Pro Val Thr His Thr Thr Glu
385                               390                               395

cat gtg acc gat ata cca ggc gtg ttt cat tgc cat gaa gaa gga ttc    1249
His Val Thr Asp Ile Pro Gly Val Phe His Cys His Glu Glu Gly Phe
400                               405                               410

ttc cgc gat aag acc tat tgt gcc aca tac tac gaa tgc aaa aaa ggc    1297
Phe Arg Asp Lys Thr Tyr Cys Ala Thr Tyr Tyr Glu Cys Lys Lys Gly
415                               420                               425

gat ttt gga ctg gag asa acc gtg cat cat tgt gcc aat cac tta cag    1345
Asp Phe Gly Leu Glu Lys Thr Val His His Cys Ala Asn His Leu Gln
430                               435                               440

gca ttt gac gaa gta agt cgg aca tgt att gat cat acc asa ata ccc    1393
Ala Phe Asp Glu Val Ser Arg Thr Cys Ile Asp His Thr Lys Ile Pro
445                               450                               455                               460

ggg tgt tgaatacaaa taaaattaca atcactttaa aaaaaaaaaa aaaaaa    1445
Gly Cys

```

<210> 51
<211> 462
<212> PRT
<213> Dermatophagoides farinae

<400> 51

```

Met Thr Arg Phe Ser Leu Thr Val Leu Ala Val Leu Ala Ala Cys Phe
1                               5                               10                               15

Gly Ser Asn Ile Arg Pro Asn Val Ala Thr Leu Glu Pro Lys Thr Val
20                               25                               30

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Cys Tyr Tyr Glu Ser Trp Val His Trp Arg Gln Gly Glu Gly Lys Met
 35 40 45

Asp Pro Glu Asp Ile Asp Thr Ser Leu Cys Thr His Ile Val Tyr Ser
 50 55 60

Tyr Phe Gly Ile Asp Ala Ala Thr His Glu Ile Lys Leu Leu Asp Glu
 65 70 75 80

Tyr Leu Met Lys Asp Leu His Asp Met Glu His Phe Thr Gln His Lys
 85 90 95

Gly Asn Ala Lys Ala Met Ile Ala Val Gly Gly Ser Thr Met Ser Asp
 100 105 110

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Val Glu His Tyr Arg Glu Thr Phe Val
 115 120 125

Val Ser Thr Val Asp Leu Met Thr Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Val Met
 130 135 140

Ile Asp Trp Ser Gly Met Gln Ala Lys Asp Ser Asp Asn Phe Ile Lys
 145 150 155 160

Leu Leu Asp Lys Phe Asp Glu Lys Phe Ala His Thr Ser Phe Val Met
 165 170 175

Gly Val Thr Leu Pro Ala Thr Ile Ala Ser Tyr Asp Asn Tyr Asn Ile
 180 185 190

Pro Ala Ile Ser Asn Tyr Val Asp Phe Met Asn Val Leu Ser Leu Asp
 195 200 205

Tyr Thr Gly Ser Trp Ala His Thr Val Gly His Ala Ser Pro Phe Pro
 210 215 220

Glu Gln Leu Lys Thr Leu Glu Ala Tyr His Lys Arg Gly Ala Pro Arg
 225 230 235 240

His Lys Met Val Met Ala Val Pro Phe Tyr Ala Arg Thr Trp Ile Leu
 245 250 255

Glu Lys Met Asn Lys Gln Asp Ile Gly Asp Lys Ala Ser Gly Pro Gly
 260 265 270

Pro Arg Gly Gln Phe Thr Gln Thr Asp Gly Phe Leu Ser Tyr Asn Glu
 275 280 285

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AI-2-C4-PCT.ST25.txt

Leu Cys Val Gln Ile Gln Ala Glu Thr Asn Ala Phe Thr Ile Thr Arg
290 295 300

Asp His Asp Asn Thr Ala Ile Tyr Ala Val Tyr Val His Ser Asn His
305 310 315 320

Ala Glu Trp Ile Ser Phe Glu Asp Arg His Thr Leu Gly Glu Lys Ala
325 330 335

Lys Asn Ile Thr Gln Gln Gly Tyr Ala Gly Met Ser Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Ser Asn Glu Asp Val His Gly Val Cys Gly Asp Lys Asn Pro Leu Leu
355 360 365

