

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-181463
(P2007-181463A)

(43) 公開日 平成19年7月19日(2007.7.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C O 7 K 14/435 (2006.01)	C O 7 K 14/435	4 B 0 6 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Q	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	

審査請求 有 請求項の数 14 O L (全 104 頁)

(21) 出願番号	特願2007-2304 (P2007-2304)	(71) 出願人	500116487
(22) 出願日	平成19年1月10日 (2007.1.10)		ヘスカ コーポレーション
(62) 分割の表示	特願平8-512718の分割		アメリカ合衆国 コロラド 80538,
原出願日	平成7年10月6日 (1995.10.6)		ラブランド, ロッキー マウンテン
(31) 優先権主張番号	319,590		アベニュー 3760
(32) 優先日	平成6年10月7日 (1994.10.7)	(74) 代理人	100068755
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 恩田 博宣
(31) 優先権主張番号	487,001	(74) 代理人	100105957
(32) 優先日	平成7年6月7日 (1995.6.7)		弁理士 恩田 誠
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	フランク、グレン アール,
(31) 優先権主張番号	487,608		アメリカ合衆国 80549 コロラド州
(32) 優先日	平成7年6月7日 (1995.6.7)		ウエリントン ノース カウンティー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ロード サーティーン 10317
(特許庁注: 以下のものは登録商標)			
1. テフロン			最終頁に続く

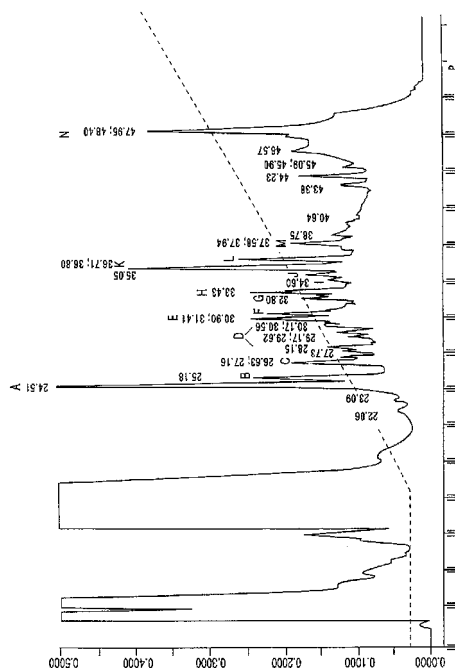
(54) 【発明の名称】 新規な外部寄生生物唾液タンパク質及びそのようなタンパク質を収集する装置

(57) 【要約】

【課題】 外部寄生生物唾液タンパク質を単離するための新規な生成物及び方法、並びに動物のアレルギー性皮膚炎を検出及び/又は処置するための新規な生成物及び方法を提供すること。

【解決手段】 実質的に混入物質を持たない外部寄生生物唾液タンパク質を収集することができる唾液タンパク質収集装置を包含する。また、外部寄生生物唾液タンパク質、同タンパク質をコードする配列を有する核酸分子、及び同タンパク質に対して生じる抗体を含む。更に、そのようなタンパク質を入手し、そして同タンパク質を用いてアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有する動物を同定する方法を包含する。更にまた、そのようなタンパク質を含む治療用組成物及びアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有する動物を処置するための利用を包含する。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの単離された外部寄生生物唾液タンパク質を含む組成物であって、ここで前記外部寄生生物唾液タンパク質は、アミノ酸配列の少なくとも一部分を含み、ここで前記部分は、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、第一のノミ唾液抽出物、第二のノミ唾液抽出物及び第三のノミ唾液抽出物からなる群から選択されるノミ唾液抽出物中に存在するノミ唾液タンパク質をコードする核酸分子の相補物とハイブリダイズする核酸分子によってコードされている組成物において、

前記第一のノミ唾液抽出物、前記第二のノミ唾液抽出物及び前記第三のノミ唾液抽出物は、(a)外部寄生生物を含む唾液収集装置内の収集手段上の外部寄生生物唾液産生物を収集する工程と、(b)前記唾液産生物を前記収集手段から抽出して前記組成物を作製する工程と、を含む方法であって、前記装置が(i)チャンパーに操作可能に連結されたハウジングと、(ii)前記ハウジングと前記チャンパーとの間のインターフェースとを備え、前記インターフェースが、(1)前記装置内に保持された外部寄生生物によって沈積された唾液産生物の少なくとも一部を収集し得る手段と、(2)混入物質が前記収集手段に接触するのを妨げることができる障壁手段とを含み、前記チャンパーが、前記ハウジングよりも暖かい周囲温度を有し、それにより前記ハウジングと前記チャンパーとの間に温度の差異が形成され、前記ハウジングにより前記外部寄生生物が保持され、かつ前記温度の差異が前記ハウジング内に保持された外部寄生生物を引きつけ、前記障壁手段及び収集手段によって給餌し、それにより唾液産生物が前記収集手段上に沈積される方法によって得られ、

前記第一のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.8%のアセトニトリルに溶解可能であり、

前記第二のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.9乃至50%のアセトニトリルに溶解可能であり、かつ

前記第三のノミ唾液抽出物はアニオン交換収集手段により収集されるとともにリン酸塩緩衝溶液中の1M NaClを含む溶媒に溶解可能である組成物。

【請求項 2】

少なくとも1つの単離された外部寄生生物唾液タンパク質を含む組成物であって、ここで同外部寄生生物唾液タンパク質は、アミノ酸配列の少なくとも一部分を含み、ここで同部分は、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、図2においてピークA乃至Lからなる群より選択されるピークにより示されるタンパク質のクラマトグラフィー溶出プロファイルを有するノミ唾液タンパク質をコードす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組成物において、前記クロマトグラフィーは、約0.1% TFA水溶液から約0.085%のTFAを含む90% CH₃CN溶液までの勾配を用いたC4カラムにおいて0.8ml/分の流速にて75分にわたり実施される、組成物。

【請求項 3】

非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有しているかをテストするための検定キットであって、前記キットは：

(a)少なくとも1つの単離された外部寄生生物唾液タンパク質を含む組成物と、

(b)前記非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有しているかを決定するための手段と、

を備え、

前記外部寄生生物唾液タンパク質はアミノ酸配列の少なくとも一部分を含み、かつ前記部分は、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、第一のノミ唾液抽出物、第二のノミ唾液抽出物及び第三のノミ唾液抽出物からなる群から選択されるノミ唾液抽出物に存在するノミ唾液タンパク質をコードする核酸分子とハイブリダイズする核酸分子によりコードされており、

前記手段において、前記非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有しているかを同定するために前記組成物が使用され、

前記第一のノミ唾液抽出物、前記第二のノミ唾液抽出物及び前記第三のノミ唾液抽出物は、(a)外部寄生生物を含む唾液収集装置内の収集手段上の外部寄生生物唾液産生物を収集する工程と、(b)前記唾液産生物を前記収集手段から抽出して前記組成物を作製する工程と、を含む方法であって、前記装置が(i)チャンパーに操作可能に連結されたハウジングと、(ii)前記ハウジングと前記チャンパーとの間のインターフェースとを備え、前記インターフェースが、(1)前記装置内に保持された外部寄生生物によって沈積された唾液産生物の少なくとも一部を収集し得る手段と、(2)混入物質が前記収集手段に接触するのを妨げることができる障壁手段とを含み、前記チャンパーが、前記ハウジングよりも暖かい周囲温度を有し、それにより前記ハウジングと前記チャンパーとの間に温度の差異が形成され、前記ハウジングにより前記外部寄生生物が保持され、かつ前記温度の差異が前記ハウジング内に保持された外部寄生生物を引きつけ、前記障壁手段及び収集手段によって給餌し、それにより唾液産生物が前記収集手段上に沈積される方法によって得られ、

10

前記第一のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.8%のアセトニトリルに溶解可能であり、

前記第二のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.9乃至50%のアセトニトリルに溶解可能であり、かつ

前記第三のノミ唾液抽出物はアニオン交換収集手段により収集されるとともにリン酸塩緩衝溶液中の1M NaClを含む溶媒に溶解可能である、
検定キット。

20

【請求項4】

請求項1に記載の組成物を生成する方法であって、前記組成物は混入物質を含んでおらず、前記方法は、以下の工程：

(a)外部寄生生物を含む唾液収集装置内の収集手段上の外部寄生生物唾液産生物を収集する工程と、

(b)前記産生物を前記収集手段から抽出して前記組成物を作製する工程と、
を含み、

前記装置は(i)チャンパーに操作可能に連結されたハウジングと、(ii)前記ハウジングと前記チャンパーとの間のインターフェースと、を備え、

前記インターフェースは、(1)前記装置内に保持された外部寄生生物によって沈積された唾液産生物の少なくとも一部を収集し得る手段と、(2)混入物質が前記収集手段に接触するのを妨げることができる障壁手段と、を含み、

30

前記チャンパーは、前記ハウジングよりも暖かい周囲温度を有し、それにより前記ハウジングと前記チャンパーとの間に温度の差異が形成され、

前記ハウジングにより前記外部寄生生物が保持され、かつ

前記温度の差異が前記ハウジング内に保持された外部寄生生物を引きつけ、前記障壁手段及び収集手段によって給餌し、それにより唾液産生物が前記収集手段上に沈積される、
方法。

【請求項5】

非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有しているかを
同定するための方法であって、前記方法は：

40

(a)前記非ヒト動物上のある部位に少なくとも一つの単離された外部寄生生物唾液タンパク質を含む組成物を投与し、かつ前記非ヒト動物上の別の部位に、陽性対照溶液及び陰性対照溶液からなる群から選択されるコントロール溶液を投与する工程と、

(b)前記組成物の投与に起因する反応を前記コントロール溶液の投与に起因する反応と比較する工程と、
を含み、

前記外部寄生生物唾液タンパク質はアミノ酸配列の少なくとも一部分を含み、かつ前記部分は、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、第一のノミ唾液抽出物、第二のノミ唾液抽出物及び第三のノミ唾液抽出物からなる群から選択されるノミ唾液抽出物に存在する