His Ala Ile Gln Ser Asn Tyr Tyr His Gly Val Val Thr Glu Pro Thr
370 375 380

Val Val Thr Leu Pro Pro Val Thr His Thr Thr Glu His Val Thr Asp
385 390 395 400

Ile Pro Gly Val Phe His Cys His Glu Glu Gly Phe Phe Arg Asp Lys
405 410 415

Thr Tyr Cys Ala Thr Tyr Tyr Glu Cys Lys Lys Gly Asp Phe Gly Leu
420 425 430

Glu Lys Thr Val His His Cys Ala Asn His Leu Gln Ala Phe Asp Glu
435 440 445

Val Ser Arg Thr Cys Ile Asp His Thr Lys Ile Pro Gly Cys
450 455 460

<210> 52
<211> 1445
<212> DNA
<213> Dermatophagoides farinae

<400> 52
tttttttttt ttttttttaa agtgattgta attttatttg tattcaacaa ccgggtatit 60
tggtatgato aatacatgto cgacttactt cgtcaaatgc ctgtaagtga ttggcacaat 120
gatgcacggt tttctccagt ccaaaaatgc cttttttgca ttctgtatgt gtggcacaat 180
aggctttatc gcggaagaat ccttcttcat ggcaatgaaa cagccttgggt atatcggtca 240
catgttctgt tgtatgtgtg actggaggaa gtgtaacgac ggtcggttcg gttaccacgc 300
catgataata gttcgattgg atagcatgca acaaagggtt tttatcacca caaacgccgt 360
gcacatcttc gttggacaat gtgtagactg acattccagc atatccttctg tgggttatgt 420

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt
 tttttgcttt ttcaccaagt gtatgtcggg ctctgaaaga gatccattct gcatgggttc 480
 tatgcacata gacagcgtaa attgcggtat tatcatgato acgagtaagt gtgaatgcat 540
 tcgtttcggc ctgaatctga acgcacaatt cgtttagct aaggaaacca tcagctctgtg 600
 taaactgacc tcgtgggccc ggtcoactag ctttatcgcc aatgtcctgt ttgttcattt 660
 tctcgagaat ccaggtacgt gcataaaatg gtacagccat gaccatctta tgacgtggag 720
 cgctcgttt gtggttaagct tctagcgttt tgagttgttc aggaacgga gaagcatgac 780
 cgaccgtatg ggcccattgat ccagtgtaat ccagactaag cacgttcata aaatcgacat 840
 agttggagat ggccaggaatg ttatagttat cgtatgatgc gatcgttgc ggcaaggtaa 900
 caccatcac aaacgaggtg tgagcaact tttcgtgaa ttgtccaac aattaatga 960
 aattatcact atctttggct tgcctgccc accaatcaat catgacacca tcgaaaccat 1020
 aacgagtcac aagatcaact gtgctaaca caaacgttcc cggataatgt tctaccgctg 1080
 cagcttggga aaattgatcg gacatagtcg aaccaccgac ggcgatcatg gctttggcgt 1140
 tgccttatg ctgctgaaa tgttccatgt catgtaante ttccataaga tattcatcca 1200
 atagtttaat ctcatgagtg gcagcatcaa tgcgaaata agagtagaca atgtgagtac 1260
 acaacagtg atctatgtct tcgggatcca tttgccttc acctggcgc caatgtacc 1320
 aagattcata gtaacatata gttttaggtt ccaagttgc cacattcga cgaatattg 1380
 aaccgaaaca agcggcaagt acggccaata cagtcaaga gaatcagtc atttttatt 1440
 gggat 1445

<210> 53

<211> 1386

<212> DNA

<213> Dermatophagoides farinae

<400> 53

atgactcgat tctctttgac tgtattggcc gtacttgcg cttgtttcgg ttcaaatatt 60
 cgtccgaatg tggcaacttt ggaacctaaa actgtatggt actatgaatc ttgggtacat 120
 tgggccaag gtgaaggcaa aatgatccc gaagacatag atacatcgtt gtgtactcac 180
 attgtctact cttatttcgg cattgatgct gccactcatg agattaaact attggtgaa 240
 tatcttatga aagatttaca tgacatggaa catttcacgc agcataaggg caacgcaaaa 300
 gccatgatcg ccgtcggtgg ttccactatg tccgatcaat ttccaagac tgcagcggta 360
 gaaattatc gggaaacgtt tgttgttagc acagttgate ttatgaactg ttatggtttc 420
 gatgggtgca tgattgattg gtctggcatg caagccaag atagtataa ttcatbaaa 480
 ttgttgaca aattcgacy aaagtttct cacacctcgt ttgtgatggg tgttaccttg 540
 ccggcaacga tcgcatcata cgataactat aacattcctg ccatctccaa ctatgtogat 600
 tttatgaacg tgcttagtct ggattacact ggatcaggg cccatcggg cggtcagtct 660

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

tctccgttct ctgaacaact caaaacgcta gaagcttacc acaaacgagc cgctccacgt 720
cataagatgg tcatggctgt accatthttat gcacgtacct ggattcloga gaaaatgaac 780
aaacaggaca ttggcgataa agctagtggc ccaggcccac gaggtcagtt tacacagact 840
gatggtttcc tttagctacaa cgaattgtgc gttcagattc aggccgaaac gaatgcattc 900
accattactc gtgatcatga taataccgca atttacgctg tctatgtgca tagcaacct 960
gcagaatgga tctctttcga agaccgacat acacttggtg aaaaagcaaa aaacataacc 1020
caacaaggat atgctggaat gtcagcttac acattgtcca acgaagatgt gcacggcgtt 1080
tgtgtgataa aaaaaccttt gttgcatgct atccaatcga actattatca tggcgtggta 1140
accgaaccga ccgtcgttac acttccctca gtcacacata caacagaaca tgtgaccgat 1200
ataccaggcg tgtttcatcg ccatgaagaa ggattcttcc gcgataagac ctattgtgcc 1260
acatactacc aatgcacaaa aggcgatttt ggactggaga aaacctgca tcattgtgcc 1320
aatcacttac aggcatttga cgaagtaagt cggacatgta ttgatcatac caaaataccc 1380
ggttgt 1386

```

<210> 54

<211> 1386

<212> DNA

<213> Dermatophagoides farinae

<400> 54

```

acaaccgggt attttggat gatcaataca tctccgactt acttcgtcaa atgcctgtaa 60
gtgattggca caatgatgca cgtttttctc cagtcacaaa tgcctttttt tgcattcgta 120
gtatgtggca caataggtct tatcgcgga gaatccttct tcatggcaat gaacacggcc 180
tggatctatc gtcacatggt ctgtgtgatg tgtgactgga ggaagtgtaa cgcaggtcgg 240
ttcggttacc acgcatgat aatagttcga ttggatagca tgcacaaaag ggtttttacc 300
accacaaacg ccgtgcacat ctctgttggc caatgtgtag actgacattc cagcatatcc 360
ttgttgggtt atgttttttg ctttttcacc aagtgtatgt cggctctcga aagagatcca 420
ttctgcattg ttgctatgca catagacagc gtaaatgcyg gtattatcat gatcacgagt 480
aatggtgaat gcattcgttt cggcctgaat ctgaacgcac aattcgttgt agctaaggaa 540
accatcagtc tgtgtaaact gacctcgtgg gcctgttcca ctactttat cgccaatgtc 600
ctgtttgttc attttctcga gaatccaggt acgtgcataa aatggtacag ccatagccat 660
cttatgacgt gggagcctc gtttgtggta agcttctagc gttttgagtt gttcaggaaa 720
cggagaagca tgacogaccg tatgggcccc tgatccagty taatccagac taagcaogtt 780
cataaaatcg acatagttgg agatggcagc aatgttatag ttatcgtatg atgogacgt 840
tgcggcgaag gtaacaccca tcacaaacga ggtgtgagca aacttttctg cgaatttctc 900