50

ノミ唾液タンパク質をコードする核酸分子とハイブリダイズする核酸分子によりコードされており、

前記非ヒト動物は、前記組成物に対する反応が少なくとも前記陽性対照溶液に対する反応と同じくらい大きい場合にアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有していると決定され、かつ前記非ヒト動物は、前記組成物に対する反応が前記陰性対照溶液に対する反応と同じくらいのサイズである場合にアレルギー性皮膚炎に対して感受性でないか若しくはそれを有していないと決定され、

前記第一のノミ唾液抽出物、前記第二のノミ唾液抽出物及び前記第三のノミ唾液抽出物は、(a)外部寄生生物を含む唾液収集装置内の収集手段上の外部寄生生物唾液産生物を収集する工程と、(b)前記唾液産生物を前記収集手段から抽出して前記組成物を作製する工程と、を含む方法であって、前記装置が(i)チャンパーに操作可能に連結されたハウジングと、(ii)前記ハウジングと前記チャンパーとの間のインターフェースとを備え、前記インターフェースが、(1)前記装置内に保持された外部寄生生物によって沈積された唾液産生物の少なくとも一部を収集し得る手段と、(2)混入物質が前記収集手段に接触するのを妨げることができる障壁手段とを含み、前記チャンパーが、前記ハウジングよりも暖かい周囲温度を有し、それにより前記ハウジングと前記チャンパーとの間に温度の差異が形成され、前記ハウジングにより前記外部寄生生物が保持され、かつ前記温度の差異が前記ハウジング内に保持された外部寄生生物を引きつけ、前記障壁手段及び収集手段によって給餌し、それにより唾液産生物が前記収集手段上に沈積される方法によって得られ、

10

20

前記第一のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.8%のアセトニトリルに溶解可能であり、

前記第二のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.9乃至50%のアセトニトリルに溶解可能であり、かつ

前記第三のノミ唾液抽出物はアニオン交換収集手段により収集されるとともにリン酸塩緩衝溶液中の1M NaClを含む溶媒に溶解可能である、方法。

【請求項6】

アレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有している非ヒト動物におけるアレルギー性皮膚炎の指標となる抗体の存在を測定することにより、前記非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有していることを同定するための方法であって、前記方法は、

30

(a)組成物と前記非ヒト動物由来の体液とを、前記組成物と前記体液中に存在する前記抗体との免疫複合体の形成に十分な条件下で、接触させる工程と、

(b)形成された免疫複合体の量を測定する工程と、
を含み、

前記組成物は少なくとも一つの単離された外部寄生生物唾液タンパク質を含み、前記外部寄生生物唾液タンパク質はアミノ酸配列の少なくとも一部分を含み、かつ前記部分は、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、第一のノミ唾液抽出物、第二のノミ唾液抽出物及び第三のノミ唾液抽出物からなる群から選択されるノミ唾液抽出物に存在するノミ唾液タンパク質をコードする核酸分子とハイブリダイズする核酸分子によりコードされており

40

、
前記免疫複合体の形成は前記非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有していることの指標となり、かつ

前記第一のノミ唾液抽出物、前記第二のノミ唾液抽出物及び前記第三のノミ唾液抽出物は、(a)外部寄生生物を含む唾液収集装置内の収集手段上の外部寄生生物唾液産生物を収集する工程と、(b)前記唾液産生物を前記収集手段から抽出して前記組成物を作製する工程と、を含む方法であって、前記装置が(i)チャンパーに操作可能に連結されたハウジングと、(ii)前記ハウジングと前記チャンパーとの間のインターフェースとを備え、前記インターフェースが、(1)前記装置内に保持された外部寄生生物によって沈積された唾液産生物の少なくとも一部を収集し得る手段と、(2)混入物質が前記収集手段

50

に接触するのを妨げることができる障壁手段とを含み、前記チャンバーが、前記ハウジングよりも暖かい周囲温度を有し、それにより前記ハウジングと前記チャンバーとの間に温度の差異が形成され、前記ハウジングにより前記外部寄生生物が保持され、かつ前記温度の差異が前記ハウジング内に保持された外部寄生生物を引きつけ、前記障壁手段及び収集手段によって給餌し、それにより唾液産生物が前記収集手段上に沈積される方法によって得られ、

前記第一のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.8%のアセトニトリルに溶解可能であり、

前記第二のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.9乃至50%のアセトニトリルに溶解可能であり、かつ

前記第三のノミ唾液抽出物はアニオン交換収集手段により収集されるとともにリン酸塩緩衝溶液中の1M NaClを含む溶媒に溶解可能である、方法。

【請求項7】

前記ノミ唾液タンパク質が、配列番号2乃至14、配列番号25乃至26、配列番号28乃至31、配列番号33、配列番号35、配列番号51及び配列番号53乃至54からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む請求項1または2に記載の組成物。

【請求項8】

前記ノミ唾液タンパク質が、配列番号6、配列番号25、配列番号26及び配列番号35からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項9】

前記組成物が、同組成物を生成するための少なくとも1つの外部寄生生物唾液タンパク質をコードする少なくとも1つの核酸分子によって形質転換された組換え細胞を培養する工程を含む方法によって生成された前記外部寄生生物唾液タンパク質を含む、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項10】

前記組成物が基材に固定されている、請求項3に記載の検定キット。

【請求項11】

前記抗体が免疫グロブリンIgE抗体を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項12】

前記収集手段は、ポリフッ化ビニリデン膜又はアニオン交換膜を含む請求項4に記載の方法。

【請求項13】

請求項1または2に記載の外部寄生生物唾液タンパク質をコードする単離された核酸分子。

【請求項14】

前記核酸分子が、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、配列番号20、配列番号24、配列番号32、配列番号34、配列番号50、配列番号52及び配列番号55からなる群から選択される核酸配列の相補物とハイブリダイズする、請求項13に記載の単離された核酸分子。

【請求項15】

前記組成物が基材に固定されている、請求項6に記載の方法。

【請求項16】

前記ノミ唾液タンパク質が、配列番号2乃至14、配列番号25乃至26、配列番号28乃至31、配列番号33、配列番号35、配列番号51及び配列番号53乃至54からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む請求項5または6に記載の方法。

【請求項17】

前記ノミ唾液タンパク質が、配列番号6、配列番号25、配列番号26及び配列番号35からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項5または6に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本発明は、外部寄生生物唾液タンパク質を単離するための新規な生成物及び方法、並びに動物のアレルギー性皮膚炎を検出及び/又は処置するための新規な生成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

外部寄生生物(ectoparasite)、特にノミ、の刺し傷は、動物での過敏な応答の原因となり得る。特に、ノミの刺し傷に対する過敏な応答は、ノミアレルギー性皮膚炎(Flea Allergy dermatitis: FAD)と呼ばれる疾患において現れる。過敏症とは、ある化合物に以前に被曝したことがある動物が、次の被曝の際にその化合物に対してアレルギー応答を示す反応性の変化した状態をいう。過敏な応答には、I型、II型、III型及びIV型過敏症が挙げられる。I型過敏症は、アレルゲンが、肥満細胞の表面上のFcレセプターに結合したIgEの架橋を誘導する、IgE仲介性過敏症として記載されている。この架橋により、肥満細胞の脱顆粒が起きる。II型過敏症は、抗体が細胞表面アレルゲンに結合して補体の活性化により細胞破壊にいたる、抗体仲介性細胞傷害性過敏症として記載されている。III型過敏症は、アレルゲン-抗体複合体が種々の組織に沈着し炎症応答を誘導する、免疫複合体仲介性過敏症として記載されている。遅延型過敏反応(delayed hypersensitive reaction)にはIV型過敏症が含まれ、それは、Tリンパ球(すなわちT細胞)が、細胞性崩壊を仲介するマクロファージ若しくは細胞傷害性T細胞を活性化させるサイトカインを放出する、細胞仲介性過敏症として記載されている。

10

20

【0003】

I型過敏応答は通常、アレルゲン性化合物、通常は可溶性アレルゲン、への被曝後約2~30分後に起こる。II型及びIII型応答はアレルゲン性化合物への被曝後約2~8時間後に起こり得る。あるいは、遅延型過敏応答では、アレルゲン性化合物に対する動物によるアレルギー性応答は、代表的には、その化合物への被曝の約24~72時間後に現れる。この24時間の遅延の間に、その物質が位置した領域に単核細胞が侵入する。侵入物は、リンパ球、単球、マクロファージ、及び好塩基性細胞を含み得る。単球若しくはマクロファージを活性化して、組織の損傷を引き起こす酵素(例えば、プロテアーゼ)を分泌させるリンホカイン(例えば、インターフェロン-)が生成される。

30

【0004】

即時型及び/又は遅延型過敏症の症状を誘導する外来性化合物を、本明細書中でアレルゲンという。用語「アレルゲン」は、主に、アレルギー性応答を引き起こし得る外来性化合物をいう。この用語は用語「抗原」と、特に即時型及び/又は遅延型過敏症の症状を誘導することができる外来性化合物に関して、交換可能に用いることができる。アレルゲンに対する動物の感受性に影響を及ぼす因子は、遺伝的成分及び/又はアレルゲンに対する環境性被曝を含み得る。動物は、動物が過敏になっているアレルゲンの反復注射によりアレルゲンに対して脱感作され得る。

【0005】

FADは、即時型及び遅延型過敏症の両方を現し得る。代表的には、FADに対して感受性の動物における即時型過敏症応答には、ノミの刺し傷の部位での膨疹形成があげられる。そのような膨疹はかさぶたを伴って紫色に変色し、それは遅延型過敏症の代表である。ノミに刺されたことに対する過敏な応答は、遺伝的な素因を有する動物並びにノミに刺されることに以前に曝されることによって感受性にされた動物において起こり得る。

40

【0006】

FADの効果的な処置は、達成が不可能ではなかったとしても、困難であり続けている。ノミが特有の地域内の約15%のネコ及びイヌがFADに苦しんでおり、その頻度は年々増大してきている。地理的な領域では、効果的なノミの制御は全ての動物の処置を必要とする。研究者らが提案した一つの処置は、ノミアレルゲンを用いる動物の脱感作に関する。しかし、ノミアレルゲンの信頼性があり規定された調製物が、そのような処置には必

50

要である。

【0007】

本発明の新規な処方物が発見されるまでは、FADの原因であるノミアレルゲンは、はっきりと規定されていなかった。全ノミ抗体調製物を用いてFADの動物の診断及び脱感作を行ってきたのである(Benjamini et al., 1960, pp. 214-222, Experimental Parasitology, Vol. 10; Keep et al., 1967, pp. 425-426, Australian Veterinary Journal, Vol. 43; Kristensen et al., 1978, pp. 414-423, Nord. Vet.-Med., Vol. 30; Van Winkle, 1981, pp. 343-354, J. Amer. Animal Hosp. Assoc., Vol. 17; Haliwell et al., 1987, pp. 203-213, Veterinary Immunology and Immunopathology, Vol. 15; Greene et al., 1993, pp. 69-74, Parasite Immunology, Vol. 15); Opdebeeck et al.によるPCT公開第WO93/18788号;及びVan Winkle, pp. 343-354, 1981, J. Am. Anim. Hosp. Assoc., Vol. 32。しかし、市販の全ノミ抽出物は予測不能であり、したがってその有用性は限られたものである。

10

【0008】

以前の研究者たちは、ノミの唾液に含まれる産生物がFADに関与し得ること、及びそのような産生物を単離する方法も示唆してきた: Benjamini et al., 1963, pp. 143-154, Experimental Parasitology, Vol. 13; Young et al., 1963, pp. 155-166, Experimental Parasitology 13, Vol. 13; Michaeli et al., 1965, pp. 162-170, J. Immunol., Vol. 95;及びMichaeli et al., 1996, pp. 402-406, J. Immunol., Vol. 97。しかし、これらの研究者たちは、ノミの唾液のアレルゲン性因子は分子量が6キロダルトン(kD)未満のハプテンであると特徴づけていた。それらがタンパク質ではないということは、それらを強酸(例えば、6Nの塩酸)若しくは熱に被曝させた場合に分解に対して感受性ではないことが見い出されたことによっても支持されている。特定の低分子量のアレルゲン性因子のいくつかもまた、高度に蛍光性の芳香族画分であると特徴づけられた(Young et al., 同書)。更に、それらの研究者たちによる研究は、そのような因子がアレルゲン性であるためには、アジュバント及び/又は担体(例えば、コラーゲン若しくは経口分泌物(oral secretion)を収集するために用いられる膜の一部)と結びつけられている必要があることを示した。また、ノミの唾液因子の収集を記載した方法は困難でありかつ予測不能であった。そのうえ、これらの方法によって単離された因子には、代表的には、ノミ由来の物質、ノミを飼育するために用いたそれらの培養培地、若しくは皮膚系の膜が混入していた。

20

30

【0009】

したがって、動物内で過敏症応答を誘導し得るノミ唾液アレルゲンをより明確に規定する必要性が今も残っている。更に、FADに罹っているか、若しくはFADを有している動物の脱感作に有用なアレルゲンの予測可能で安価な調製物を提供する実質的に純粋なノミ唾液アレルゲンを収集する方法を開発する必要性が今も残っている。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、外部寄生生物唾液タンパク質を単離するための新規な生成物及び方法、並びに動物のアレルギー性皮膚炎を検出及び/又は処置するための新規な生成物及び方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

50

【0011】

上述の目的を解決するために、請求項1に記載の発明は、少なくとも1つの単離された外部寄生生物唾液タンパク質を含む組成物であって、ここで同外部寄生生物唾液タンパク質はアミノ酸配列の少なくとも一部分を含み、ここで同部分は、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、第一のノミ唾液抽出物、第二のノミ唾液抽出物及び第三のノミ唾液抽出物からなる群から選択されるノミ唾液抽出物中に存在するノミ唾液タンパク質をコードする核酸分子の相補物とハイブリダイズする核酸分子によってコードされている組成物において、同第一のノミ唾液抽出物、同第二のノミ唾液抽出物及び同第三のノミ唾液抽出物は、(a)外部寄生生物を含む唾液収集装置内の収集手段上の外部寄生生物唾液産生物を収集する工程と、(b)同唾液産生物を同収集手段から抽出して同組成物を作製する工程と、を含む方法であって、同装置が(i)チャンバーに操作可能に連結されたハウジングと、(ii)同ハウジングと同チャンバーとの間のインターフェースとを備え、同インターフェースが、(1)同装置内に保持された外部寄生生物によって沈積された唾液産生物の少なくとも一部を収集し得る手段と、(2)混入物質が同収集手段に接触するのを妨げることができる障壁手段と、を含み、同チャンバーが、同ハウジングよりも暖かい周囲温度を有し、それにより同ハウジングと同チャンバーとの間に温度の差異が形成され、同ハウジングにより同外部寄生生物が保持され、かつ同温度の差異が同ハウジング内に保持された外部寄生生物を引きつけ、同障壁手段及び収集手段によって給餌し、それにより唾液産生物が同収集手段上に沈積される方法によって得られ、同第一のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.8%のアセトニトリルに溶解可能であり、同第二のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.9乃至50%のアセトニトリルに溶解可能であり、かつ同第三のノミ唾液抽出物はアニオン交換収集手段により収集されるとともにリン酸塩緩衝溶液中の1M NaClを含む溶媒に溶解可能である組成物を提供する。

10

20

【0012】

請求項2に記載の発明は、少なくとも1つの単離された外部寄生生物唾液タンパク質を含む組成物であって、ここで同外部寄生生物唾液タンパク質は、アミノ酸配列の少なくとも一部分を含み、ここで同部分は、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、図2においてピークA乃至Lからなる群より選択されるピークにより示されるタンパク質のクロマトグラフィー溶出プロファイルを有するノミ唾液タンパク質をコードす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組成物において、同クロマトグラフィーは、約0.1% TFA水溶液から約0.085%のTFAを含む90% CH₃CN溶液までの勾配を用いたC4カラムにおいて0.8ml/分の流速にて75分にわたり実施される組成物、を提供する。

30

【0013】

請求項3に記載の発明は、非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有しているかをテストするための検定キットであって、同キットは：(a)少なくとも1つの単離された外部寄生生物唾液タンパク質を含む組成物と、(b)同非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有しているかを決定するための手段と、を備え、同外部寄生生物唾液タンパク質はアミノ酸配列の少なくとも一部分を含み、かつ同部分は、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、第一のノミ唾液抽出物、第二のノミ唾液抽出物及び第三のノミ唾液抽出物からなる群から選択されるノミ唾液抽出物中に存在するノミ唾液タンパク質をコードする核酸分子とハイブリダイズする核酸分子によりコードされており、同手段において、同非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有しているかを同定するために同組成物が使用され、同第一のノミ唾液抽出物、同第二のノミ唾液抽出物及び同第三のノミ唾液抽出物は、(a)外部寄生生物を含む唾液収集装置内の収集手段上の外部寄生生物唾液産生物を収集する工程と、(b)同唾液産生物を同収集手段から抽出して同組成物を作製する工程と、を含む方法であって、同装置が(i)チャンバーに操作可能に連結されたハウジングと、(ii)同ハウジングと同チャンバーとの間のインターフェースとを備え、同インター

40

50

フェースが、(1)同装置内に保持された外部寄生生物によって沈積された唾液産生物の少なくとも一部を収集し得る手段と、(2)混入物質が同収集手段に接触するのを妨げることができる障壁手段とを含み、同チャンバーが、同ハウジングよりも暖かい周囲温度を有し、それにより同ハウジングと同チャンバーとの間に温度の差異が形成され、同ハウジングにより同外部寄生生物が保持され、かつ同温度の差異が同ハウジング内に保持された外部寄生生物を引きつけ、同障壁手段及び収集手段によって給餌し、それにより唾液産生物が同収集手段上に沈積される方法によって得られ、同第一のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.8%のアセトニトリルに溶解可能であり、同第二のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.9乃至50%のアセトニトリルに溶解可能であり、かつ同第三のノミ唾液抽出物はアニオン交換収集手段により収集されるとともにリン酸塩緩衝溶液中の1M NaClを含む溶媒に溶解可能である検定キットを提供する。

10

【0014】

請求項4に記載の発明は、請求項1に記載の組成物を生成する方法であって、同組成物は混入物質を含んでおらず、同方法は、以下の工程：(a)外部寄生生物を含む唾液収集装置内の収集手段上の外部寄生生物唾液産生物を収集する工程と、(b)同産生物を同収集手段から抽出して同組成物を作製する工程と、を含み、同装置は(i)チャンバーに操作可能に連結されたハウジングと、(ii)同ハウジングと同チャンバーとの間のインターフェースと、を備え、同インターフェースは、(1)同装置内に保持された外部寄生生物によって沈積された唾液産生物の少なくとも一部を収集し得る手段と、(2)混入物質が同収集手段に接触するのを妨げることができる障壁手段と、を含み、同チャンバーは、同ハウジングよりも暖かい周囲温度を有し、それにより同ハウジングと同チャンバーとの間に温度の差異が形成され、同ハウジングにより同外部寄生生物が保持され、かつ同温度の差異が同ハウジング内に保持された外部寄生生物を引きつけ、同障壁手段及び収集手段によって給餌し、それにより唾液産生物が同収集手段上に沈積される、方法を提供する。