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

caacaattta atgaaattat cactatcttt ggcttgcctg ccagaccaat caatcatgac 960
accatcgaaa ccataacgag tcataagatc aactgtgcta acascaaacg tttcccgata 1020
atgttctacc gctgcagtct tggaaaattg atcggacata gtcgaaccac cgacggcgat 1080
catggctttg cgtttgccct tatgctgctg gaaatgttcc atgtcatgta aatctttcat 1140
aagatattca tccaatagtt taatctcatg agtggcagca tcaatgccga aataagagta 1200
gacaatgtga gtacacaacg atgtatctat gtcttcggga tccattttgc ettcaccttg 1260
ggcccaatgt acccaagatt catagtaaca tacagtttta ggttccaag ttgccacatt 1320
cggacgaata tttgaaccga aacaagcggc aagtacggcc aatacagta aagagaatcg 1380
agtcatt 1386

<210> 55
<211> 1236
<212> DNA
<213> Dermatophagoides farinae

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1236)
<223>

<400> 55
act ttg gaa cct aaa act gta tgt tac tat gaa tct tgg gta cat tgg 48
Thr Leu Glu Pro Lys Thr Val Cys Tyr Tyr Glu Ser Trp Val His Trp
1 5 10 15
cgc caa ggt gaa ggc aaa atg gat ccc gaa gac ata gat aca tcg ttg 96
Arg Gln Gly Glu Gly Lys Met Asp Pro Glu Asp Ile Asp Thr Ser Leu
20 25 30
tgt act cac att gtc tac tct tat ttc gcc att gat gct gcc act cat 144
Cys Thr His Ile Val Tyr Ser Tyr Phe Gly Ile Asp Ala Ala Thr His
35 40 45
gag att aaa cta ttg gat gaa tat ctt atg aaa gat tta cat gac atg 192
Glu Ile Lys Leu Leu Asp Glu Tyr Leu Met Lys Asp Leu His Asp Met
50 55 60
gaa cat ttc acg cag cat aag ggc aac gcc aaa gcc atg atc gcc gtc 240
Glu His Phe Thr Gln His Lys Gly Asn Ala Lys Ala Met Ile Ala Val
65 70 75 80
ggg ggt tgc act atg tcc gat caa ttt tcc aag act gca gcg gta gaa 288
Gly Gly Ser Thr Met Ser Asp Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Val Glu
85 90 95
cat tat cgg gaa acg ttt gtt gtt agc aca gtt gat ctt atg act cgt 336
His Tyr Arg Glu Thr Phe Val Val Ser Thr Val Asp Leu Met Thr Arg
100 105 110
tat ggt ttc gat ggt gtc atg att gat tgg tct gcc atg caa gcc aaa 384
Tyr Gly Phe Asp Gly Val Met Ile Asp Trp Ser Gly Met Gln Ala Lys
115 120 125
gat agt gat aat ttc att aaa ttg ttg gac aaa ttc gac gaa aag ttt 432
50

```

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Asp Ser Asp Asn Phe Ile Lys Leu Leu Asp Lys Phe Asp Glu Lys Phe	
130	135 140
gct cac acc teg ttt gtg atg ggt gtt acc ttg ccg gca acg atc gca	480
Ala His Thr Ser Phe Val Met Gly Val Thr Leu Pro Ala Thr Ile Ala	
145	155 160
tca tac gat aac tat aac att cct gcc atc tcc aac tat gtc gat ttt	528