20

【0015】

請求項5に記載の発明は、非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有しているかを同定するための方法であって、同方法は：(a)同非ヒト動物上のある部位に少なくとも一つの単離された外部寄生生物唾液タンパク質を含む組成物を投与し、かつ同非ヒト動物上の別の部位に、陽性対照溶液及び陰性対照溶液からなる群から選択されるコントロール溶液を投与する工程と、(b)同組成物の投与に起因する反応を同コントロール溶液の投与に起因する反応と比較する工程と、を含み、同外部寄生生物唾液タンパク質はアミノ酸配列の少なくとも一部分を含み、かつ同部分は、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、第一のノミ唾液抽出物、第二のノミ唾液抽出物及び第三のノミ唾液抽出物からなる群から選択されるノミ唾液抽出物に存在するノミ唾液タンパク質をコードする核酸分子とハイブリダイズする核酸分子によりコードされており、同非ヒト動物は、同組成物に対する反応が少なくとも同陽性対照溶液に対する反応と同じくらい大きい場合にアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有していると決定され、かつ同非ヒト動物は、同組成物に対する反応が同陰性対照溶液に対する反応と同じくらいのサイズである場合にアレルギー性皮膚炎に対して感受性でないか若しくはそれを有していないと決定され、同第一のノミ唾液抽出物、同第二のノミ唾液抽出物及び同第三のノミ唾液抽出物は、(a)外部寄生生物を含む唾液収集装置内の収集手段上の外部寄生生物唾液産生物を収集する工程と、(b)同唾液産生物を同収集手段から抽出して同組成物を作製する工程と、を含む方法であって、同装置が(i)チャンバーに操作可能に連結されたハウジングと、(ii)同ハウジングと同チャンバーとの間のインターフェースとを備え、同インターフェースが、(1)同装置内に保持された外部寄生生物によって沈積された唾液産生物の少なくとも一部を収集し得る手段と、(2)混入物質が同収集手段に接触するのを妨げることができる障壁手段とを含み、同チャンバーが、同ハウジングよりも暖かい周囲温度を有し、それにより同ハウジングと同チャンバーとの間に温度の差

30

40

50

異が形成され、同ハウジングにより同外部寄生生物が保持され、かつ同温度の差異が同ハウジング内に保持された外部寄生生物を引きつけ、同障壁手段及び収集手段によって給餌し、それにより唾液産生物が同収集手段上に沈積される方法によって得られ、同第一のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.8%のアセトニトリルに溶解可能であり、同第二のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.9乃至50%のアセトニトリルに溶解可能であり、かつ同第三のノミ唾液抽出物はアニオン交換収集手段により収集されるとともにリン酸塩緩衝溶液中の1M NaClを含む溶媒に溶解可能である方法を提供する。

【0016】

請求項6に記載の発明は、アレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有している非ヒト動物におけるアレルギー性皮膚炎の指標となる抗体の存在を測定することにより、同非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有していることを同定するための方法であって、同方法は、(a)組成物と同非ヒト動物由来の体液とを、同組成物と同体液中に存在する同抗体との免疫複合体の形成に十分な条件下で、接触させる工程と、(b)形成された免疫複合体の量を測定する工程と、を含み、同組成物は少なくとも一つの単離された外部寄生生物唾液タンパク質を含み、同外部寄生生物唾液タンパク質はアミノ酸配列の少なくとも一部分を含み、かつ同部分は、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、第一のノミ唾液抽出物、第二のノミ唾液抽出物及び第三のノミ唾液抽出物からなる群から選択されるノミ唾液抽出物に存在するノミ唾液タンパク質をコードする核酸分子とハイブリダイズする核酸分子によりコードされており、同免疫複合体の形成は同非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有していることの指標となり、かつ同第一のノミ唾液抽出物、同第二のノミ唾液抽出物及び同第三のノミ唾液抽出物は、(a)外部寄生生物を含む唾液収集装置内の収集手段上の外部寄生生物唾液産生物を収集する工程と、(b)同唾液産生物を同収集手段から抽出して同組成物を作製する工程と、を含む方法であって、同装置が(i)チャンバーに操作可能に連結されたハウジングと、(ii)同ハウジングと同チャンバーとの間のインターフェースとを備え、同インターフェースが、(1)同装置内に保持された外部寄生生物によって沈積された唾液産生物の少なくとも一部を収集し得る手段と、(2)混入物質が同収集手段に接触するのを妨げることができる障壁手段とを含み、同チャンバーが、同ハウジングよりも暖かい周囲温度を有し、それにより同ハウジングと同チャンバーとの間に温度の差異が形成され、同ハウジングにより同外部寄生生物が保持され、かつ同温度の差異が同ハウジング内に保持された外部寄生生物を引きつけ、同障壁手段及び収集手段によって給餌し、それにより唾液産生物が同収集手段上に沈積される方法によって得られ、同第一のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.8%のアセトニトリルに溶解可能であり、同第二のノミ唾液抽出物はポリビニリデン収集手段により収集されるとともに12.9乃至50%のアセトニトリルに溶解可能であり、かつ同第三のノミ唾液抽出物はアニオン交換収集手段により収集されるとともにリン酸塩緩衝溶液中の1M NaClを含む溶媒に溶解可能である方法を提供する。

【0017】

請求項7に記載の発明は、請求項1または2に記載の組成物において、同ノミ唾液タンパク質が、配列番号2乃至14、配列番号25乃至26、配列番号28乃至31、配列番号33、配列番号35、配列番号51及び配列番号53乃至54からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むことをその要旨とする。

【0018】

請求項8に記載の発明は、請求項1または2に記載の組成物において、同ノミ唾液タンパク質が、配列番号6、配列番号25、配列番号26及び配列番号35からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むことをその要旨とする。

【0019】

請求項9に記載の発明は、請求項1または2に記載の組成物において、同組成物が、同組成物を生成するための少なくとも一つの外部寄生生物唾液タンパク質をコードする少な

くとも1つの核酸分子によって形質転換された組換え細胞を培養する工程を含む方法によって生成された同外部寄生生物唾液タンパク質を含むことをその要旨とする。

【0020】

請求項10に記載の発明は、請求項3に記載の検定キットにおいて、同組成物が基材に固定されていることをその要旨とする。

請求項11に記載の発明は、請求項6に記載の方法において、同抗体が免疫グロブリンIgE抗体を含むことをその要旨とする。

【0021】

請求項12に記載の発明は、請求項4に記載の方法において、同収集手段は、ポリフッ化ビニリデン膜又はアニオン交換膜を含むことをその要旨とする。

10

請求項13に記載の発明は、請求項1または2に記載の外部寄生生物唾液タンパク質をコードする単離された核酸分子を提供する。

【0022】

請求項14に記載の発明は、請求項13に記載の単離された核酸分子において、同核酸分子が、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、配列番号20、配列番号24、配列番号32、配列番号34、配列番号50、配列番号52及び配列番号55からなる群から選択される核酸配列の相補物とハイブリダイズすることをその要旨とする。

【0023】

請求項15に記載の発明は、請求項6に記載の方法において、同組成物が基材に固定されていることをその要旨とする。

20

請求項16に記載の発明は、請求項5または6に記載の方法において、同ノミ唾液タンパク質が、配列番号2乃至14、配列番号25乃至26、配列番号28乃至31、配列番号33、配列番号35、配列番号51及び配列番号53乃至54からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むことをその要旨とする。

【0024】

請求項17に記載の発明は、請求項5または6に記載の方法において、同ノミ唾液タンパク質が、配列番号6、配列番号25、配列番号26及び配列番号35からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むことをその要旨とする。

【0025】

本発明は、一つの実施態様において、少なくとも1つの単離された外部寄生生物唾液タンパク質を含む処方物に関する。この処方物において、上記外部寄生生物唾液タンパク質は、アミノ酸配列の少なくとも一部分を含む。このアミノ酸配列において、その一部分は、厳格な条件下で、ノミ唾液抽出物、FS-1、FS-2及びノミ又はFS-3に存在するノミ唾液タンパク質をコードする核酸分子とハイブリダイズし得る核酸分子によってコードされる。好ましいノミ唾液タンパク質には、fspA、fspB、fspC1、fspC2、fspD1、fspD2、fspE、fspF、fspG1、fspG2、fspG3、fspH、fspI、fspJ1、fspJ2、fspK、fspL1、fspL2、fspM1、fspM2、fspN1、fspN2及びノミ又はfspN3が挙げられる。更に、この処方物のノミ唾液タンパク質は、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14、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号51、配列番号53、配列番号54及びノミ又は配列番号56によって示されるアミノ酸配列の少なくとも一部分を含み得る。

30

40

【0026】

本発明の別の実施態様は、少なくとも1つの単離された外部寄生生物唾液タンパク質を含む処方物を含む。この処方物において、上記外部寄生生物唾液タンパク質は、少なくとも一部分のアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列において、同部分は厳格な条件下で、図2においてタンパク質ピークとして示されるノミ唾液タンパク質をコードする核酸分子とハイブリダイズし得る核酸分子によってコードされている。

50

【0027】

本発明の1つの態様は、外部寄生生物唾液産生物を含む処方物を包含し、同処方物は、T r i s - グリシン SDS - P A G E にかけた場合、図1Bのレーン13及び/又は図1Bのレーン14に示されるような分画プロフィールを有する。

【0028】

本発明の更に別の実施態様は、実質的に混入物質を含まない少なくとも1つの単離された外部寄生生物唾液産生物を含む処方物を包含する。この処方物は以下の工程を包含するプロセスによって生成される：(a)外部寄生生物を有する唾液収集装置内の収集手段上の外部寄生生物唾液産生物を収集する工程であって、上記装置は(i)チャンバーに操作可能に連結されたハウジングであって、上記チャンバーは、上記ハウジングよりも暖かい周囲温度(ambient temperature)を有し、それにより上記ハウジングと上記チャンバーとの間の温度の差異を形成し、上記ハウジングは外部寄生生物を保持することができる、及び(ii)上記ハウジングと上記チャンバーとの間のインターフェース、このインターフェースは、((a))上記装置内に保持された外部寄生生物によって沈積された唾液産生物の少なくとも一部を収集し得る手段、及び((b))混入物質が上記収集手段に接触するのを実質的に妨げることができる障壁手段であって、ここで、上記温度の差異が上記ハウジング内に保持された外部寄生生物を引きつけ、上記障壁手段及び収集手段によって給餌し、それにより唾液産生物を上記収集手段上に沈積するよう試みる；及び(b)同唾液産生物を同収集手段から抽出して同処方物入手する工程。本発明はまた、実質的に混入物を含まないノミ唾液産生物を含有する処方物を生成するそのような装置及びそのような装置の利用もまた包含する。