Ser Tyr Asp Asn Tyr Asn Ile Pro Ala Ile Ser Asn Tyr Val Asp Phe	
165	170 175
atg aac gtg ctt agt ctg gat tac act gga tca tgg gcc cat acg gtc	576
Met Asn Val Leu Ser Leu Asp Tyr Thr Gly Ser Trp Ala His Thr Val	
180	185 190
ggt cat gct tct cag ttt cct gaa caa ctc aaa acg cta gaa gct tac	624
Gly His Ala Ser Pro Phe Pro Glu Gln Leu Lys Thr Leu Glu Ala Tyr	
195	200 205
cac aaa cga ggc gct cca cgt cat aag atg gtc atg gct gta cca ttt	672
His Lys Arg Gly Ala Pro Arg His Lys Met Val Met Ala Val Pro Phe	
210	215 220
tat gca cgt acc tgg att ctc gag aaa atg aac aaa cag gac att ggc	720
Tyr Ala Arg Thr Trp Ile Leu Glu Lys Met Asn Lys Gln Asp Ile Gly	
225	230 235 240
gat aaa gct agt gga cca ggc cca cga ggt cag ttt aca cag act gat	768
Asp Lys Ala Ser Gly Pro Gly Pro Arg Gly Gln Phe Thr Gln Thr Asp	
245	250 255
ggt ttc ctt agc tac aac gaa ttg tgc gtt cag att cag gcc gaa acg	816
Gly Phe Leu Ser Tyr Asn Glu Leu Cys Val Gln Ile Gln Ala Glu Thr	
260	265 270
aat gca ttc acc att act cgt gat cat gat aat acc gca att tac gct	864
Asn Ala Phe Thr Ile Thr Arg Asp His Asp Asn Thr Ala Ile Tyr Ala	
275	280 285
gtc tat gtg cat agc aac cat gca gaa tgg atc tct ttc gaa gac cga	912
Val Tyr Val His Ser Asn His Ala Glu Trp Ile Ser Phe Glu Asp Arg	
290	295 300
cat aca ctt ggt gaa aaa gca aaa aac ata acc caa caa gga tat got	960
His Thr Leu Gly Glu Lys Ala Lys Asn Ile Thr Gln Gln Gly Tyr Ala	
305	310 315 320
gga atg tca gtc tac aca ttg tcc aac gaa gat gtg cac ggc gtt tgt	1008
Gly Met Ser Val Tyr Thr Leu Ser Asn Glu Asp Val His Gly Val Cys	
325	330 335
ggt gat aaa aac cct ttg ttg cat gct atc caa tgg aac tat tat cat	1056
Gly Asp Lys Asn Pro Leu Leu His Ala Ile Gln Ser Asn Tyr Tyr His	
340	345 350
ggc gtg gta acc gaa ccg acc gtc gtt aca ctt cct cca gtc aca cat	1104
Gly Val Val Thr Glu Pro Thr Val Val Thr Leu Pro Pro Val Thr His	
355	360 365
aca aca gaa cat gtg acc gat ata cca ggc gtg ttt cat tgc cat gaa	1152
Thr Thr Glu His Val Thr Asp Ile Pro Gly Val Phe His Cys His Glu	
370	375 380
gaa gga ttc ttc cgc gat aag acc tat tgt gcc aca tac tac gaa tgc	1200
	51

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

Glu Gly Phe Phe Arg Asp Lys Thr Tyr Cys Ala Thr Tyr Tyr Glu Cys
 385 390 395 400

aaa aaa ggc gat ttt gga ctg gag aaa acc gtg cat 1236
 Lys Lys Gly Asp Phe Gly Leu Glu Lys Thr Val His
 405 410

<210> 56
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Dermatophagoides farinae

<400> 56

Thr Leu Glu Pro Lys Thr Val Cys Tyr Tyr Glu Ser Trp Val His Trp
 1 5 10 15

Arg Gln Gly Glu Gly Lys Met Asp Pro Glu Asp Ile Asp Thr Ser Leu
 20 25 30

Cys Thr His Ile Val Tyr Ser Tyr Phe Gly Ile Asp Ala Ala Thr His
 35 40 45

Glu Ile Lys Leu Leu Asp Glu Tyr Leu Met Lys Asp Leu His Asp Met
 50 55 60

Glu His Phe Thr Gln His Lys Gly Asn Ala Lys Ala Met Ile Ala Val
 65 70 75 80

Gly Gly Ser Thr Met Ser Asp Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Val Glu
 85 90 95

His Tyr Arg Glu Thr Phe Val Val Ser Thr Val Asp Leu Met Thr Arg
 100 105 110

Tyr Gly Phe Asp Gly Val Met Ile Asp Trp Ser Gly Met Gln Ala Lys
 115 120 125

Asp Ser Asp Asn Phe Ile Lys Leu Leu Asp Lys Phe Asp Glu Lys Phe
 130 135 140

Ala His Thr Ser Phe Val Met Gly Val Thr Leu Pro Ala Thr Ile Ala
 145 150 155 160

Ser Tyr Asp Asn Tyr Asn Ile Pro Ala Ile Ser Asn Tyr Val Asp Phe
 165 170 175

Met Asn Val Leu Ser Leu Asp Tyr Thr Gly Ser Trp Ala His Thr Val
 180 185 190

Gly His Ala Ser Pro Phe Pro Glu Gln Leu Lys Thr Leu Glu Ala Tyr
 52

WO 02/22807

PCT/US01/28730

195 AL-2-C4-PCT.ST25.txt 200 205

His Lys Arg Gly Ala Pro Arg His Lys Met Val Met Ala Val Pro Phe
210 215 220

Tyr Ala Arg Thr Trp Ile Leu Glu Lys Met Asn Lys Gln Asp Ile Gly
225 230 235 240

Asp Lys Ala Ser Gly Pro Gly Pro Arg Gly Gln Phe Thr Gln Thr Asp
245 250 255

Gly Phe Leu Ser Tyr Asn Glu Leu Cys Val Gln Ile Gln Ala Glu Thr
260 265 270

Asn Ala Phe Thr Ile Thr Arg Asp His Asp Asn Thr Ala Ile Tyr Ala
275 280 285

Val Tyr Val His Ser Asn His Ala Glu Trp Ile Ser Phe Glu Asp Arg
290 295 300

His Thr Leu Gly Glu Lys Ala Lys Asn Ile Thr Gln Gln Gly Tyr Ala
305 310 315 320

Gly Met Ser Val Tyr Thr Leu Ser Asn Glu Asp Val His Gly Val Cys
325 330 335

Gly Asp Lys Asn Pro Leu Leu His Ala Ile Gln Ser Asn Tyr Tyr His
340 345 350

Gly Val Val Thr Glu Pro Thr Val Val Thr Leu Pro Pro Val Thr His
355 360 365

Thr Thr Glu His Val Thr Asp Ile Pro Gly Val Phe His Cys His Glu
370 375 380

Glu Gly Phe Phe Arg Asp Lys Thr Tyr Cys Ala Thr Tyr Tyr Glu Cys
385 390 395 400

Lys Lys Gly Asp Phe Gly Leu Glu Lys Thr Val His
405 410

<210> 57
<211> 1236
<212> DNA
<213> Dermatophagoides farinae

<400> 57
atgcacggtt ttctccagtc caaaatcgcc ttttttgcac tcgtagtatg tggcacaata 60
ggtcttatcg cggaagaatc cttcttcgat gcaatgaaac acgcttggtg tctcgtctac 120
53

WO 02/22807

PCT/US01/28730

AL-2-C4-PCT.ST25.txt