10

20

【0029】

本発明のもう一つの態様は、厳格な条件下で、ノミ唾液抽出物、F S - 1、F S - 2及び/又はF S - 3に存在するノミ唾液タンパク質(f s p A、f s p B、f s p C 1、f s p C 2、f s p D 1、f s p D 2、f s p E、f s p F、f s p G 1、f s p G 2、f s p G 3、f s p H、f s p I、f s p J 1、f s p J 2、f s p K、f s p L 1、f s p L 2、f s p M 1、f s p M 2、f s p N 1、f s p N 2及び/又はf s p N 3が挙げられるがこれらに限定されない)をコードする遺伝子とハイブリダイズし得る単離された核酸分子に関する。特に、上記核酸分子は、厳格な条件下で、配列番号：20、配列番号：24、配列番号：32、配列番号：34、配列番号：50、配列番号：52若しくは配列番号：55の核酸配列とハイブリダイズし得る。本発明はまた、組換え分子若しくは本発明の核酸分子を有する組換え細胞も包含する。

30

【0030】

本発明はまた、少なくとも1つの外部寄生生物唾液タンパク質を生成する方法に関し、以下の工程(a)厳格な条件下で、ノミ唾液抽出物、F S - 1、F S - 2及び/又はF S - 3に存在するノミ唾液タンパク質をコードする遺伝子とハイブリダイズし得る少なくとも1つの核酸分子で形質転換された細胞を培養して上記タンパク質を生成する工程；及び(b)上記外部寄生生物唾液タンパク質を回収する工程、を包含する。

【0031】

本発明の別の態様は、外部寄生生物唾液産生物若しくはそのミメトープ(mimotope)に選択的に結合し得る抗体を包含する。

40

本発明の更に別の態様は、本明細書中に開示された任意の処方物を含むアレルギー性皮膚炎の処置のための治療用組成物を包含する。特に、この治療用組成物は、ノミアレルギー性皮膚炎、蚊アレルギー性皮膚炎、及び/又はC u l i c o i d e sアレルギー性皮膚炎の処置のために有用である。更に、治療用組成物に含まれる特定のノミ唾液タンパク質は、以下のノミ唾液タンパク質の内の少なくとも1つの少なくとも一部分を含む：f s p E、f s p F、f s p G 1、f s p G 2、f s p G 3、f s p H、f s p I、f s p J 1、f s p J 2、f s p K、f s p L 1、f s p L 2、f s p M 1、f s p M 2、f s p N 1、f s p N 2及び/又はf s p N 3。本発明はまた、アレルギー性皮膚炎に対して宿主動物を脱感作する方法も包含し、その方法にはその動物に治療用組成物を投与する工程が

50

含まれる。

【0032】

本発明は、更に、動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有しているかをテストするための検定キットにも関する。このキットは：(a)本明細書中に開示された処方物；及び(b)上記動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有しているかを決定するための手段であって、ここでこの手段には、動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有しているかを同定するための上記処方物の利用が含まれる。

【0033】

本発明によれば、動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有しているかを同定するためにある方法を用いることができ、この方法は：(a)その動物上のある部位に本発明の処方物を投与する工程及びその動物上の別の部位に、陽性対照溶液及び陰性対照溶液からなる群から選択されるコントロール溶液を投与する工程；及び(b)上記処方物の投与に起因する反応を、コントロール溶液の投与に起因する反応と比較する工程、を包含する。上記動物は、上記処方物に対する反応が、少なくとも陽性対照溶液に対する反応と同じくらい大きい場合に、アレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有していると決定される。上記動物は、上記処方物に対する反応が、陰性対照溶液に対する反応とほぼ同じくらいの大きさである場合に、アレルギー性皮膚炎に対して感受性でないか、若しくはそれを有していないと決定される。特に、この方法により、即時型過敏症及び/又は遅延型過敏症を検出することができる。

【0034】

また本発明によれば、動物でのアレルギー性皮膚炎の指標となる抗体の存在を測定することにより、ある方法をアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有している動物を同定するために用いることができる。この方法は：(a)本発明の処方物を、上記動物由来の体液と、その処方物と抗体(その体液中に存在するならば)との免疫複合体の形成に十分な条件下で、接触させる工程；及び(b)形成された免疫複合体の量を測定する工程、ここで、上記免疫複合体の形成はその動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有していることの指標となる。特に、上記方法は、動物での即時型過敏症の指標としてのIgE抗体を検出するために用いることができる。

【0035】

本発明はまた、アレルギー性皮膚炎の処置を処方するための方法も包含し：(a)アレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有している動物を、本発明の処方物を含む*in vivo*若しくは*in vitro*検定によって同定する工程；及び(b)本発明の処方物を上記動物に投与する工程を含む処置を処方する工程、を包含する。

【発明の効果】

【0036】

本発明により、外部寄生生物唾液タンパク質を単離するための新規な生成物及び方法、並びに動物のアレルギー性皮膚炎を検出及び/又は処置するための新規な生成物及び方法が提供された。

【発明を実施するための最良の形態】

【0037】

本発明は、外部寄生生物に対する動物のアレルギー性皮膚炎を診断及び処置するための新規な生成物及び方法を包含する。本発明は、外部寄生生物によって引き起こされるアレルギーの診断及び処置に有用な、混入物(例えば、血液タンパク質、糞便物質(*fecal material*)及び幼虫培養培地)を十分に持たない外部寄生生物の唾液産生物の独特な処方物を提供するという点で特に有利である。更に、本発明は、別の活性、例えば、ノミが、宿主のノミに対する耐性を与えるか及び/又は中和する能力において重要な活性、を有する外部寄生生物唾液産生物を含み、このような産生物は、凝固活性、抗凝血活性、プロテアーゼ活性、ホスホリパーゼ活性、プロスタグランジン活性、抗補体活性、他の免疫抑制活性、ホスファターゼ活性、アピラーゼ活性、血管作用(*vasoac*

10

20

30

40

50

tive) 活性、及び/又は抗炎症活性を有する。ノミ唾液産生物には、例えば、プロテアーゼ類が含まれるがこれに限定されず、このプロテアーゼ類は、別の器官に由来するノミによって逆流 (regurgitate) する。別の器官には、例えば、中腸 (midgut) があるがこれに限定されない。

【0038】

本発明はまた、外部寄生生物唾液産生物を、実質的に混入物を含まずに、再現性があり効果的に単離する装置及び方法を提供するという点で特に有利である。

本発明によれば、外部寄生生物は宿主動物の皮膚を通して付着して生育する外部生存寄生体 (external living parasite) である。外部寄生生物は、宿主動物に依存して生きる寄生体及び摂餌のために一時的に動物に付着する寄生体を含む。また、本発明によれば、外部寄生生物唾液とは、外部寄生生物が温度の差異に反応して摂餌を試みようとするとき (例えば、本発明の装置内に存在するとき) に外部寄生生物の口から放出される物質をいう。外部寄生生物唾液は、外部寄生生物唾液産生物を含む。本発明の外部寄生生物産生物は、本発明の収集手段 (以下に詳細に記載する) に結合した外部寄生生物唾液部分を含み、本明細書中では外部寄生生物成分という。同様に、外部寄生生物唾液産生物はまた本発明の収集手段から抽出した外部寄生生物唾液部分をも含み、本明細書中では外部寄生生物抽出物という。外部寄生生物唾液抽出物には、例えば、本明細書中に記載された任意の方法を用いて単離することができる外部寄生生物唾液タンパク質が含まれる。本発明の外部寄生生物唾液抽出物はまた、別の外部寄生生物唾液産生物、例えば、プロスタグランジン及び別の薬理学的に活性な分子、をも含み得る。

【0039】

本発明の1つの実施態様は、アレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有している (すなわち、罹患している) 動物の診断及び/又は処置に用い得る外部寄生生物唾液産生物を含む処方物である。本発明の外部寄生生物唾液産生物を用いて診断及び/又は処置する好ましいタイプのアレルギー性皮膚炎には、ノミアレルギー性皮膚炎、Culicoidesアレルギー性皮膚炎及び蚊アレルギー性皮膚炎が挙げられる。本発明の外部寄生生物唾液産生物を用いて診断及び/又は処置する好ましいタイプのアレルギー性皮膚炎は、ノミアレルギー性皮膚炎である。本明細書中で用いられるように、アレルギー性皮膚炎に感受性の動物とは、アレルギー性皮膚炎を発症する遺伝的素因のある動物、及び/又は抗原への再被曝によってアレルギー症状を起こし、その動物を観察するか若しくはその動物によるその抗原に対する抗体産生を測定することによって認められる、抗原で感作された動物をいう。同様に、アレルギー性皮膚炎に対して感受性の動物には、無症状の (subclinical) アレルギー性皮膚炎を有する動物が含まれる。無症状のアレルギー性皮膚炎とは、動物を観察するだけではアレルギー症状を検出し得ない状態 (すなわち、疾患の顕現が、罹患しているが皮膚炎ではない動物の抗外部寄生生物唾液タンパク質抗体の存在を含み得る) をいう。例えば、無症状のアレルギー性皮膚炎は、本発明の *in vivo* 若しくは *in vitro* 検定 (以下に詳細に記載する) を用いて検出され得る。アレルギー性皮膚炎を有する動物という場合、その動物を観察するだけで、及び/又は本発明の *in vivo* 若しくは *in vitro* 検定 (以下に詳細に記載する) を用いることによって検出され得るアレルギー症状を示している動物を含む。

【0040】

本発明の1つの実施態様は、1以上の単離された外部寄生生物唾液タンパク質を含む処方物である。本発明によれば、単離されたタンパク質は、その天然の環境から取り出されたタンパク質である。例えば、単離された外部寄生生物唾液タンパク質は、その天然の供給源から取得され得るか、組換えDNA技術を用いて生成され得るか、若しくは化学的に合成され得る。本明細書中で用いられるように、単離された外部寄生生物タンパク質は、完全長外部寄生生物唾液タンパク質若しくはそのようなタンパク質の任意の相同体、例えば、アミノ酸が欠失した (例えば、ペプチドのような、そのタンパク質の短縮型)、挿入された、逆位された (inverted)、置換された、及び/又は誘導体化された (例