```

atgttctggt gtatgtgtga ctggaggaag tetaacgacg gtcggttcgg ttaccaagcc 180
atgataatag ttcgattgga tagcatgcaa caaagggttt ttatcaaccac aaacgcctg 240
cacatcttcg ttggacaatg tglagaactga cattccagca tatccttggt gggttatggt 300
ttttgctttt tcaccaagtg tatgtcggtc ttcgaaagag atcoattctg catggttgct 360
atgcacatag acagcgtaaa ttgcggtatt atcatgatca cgagtaatgg tgaatgcatt 420
cgtttcggcc tgaatctgaa cgcacaattc gttgtagcta aggaaccat cagtctgtgt 480
aaactgaact cgtgggctg gtccaactgc tttatcgcca atgtcctggt tgttcaat 540
ctcgagaatc caggtacgtg cataaaatgg tacagccatg accatcttat gacgtggagc 600
gcctcgtttg tggtaagctt ctacgctttt gaggtttca ggaacggag aagcatgacc 660
gaccgatgg gcccatgac cagtgtaatc cagactaagc acgttcataa aatcgacata 720
gttgagatg gcaggaatgt tatagttatc gtatgatgcg atcgttgcg gcaaggtaac 780
accatcaca aacgaggtgt gagcaactt ttcgtcgaat ttgtccaaca attaatgaa 840
attactacta tctttggctt goatgcaga ccaatcaatc atgacaccat cgaacoata 900
acgagtcata agatcaactg tgctaacaac aaacgtttcc cgataatggt ctaccgctgc 960
agtcttggea aattgatcgg acatagtcga accacogacg gcgatcatgg ctttggcgtt 1020
gcccttatgc tgcgtgaaat gttccatgtc atgtaaatct ttcataagat attcatcaa 1080
tagttaatc tcatgagtg cagcatcaat gccgaaataa gagtagaca tgtgagtaca 1140
caacgatgta tctatgtctt cgggatccat tttgccttca ccttggcgcc aatgtacca 1200
agattcatag taacatacag ttttaggttc caaagt 1236

```

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/022807 A3

(51) International Patent Classification: C12N 15/00

IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) International Application Number: PCT/US01/28730

(22) International Filing Date:
14 September 2001 (14.09.2001)

Declarations under Rule 4.17:

as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(i)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW. ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/662,293 14 September 2000 (14.09.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): HESKA CORPORATION [US/US]; 1613 Prospect Parkway, Fort Collins, CO 80525 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MCCALL, Catherine, A. [GB/US]; 709 Pleasant Street, Boulder, CO 80302 (US). HUNTER, Shirley, Wu [US/US]; 2325 Tanglewood Drive, Fort Collins, CO 80525 (US). WEBER, Eric, R. [US/US]; 2625 Silver Creek Drive, Fort Collins, CO 80525 (US).

(74) Agents: VERSER, Carol, Talkington et al.; Tleska Corporation, 1613 Prospect Parkway, Fort Collins, CO 80525 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FR, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Published:

with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
22 May 2003

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: DERMATOPHAGOIDES NUCLEIC ACID MOLECULES, PROTEINS AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to high molecular weight *Dermatophagoides* proteins, nucleic acid molecules encoding such proteins, and therapeutic and diagnostic reagents derived from such proteins.

WO 02/022807 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/28730
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/00		
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 C12N C07K		
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) BIOSIS, EPO-Internal, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 54349 A (HESKA CORP) 28 October 1999 (1999-10-28) Seq.Id.No. 1-49 100% identical to Seq.Id.No. 1-49 the whole document	1-30
<input 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		*S* 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 4 December 2002	Date of mailing of the international search report 12/12/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 540-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 540-3016	Authorized officer Petri, B	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
	International application No. PCT/US 01/28730
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. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 21-23, 29-30 are directed to a method of treatment and/or a diagnostic method practised of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. <input type="checkbox"/>	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. <input type="checkbox"/>	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	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input checked="" type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input type="checkbox"/>	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	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01 28730