例えば、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ミリスチル化、プレニル化、パルミチン酸化 (p a l m i t a t i o n)、アミド化、及び/又はグリコシルホスファチジルイノシトールの付加による)、外部寄生生物唾液タンパク質であり得る。外部寄生生物唾液タンパク質の相同体は、その相同体をコードする核酸配列が、天然の外部寄生生物唾液タンパク質アミノ酸配列をコードする核酸配列に対して(すなわちこの配列と)、厳格な条件下で、ハイブリダイズできる、天然の外部寄生生物唾液タンパク質アミノ酸配列に十分類似したアミノ酸配列を有するタンパク質である。本明細書中で用いられるように、厳格なハイブリダイゼーション条件とは、その条件下で、オリゴヌクレオチドを含む核酸分子を用いて類似の核酸分子を同定する、標準的なハイブリダイゼーション条件をいう。そのような標準的な条件は、例えば、S a m b r o o k e t a l., M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b s P r e s s, 1989に開示されている。本発明のタンパク質相同体の最小サイズは、対応する天然のタンパク質をコードする相補的な核酸分子配列と安定なハイブリッドを形成し得る核酸分子によってコードされるのに十分なサイズである。このように、そのようなタンパク質相同体をコードする核酸分子のサイズは、核酸組成及びその核酸分子と相補的な配列との間の相同体のパーセント、並びにハイブリダイゼーション条件それ自体(例えば、温度、塩濃度、及びホルムアミド濃度)に依存する。そのような核酸分子の最小サイズは、もしその核酸分子がGCリッチならば、代表的には少なくとも約12~約15ヌクレオチドの長さであり、もしその核酸分子がATリッチならば、代表的には少なくとも約15~約17塩基の長さである。このように、本発明の外部寄生生物唾液タンパク質相同体をコードするのに用いられる核酸分子の最小サイズは、約12~約18ヌクレオチドの長さである。実用的な限界は別にして、そのような核酸分子の最大サイズには制限はない。この最大サイズの核酸分子は、遺伝子の一部、遺伝子の全部、若しくは多重遺伝子(m u l t i p l e g e n e s)、若しくはそれらの一部を含み得る。同様に、本発明の外部寄生生物唾液タンパク質相同体の最小サイズは、約4~約6アミノ酸長であり、好ましいサイズは、完全長、多価(すなわち、1を超えるドメインを有する融合タンパク質で、そのそれぞれのドメインが機能を有する)、若しくはそのようなタンパク質の機能的部分を所望するかどうかに依存する。

【0041】

外部寄生生物唾液タンパク質相同体は、外部寄生生物唾液タンパク質をコードする天然の遺伝子の対立遺伝子変化の結果であり得る。天然の遺伝子とは、天然に最も頻繁に見いだされる形態の遺伝子をいう。外部寄生生物唾液タンパク質相同体は、例えば無作為な若しくは標的化した変異誘発を行う伝統的な若しくは組換えDNA技術を用いる、タンパク質をコードする遺伝子の直接的な改変(しかしそれに限定されない)を含む当該分野で公知の技術を用いて生成され得る。

【0042】

本発明の好ましい外部寄生生物唾液タンパク質(それらの相同体を含む)は、外部寄生生物の刺し傷に起因するアレルギー性皮膚炎を検出及び/又は処置をすることができる。好ましい外部寄生生物唾液タンパク質相同体は、天然の外部寄生生物唾液タンパク質相対物に対して過敏症応答を誘発し得る少なくとも1つのエピトープを含む。外部寄生生物唾液タンパク質相同体はまた、そのタンパク質の天然の形態に対して動物を過敏症にし得るエピトープをも含み得る。外部寄生生物唾液タンパク質相同体が、アレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有している動物の過敏症を、検出及び/又は処置する(すなわち、例えば、脱感作により免疫調整若しくは免疫調節を行う)能力は、当業者に公知の技術によりテストすることができる。このような技術は、以下に詳述する皮膚テスト及び免疫吸収(I m m u n o a b s o r b e n t)検定を含む。本発明の別の好ましい外部寄生生物唾液タンパク質は、その外部寄生生物の摂餌及び生存にとって重要な活性を含む別の活性を有する。

【0043】

1つの実施態様において、本発明の処方物は、単離された外部寄生生物唾液タンパク質

の少なくとも一部を有するタンパク質を含むことができる。本発明によれば、“外部寄生生物唾液タンパク質の少なくとも一部”とは、厳格な条件下で、本発明の全長外部寄生生物唾液タンパク質をコードする核酸分子とハイブリダイズし得る核酸分子によってコードされる外部寄生生物唾液タンパク質の一部をいう。好ましい外部寄生生物唾液タンパク質の一部は、外部寄生生物の刺し傷が原因のアレルギー性皮膚炎の検出及び/又は処置に有用である。別の好ましい部分は、ノミの摂餌及び生存に重要な活性を有する。本発明の外部寄生生物唾液タンパク質の部分の適切なサイズは、本発明の外部寄生生物唾液タンパク質相同体に関して開示したようなサイズである。

【0044】

当業者には明らかなように、本発明は、全ての外部寄生生物に適用することを意図している。本発明の処方物は、いかなる外部寄生生物の唾液産生物をも包含し得る。本発明の好ましい外部寄生生物は、それから唾液産生物(タンパク質を含む)を単離するか、及び/又はそれからその後組換え若しくは合成により生成され得るタンパク質を同定し、それには蛛形類(*arachnids*)、昆虫類及びヒル類(*leeches*)が含まれる。唾液産生物をそれから取得するより好ましい外部寄生生物には、ノミ(*flea*); *Ixodidae*科の硬ダニ(*hard tick*)(例えば、*Ixodes*及び*Amblyomma*)並びに*Argasidae*科の軟ダニ(*soft tick*)(例えば、*O. parkeri*及び*O. turicata*のような*Ornithodoros*)を含むダニ; 小虫(*midge*)(例えば、*Culicoides*)、蚊、スナバエ(*sand fly*)、ブラックフライ(*black fly*)、アブ(*horse fly*)、ツノサシバエ(*horn fly*)、メクラアブ(*deer fly*)、ツェツェバエ(*tsetse fly*)、サシバエ(*stable fly*)、ハエウジ病を引き起こすハエ(*myiasis-causing fly*)及び刺すブユ(*biting gnat*)のような飛ぶ昆虫(*fly*); アリ; クモ、シラミ; ダニ(*mite*); 南京虫(*bed bug*)及びオオサシガメ(*kissing bug*)のような、シャーガス病を有する半翅類を含む、半翅類(*true bug*)が挙げられる。より一層好ましい外部寄生生物唾液産生物は、ノミ、蚊、小虫、スナバエ、ブラックフライ、ダニ、及び*Rhodnius*の唾液産生物を含み、更に一層好ましいのはノミ、蚊、及び*Culicoides*由来の産生物である。

【0045】

本発明の特に好ましい処方物は、ノミ唾液タンパク質を含む。好ましいノミ唾液産生物は、*Ctenocephalides*、*Xenopsylla*、*Pulex*、*Tunga*、*Nosopsyllus*、*Diamanus*、*Ctopsyllus*、及び*Echidnophaga*ノミに由来する産生物であり、*Ctenocephalides canis*ノミ及び*Ctenocephalides felis*ノミが更に一層好ましい。例示のため、以下の実施態様の多くはノミ唾液タンパク質について検討する。ノミ唾液タンパク質のそのような検討は、どのような方法においても、本発明の範囲を限定することを意図しない。

【0046】

一つの実施態様において、本発明の処方物は、混入物質を実質的に含まない。混入物質は、例えば、外部寄生生物の糞便物質、外部寄生生物が以前に摂取した食物由来の血液タンパク質(例えば、フェチュイン、フェリチン、アルブミン、ヘモグロビン及び他の大きな血液タンパク質)、角皮(*cuticular*)屑、及び外部寄生生物の幼虫培養培地(例えば、血液、マウス用食物及び砂)を含む。本明細書中で用いられるように、混入物質を実質的に持たない処方物は、更に精製を行わなくても望ましくない副作用を起こすことなく診断薬若しくは治療薬として用いることができる処方物である。好ましくは、混入物質を実質的に持たない処方物は、約50%未満の混入物質を含み、より好ましくは約10%未満の混入物質を含み、そしてより一層好ましくは、約5%未満の混入物質を含む。このように、本発明の処方物は、好ましくは少なくとも約50%のノミ唾液産生物を含み、より好ましくは少なくとも約90%ノミ唾液産生物を含み、そしてより一層好ましくは少

10

20

30

40

50

なくとも約95%のノミ唾液産生物を含む。実質的に混入物を持たない本発明の処方物は、いかなる血液混入物若しくはノミ中腸含有物をも有さない処方物を含み得る。実質的に混入物を持たない処方物は、以下に詳述する本発明の唾液収集装置を用いて取得することができる。

【0047】

混入物質を実質的に持たない処方物は、当業者に公知の代表的な方法により同定することができる。例えば、混入物の存在は：(1)処方物をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に負荷して分析する；(2)処方物を種々のクロマトグラフィー技術により分析する；(3)特定の混入物に結合し得る抗体を用いて処方物をスクリーニングする、例えば、イムノプロット若しくは酵素免疫検定技術；(4)処方物をキャピラリー電気泳動により分析する；若しくは(5)ヘモグロビンを検出する検定を用いて処方物をスクリーニングする、ことにより同定することができる。

10

【0048】

本発明の処方物の一つの実施態様は、Tris-グリシンSDS-PAGEによる測定で、好ましくは14%ポリアクリルアミドゲルを用い、当該分野で標準の技術を用いて分離される、約6kD~約65kDの範囲の分子量を有する少なくとも1以上のノミ唾液タンパク質を含む。好ましい処方物は、約6kD~約55kDの範囲の分子量を有する1以上のノミ唾液タンパク質を含む。より好ましい処方物は、図1に示される溶出(若しくは移動)パターンを有する1以上のタンパク質を含む。