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1: Claims 1-30 (partially)

Proteins and nucleic acids relating to the protein termed "Derf98" (Seq. Id. Nos.: 14-22)

1.1. Claims: Invention 2: Claims 1-30 (partially)

Proteins and nucleic acids relating to the protein termed "Derp98" (Seq. Id. Nos.: 34-42)

1.2. Claims: Invention 3: Claims 1-30 (partially)

Proteins and nucleic acids relating to the protein termed "Derf60" (Seq. Id. Nos.: 43-45)

1.3. Claims: Inventions 4-20: claims 5-30 (partially)

Proteolytic fragments (Seq. Id. Nos. 1-13, 23-24, 29-33) some termed Map 1-16 (Seq. Id. Nos. 1-12, 29-32) and proteins comprising the same.

Please note that all inventions mentioned under item 1, although not necessarily linked by a common inventive concept, could be searched without effort justifying an additional fee.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/28730

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9954349 A	28-10-1999	AU 3652199 A	08-11-1999
		CA 2325391 A1	28-10-1999
		EP 1071709 A2	31-01-2001
		JP 2002512253 T	23-04-2002
		WO 9954349 A2	28-10-1999
		US 6455686 B1	24-09-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/435	C 0 7 K 14/435	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 N 7/00	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	Q
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 ハンター, シャーリー ウー
 アメリカ合衆国 コロラド 8 0 5 2 5, フォート コリンズ, タングルウッド ドライブ
 2 3 2 5

(72)発明者 ウェバー, エリック アール.
 アメリカ合衆国 コロラド 8 0 5 2 5, フォート コリンズ, シルバー クリーク ドライブ
 2 6 2 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA43 CA04 DA06 EA04 GA11 HA01 HA14
 HA15
 4B065 AA26X AA99Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA43 CA46
 4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 BA01 BA22 BA23 CA53 DC50 NA14
 ZB132
 4C085 AA13 AA14 BB11 CC04 DD22 EE01
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB13
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA50 DA75 DA86 EA31 EA50
 FA74

专利名称(译)	Dermatophagoides核酸分子，蛋白质及其用途		
公开(公告)号	JP2004529605A	公开(公告)日	2004-09-30
申请号	JP2002527249	申请日	2001-09-14
[标]申请(专利权)人(译)	六斯卡公司		
申请(专利权)人(译)	Hesuka公司		
[标]发明人	マツコールキャサリンエイ ハンターシャーリーウー ウェバーエリックアール		
发明人	マツコール, キャサリン エイ. ハンター, シャーリー ウー ウェバー, エリック アール.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7052 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P37/08 C07K14/435 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/09		
CPC分类号	A61P37/08 C07K14/43531		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7052 A61K39/395.D A61K39/395.Q A61K45/00 A61P37/08 C07K14/435 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 G01N33/53.D G01N33/53.Q C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA15 4B065/AA26X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084 /AA17 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB132 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC04 4C085/DD22 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086 /AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA50 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045 /EA31 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	09/662293 2000-09-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及高分子量皮肤癣菌蛋白，编码此类蛋白的核酸分子以及衍生自此类蛋白的治疗剂和诊断剂。本发明涉及具有约60 (kd或kD) ，70kD或约98kD至约109kD的分子量的新型蛋白质。此类蛋白质包含鳞皮蛋白过敏原的至少一个表位，在本文中称为Der HMW-map蛋白。本发明还提供了全长蛋白质或成熟蛋白质的片段或肽的蛋白质，以及任何此类蛋白质的抗体，模拟表位或突变蛋白。

ネコノ番号	HDM	全 Der p	全 Der f	mapAおよびmapB	mapC
1	+	54	173	211	400
2	+	437	454	245	352
3	+	96	88	17	36
4	+	35	179	278	758
5	+	123	23	0	0
6	+	2	10	0	0
7	+	84	321	439	445
8	+	125	333	611	599
9	+	2459	2737	1613	507
10	+	17	0	0	0
11	+	146	347	243	586
12	+	31	100	102	223
13	+	56	171	267	292
14	+	121	146	163	185
15	-	0	0	0	8
16	-	0	0	0	0
17	-	0	0	0	0
18	-	0	0	0	0
19	-	0	0	0	0
20	-	0	0	0	0
21	-	23	0	0	0