【0049】

別の実施態様においては、本発明の処方物は、Tris-グリシンSDS-PAGEによって測定され当該分野で標準的な方法を用いて分離される、約40kD~約300kDの範囲の分子量を有する少なくとも1以上のノミ唾液タンパク質を含む。そのような処方物中に含まれるノミ唾液タンパク質の50%以上は、約40kD~約55kDの範囲の分子量を有し、fspNと類似しているようである。より好ましい処方物は、図1に示される溶出(若しくは移動)パターンを有する1以上のタンパク質を含む。

20

【0050】

別の実施態様においては、本発明の処方物は、塩基性の等電点若しくはpI値を有する1以上のノミ唾液タンパク質を含む。等電pH値若しくはpI値とは、分子が正味の電荷を持たず電場で移動しないpH値をいう。本発明の好ましい処方物は、少なくとも約pI 8.5、より好ましくは少なくとも約pI 9.0のpI値を有するタンパク質を含む。ノミ唾液タンパク質であるfspHは、例えば、約pI 8.5~約pI 9.6の範囲のpI値を有し、ノミ唾液タンパク質がそれから回収されるノミ集団における対立遺伝子変化のため不均質であることを示し得る。

30

【0051】

更に別の実施態様において、本発明の処方物は、本発明の収集手段から溶出した1以上のノミ唾液産生物の少なくとも一部分を含む。そのような処方物の例は、ノミ抽出物FS-1、FS-2及びFS-3を含む。このFS-1、FS-2及びFS-3ノミ唾液抽出物は、実施例2に詳細に記載する方法に従って生成される。本発明によれば、用語FS-1ノミ唾液抽出物、FS-2ノミ唾液抽出物若しくはFS-3ノミ唾液抽出物は、それぞれ用語FS-1ノミ唾液産生物混合物、FS-2ノミ唾液産生物混合物若しくはFS-3ノミ唾液産生物混合物と交換可能に用いることができる。

40

【0052】

FS-1ノミ唾液抽出物は、(a)還元16%Tris-グリシンSDS-PAGEにかけた場合、図1B、レーン13に示されるようなバンドとして移動するタンパク質；及び(b)逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にかけた場合、図2に示されるピークのように移動するタンパク質の混合物を含む。図2のピークは、FS-1に含まれるタンパク質が、下記に詳述する本発明の唾液収集装置を用いて収集され、更に、その収集したタンパク質が、5%~63%のアセトニトリル若しくは5.6%~70%の溶媒Bを流速0.8ml/分で用いてC4 HPLCカラムを通すことによりタンパク質のピーク

50

に分離され、ここで、溶媒 A は、水中の約 0.1% の T F A であり、溶媒 B は、90% アセトニトリル中の約 0.085% T F A である、場合に得られる。図 2 に関して、ピークは、ピーク A、ピーク B、ピーク C、ピーク D、ピーク E、ピーク F、ピーク G、ピーク H、ピーク I、ピーク J、ピーク K、ピーク L、ピーク M、及びピーク N を意味し、そのように示される。このようなピークに含まれるノミ唾液タンパク質（若しくはタンパク質フラグメント）は、f s p A、f s p B、f s p C、f s p D、f s p E、f s p F、f s p G、f s p H、f s p I、f s p J、f s p K、f s p L、f s p M 及び f s p N という。ピークは、図 2 で印を付けた領域をいい、ピークが必ずしもただ一つのタンパク質（若しくはタンパク質フラグメント）を含むわけではないことを留意すべきである。上記で言及したピークに含まれるタンパク質の、例えば、アミノ酸配列決定若しくは S D S - P A G E ゲル電気泳動によるさらなる分析は、f s p C が f s p C 1 及び f s p C 2 という少なくとも 2 つのタンパク質を含み、f s p D が f s p D 1 及び f s p D 2 という少なくとも 2 つのタンパク質を含み、f s p G が f s p G 1、f s p G 2、及び f s p G 3 という少なくとも 3 つのタンパク質を含み、f s p J が f s p J 1 及び f s p J 2 という少なくとも 2 つのタンパク質を含み、f s p L が f s p L 1 及び f s p L 2 という少なくとも 2 つのタンパク質を含み、f s p M が f s p M 1 及び f s p M 2 という少なくとも 2 つのタンパク質を含み、f s p N が f s p N 1、f s p N 2 及び f s p N 3 という少なくとも 3 つのタンパク質及びノ又はタンパク質フラグメントを含むことを示した。少なくとも部分アミノ酸配列が、多くのノミ唾液タンパク質に関して得られ、例えば、配列番号 1（f s p A の N -（アミノ）末端部分アミノ酸配列）、配列番号 2（ほとんどの f s p H タンパク質を表す、N - 末端から始まるアミノ酸配列）、配列番号 3（f s p H のエンドプロテイナーゼ A s p - N フラグメントの N - 末端部分アミノ酸配列、f s p H e と称する）、配列番号 4（f s p H のエンドプロテイナーゼ A s p - N フラグメントの N - 末端部分アミノ酸配列、f s p H h と称する）、配列番号 5（f s p H のエンドプロテイナーゼ A s p - N フラグメントの N - 末端部分アミノ酸配列、f s p H j と称し、これは f s p H の N - 末端部分アミノ酸配列も示す）、配列番号 6（f s p I の N - 末端部分アミノ酸配列）、配列番号 7（f s p J 1 の N - 末端部分アミノ酸配列）、配列番号 8（f s p J 2 の N - 末端部分アミノ酸配列）、配列番号 9（f s p L 1 の N - 末端部分アミノ酸配列）、配列番号 10（f s p L 2 の N - 末端部分アミノ酸配列）、配列番号 11（f s p N 1 の N - 末端部分アミノ酸配列）、配列番号 12（f s p N 2 の N - 末端部分アミノ酸配列）、配列番号 13（f s p N 3 の N - 末端部分アミノ酸配列）、配列番号 14（f s p H の N - 末端部分アミノ酸配列）、配列番号 25（配列番号 24 によって示された核酸配列の翻訳物で、f s p I に相当）、配列番号 26（f s p I の見かけの完全長翻訳産物）、配列番号 27（f s p B の N - 末端部分アミノ酸配列）、配列番号 28（f s p G 1 の N - 末端部分アミノ酸配列）、配列番号 29（f s p G 2 の N - 末端部分アミノ酸配列）、配列番号 30（f s p G 3 の N - 末端部分アミノ酸配列）、配列番号 31（f s p N のエンドプロテイナーゼ A s p - N フラグメントの N - 末端部分アミノ酸配列、f s p N（100 - 101）と称する）、配列番号 33（P f s p H₈₀ と名付けた、f s p H に対応する n f s p H₂₄₂ と名付けた部分核酸配列（配列番号 32 という）の翻訳産物）、配列番号 35（P f s p I₁₅₅ と名付けた、f s p I に対応する n f s p I₅₉₁ と名付けた部分核酸配列（配列番号 34 という）の翻訳産物）、配列番号 51（P f s p N（A）₁₇₂ と名付けた、f s p N タンパク質の n f s p N（A）₆₄₆ と名付けた部分核酸配列（配列番号 50 という）の翻訳産物）、配列番号 53（P f s p N（B）₁₅₃ と名付けた、f s p N タンパク質の n f s p N（B）₆₁₂ と名付けた部分核酸配列（配列番号 52 という）の翻訳産物）、配列番号 54（P f s p N（A）と名付けた f s p N タンパク質の見かけの N - 末端部分アミノ酸配列で、P f s p N（A）₅₆ という）、及び配列番号 56（n f s p N（A）₁₁₉₇ と名付けた f s p N 3 の見かけの完全核酸配列（配列番号 55 という）の見かけの完全長翻訳産物で、P f s p N（A）₃₉₈ と名付けた）などがある。各々のタンパク質をどのようにして特徴づけたかは実施例 2 及び 3 に記載する。

【0053】

FS - 2 ノミ唾液抽出物は、還元16% Tris - グリシン SDS - PAGE にかけた場合、図1B、レーン14及び15に示されるようなバンドとして移動するタンパク質の混合物を含む。

【0054】

FS - 1、FS - 2 及び FS - 3 ノミ唾液抽出物を入手する溶出プロトコールののち、さらなる目的のノミ唾液産物が収集手段の上に残るということは本発明の範囲内である。また、本発明の処方物は、他の技術を用いる溶出により、例えば、より高濃度の溶出液を用いることによって、収集手段から取り出されるノミ唾液産物をも含み得ることも本発明の範囲内である。

10

【0055】

別の実施態様において、本発明の処方物は、少なくとも一部の外部寄生生物唾液タンパク質相同体を含み、この相同体は、唾液抽出物 FS - 1、FS - 2 及び FS - 3 に含まれる少なくとも一つの産物の少なくとも一部と、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75%、そして更に一層好ましくは少なくとも約85%のアミノ酸相同体(比較領域内の同一性)を有する。好ましい相同体は、fspA、fspB、fspC1、fspC2、fspD1、fspD2、fspE、fspF、fspG1、fspG2、fspG3、fspH、fspI、fspJ1、fspJ2、fspK、fspL1、fspL2、fspM1、fspM2、fspN1、fspN2 及び fspN3 の1以上のタンパク質の少なくとも一部と、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75%、そして更に一層好ましくは少なくとも約85%のアミノ酸相同体を有する外部寄生生物唾液タンパク質の部分を含む。同様に、以下のアミノ酸配列の1つの少なくとも一部を有するタンパク質もまた含まれる：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14、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号51、配列番号53、配列番号54 及び / 又は配列番号56。

20

【0056】

好ましい実施態様においては、本発明の処方物は、本発明の外部寄生生物唾液タンパク質相同体の少なくとも一部を含み、この相同体は、唾液抽出物 FS - 1、FS - 2 若しくは FS - 3 に含まれる産物の少なくとも一部をコードする核酸分子と、少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約75%、そして更に一層好ましくは少なくとも約85%の相同体を有する核酸分子によってコードされる。好ましい外部寄生生物産物相同体は、以下の1以上のタンパク質の少なくとも一部をコードする核酸分子と少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約75%、そして更に一層好ましくは少なくとも約85%の相同体を有する核酸分子によってコードされる： fspA、fspB、fspC1、fspC2、fspD1、fspD2、fspE、fspF、fspG1、fspG2、fspG3、fspH、fspI、fspJ1、fspJ2、fspK、fspL1、fspL2、fspM1、fspM2、fspN1、fspN2 及び fspN3。

30

40

【0057】

更に別の実施態様において、本発明の処方物は、エンドプロテイナーゼ Asp - N によって消化された場合、タンパク質分解フラグメントを生成し、逆相 HPLC にかけた場合には図3に示されるピークと共に移動するタンパク質を含む。逆相 HPLC は、A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, PT Matsuda ired., Academic Press, San Diego, CA において Stone et al., Enzymatic Digestion of Proteins and HPLC Peptide Isolation によって開示された方法(すなわち、Narrowbore手法: vydac C18 逆相、300A、5µm

50

サポート；流速 0.2 ml / 分；溶媒 A は、水中の 0.6% TFA として溶媒 B は、水中の 80% アセトニトリル中に 0.052% TFA；試料は 2% B で注入；2% B で保持後の勾配は 60 分間にわたって 2% ~ 37.5% B、30 分間にわたって 37.5% ~ 75% B、15 分間にわたって 75% ~ 98% B；そして 214 nm で検出) を用いて行った。そのようなタンパク質の例は、f s p H であり、E S M S によって検出された場合、分子量約 8613 ± 6 ダルトンという特性を有する。本発明の特に好ましい処方物は、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 14、若しくは配列番号 33 によって示されるアミノ酸配列を有する f s p H タンパク質を含む。

【0058】

好ましい実施態様においては、本発明の処方物は、下記のアミノ酸配列（標準的な一文字のアミノ酸コードを用いる）の少なくとも一部を有する（すなわち含む）少なくとも 1 つの単離されたタンパク質を含み得る：

【0059】

【化 1】

```

Y G K Q Y S E K G G R G Q R H Q I L K K G K
Q Y S           S K           I           L   D   L
S
R

```

（配列番号 1；f s p A の N - 末端部分配列を示す）。

【0060】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも 1 つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0061】

【化 2】

```

D R R V S K T C Q S G G K I Q S E X Q V V I K S G Q
H/Y I L E N Y X S D G R N N N N P C H L F C M R E C R
S G N G G C G N G G R T R P D S K H C Y C E A P Y S

```

（配列番号 2；f s p H のほぼ完全な N - 末端配列を示す）。

【0062】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも 1 つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0063】

【化 3】

```

D R R V S K T X Q S G G K I Q S E X Q V V I K S G Q
H/Y I L E N Y X S D G R

```

（配列番号 14；f s p H の N - 末端部分配列を示す）。

【0064】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも 1 つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0065】

【化 4】

```

D S K H C Y C E A P Y S

```

（配列番号 3；f s p H e の N - 末端部分配列を示す）。

【0066】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも 1 つの単離されたタンパク質をも含み得る：

10

20

30

40

50

【0067】

【化5】

D G R N N N N P C H L F C M R E C R S G N G G C G N G
G R T R P D S K H C

(配列番号4 ; f s p H h の N - 末端部分配列を示す)。

【0068】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0069】

【化6】

D R R V S K T C Q S G

10

(配列番号5 ; f s p H j の N - 末端部分配列を示す)。

【0070】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0071】

【化7】

E D I W K V N K K X T S G G K N Q D R K L D Q I I Q K
G Q Q V X X Q N X X K

20

(配列番号6 ; f s p I の N - 末端部分配列を示す)。

【0072】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0073】

【化8】

N S H E P G N T R K I R E V M D K L R K Q H P

30

(配列番号7 ; f s p J 1 の N - 末端部分配列を示す)。

【0074】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0075】

【化9】

E I K R N S H E P G N T R K I R E V M D K L R K Q H P

(配列番号8 ; f s p J 2 の N - 末端部分配列を示す)。

【0076】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0077】

【化10】

N D K E P G N T R K I R E V M D K L R K Q A Q P R T D
G Q R P K T X I M

40

(配列番号9 ; f s p L 1 の N - 末端部分配列を示す)。

【0078】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つ

50

の単離されたタンパク質をも含み得る：

【0079】

【化11】

X L X R N D K E P G N T R K I R E V M D K

(配列番号10；f s p L 2のN - 末端部分配列を示す)。

【0080】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0081】

【化12】

N D E L K F V F V M A K

10

(配列番号11；f s p N 1のN - 末端部分配列を示す)。

【0082】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0083】

【化13】

X D E L K F V F V M A K G P S X Q A X D Y P C

20

(配列番号12；f s p N 2のN - 末端部分配列を示す)。f s p N 1及びf s p N 2は類似性を有しているようであるが、N - 末端部分配列が、同一でない場合、これら2つのタンパク質は、T r i s - グリシンS D S - P A G Eにかけた場合に異なって移動し、それらが異なるタンパク質であることが示唆され、それはおそらくそれらのタンパク質の一つのC - 末端短縮化及び/又はグリコシレーションのような翻訳後修飾が原因であることを留意すべきである。

【0084】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0085】

【化14】

E L K F V F A T A R G M S H T P C D Y P

30

(配列番号13；f s p N 3のN - 末端部分配列を示す)。

【0086】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0087】

【化15】

S G K Q Y S E X G K

Q S

40

(配列番号27；f s p BのN - 末端部分配列を示す)。

【0088】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0089】

【化16】

D R R V S K

(配列番号28; f s p G 1のN-末端部分アミノ酸配列を示す)。

【0090】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る:

【0091】

【化17】

S K M V T E K X K S G G N N P S T K E V S I P

10

(配列番号29; f s p G 2のN-末端部分アミノ酸配列を示す)。

【0092】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る:

【0093】

【化18】

E V S I P S G K L T I E D F X I G N H Q

(配列番号30; f s p G 3のN-末端部分アミノ酸配列を示す)。

20

【0094】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る:

【0095】

【化19】

F S L C V L Y Q I V V A D R R V S K T C Q S G G K I Q
 S E E / X Q V V I K S G Q H / Y I L E N Y X S D G R N N N
 N P C H L F C M R E C R S G N G G C G N G G R T R P D
 S

30

(配列番号33; f s p Hに対応する、配列番号32によって示される核酸配列の翻訳産物を示す)。

【0096】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る:

【0097】

【化20】

L T S G G K N Q D R K L D Q I I Q K G Q Q V K I Q N I
 C K L I R D K P H T N Q E K E K C M K F C T K N V C K
 G Y R G A C D G N I C Y C S R P S N L G P D W K V N E
 R I E R L P I T K I L V S G N S S I S T T I T N S K Y
 F E T K N S E T N E D S K S K K H S K E K C R G G N D
 R G C D G N V L L L S T K K

40

(配列番号25; f s p Iに対応する、配列番号24によって示される核酸配列の翻訳産物を示す)。

【0098】

50

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0099】

【化21】

E D I W K V N K K L T S G G K N Q D R K L D Q I I Q K
 G Q Q V K I Q N I C K L I R D K P H T N Q E K E K C M
 K F C T K N V C K G Y R G A C D G N I C Y C S R P S N
 L G P D W K V N E R I E R L P I T K I L V S G N S S I
 S T T I T N S K Y F E T K N S E T N E D S K S K K H S
 K E K C R G G N D R G C D G N V L L L S T K K

10

(配列番号26；f s p Iの見かけの完全長翻訳産物を示す)。

【0100】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0101】

【化22】

W K V N K K L T S G G K N Q D R K L D Q I I Q K G Q Q
 V K I Q N I C K L I R D K P H T N Q E K E K C M K F C
 T K N V C K G Y R G A C D G N I C Y C S R P S N L G P
 D W K V N E R I E R L P I T K I L V S G N S S I S T T
 I T N S K Y F E T K N S E T N E D S K S K K H S K E K
 C R G G N D R G C D G N V L L L S T K K

20

(配列番号35；f s p Iに対応する、配列番号34によって示される核酸配列の翻訳産物を示す)。

30

【0102】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0103】

【化23】

D I E N I K K G E G Q P G A P G G K E N N L S V L

(配列番号31；f s p NのエンドプロテイナーゼA s p - NフラグメントのN - 末端部分アミノ酸配列を示し、P f s p N (1 0 0 - 1 0 1) と称する)。

【0104】

40

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0105】

【化24】

A R A R S V G S M K N K L K S F S E K Y V W A A L T S
 N D N L R K M S G G R M I N D I L N D I D N I K K G N
 G Q P N A P G K T E N K L S V S D R S S R Y L S S I R
 F S L F R P R Y K I E N Q D L E P S S L Y P G Q G A L
 H V I E L H K D K N Q W N V K T L Y R N N D Q Q E L K
 P M K L A K C G D T C S Y E T F K S T L Q S Y N M D K
 T A H D K L C K S S

10

(配列番号51; f s p Nタンパク質に対応する、配列番号50によって示される核酸配列の翻訳産物を示す)。GenBankに報告されたアミノ酸配列と配列番号51のアミノ酸配列との比較は、配列番号51がヒト前立腺酸ホスファターゼ (prostatic acid phosphatase) と約28%同一であることを示している。

【0106】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0107】

20

【化25】

G T R K N E L K S F S E E Y L W R A L T S N E N L R K
 M S G G R M I N D I L N D I D S I K E E R D N R V L L
 E K Q E I K L S M L T V P Q A I L A A F V S A F A P K
 G T K I E N Q D L G P S S L Y P G Q G A L H V I E L H
 K D N N Q W S V K V L Y R N N D K M E L E P M K L P S
 C D D K C P C E L L N Q L Y N P M I

30

(配列番号53; f s p Nタンパク質に対応する、配列番号52によって示される核酸配列の翻訳産物を示す)。GenBankに報告されたアミノ酸配列と配列番号53のアミノ酸配列との比較は、配列番号53がヒト前立腺酸ホスファターゼと約30%同一であることを示している。

【0108】

本発明の処方物はまた、下記のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得る：

【0109】

【化26】

M W R L L L V I S S A L I I Q N V N A E L K F V F A T
 A T R Y V S H T P S P C D P G G P K I T N K P G D F Q
 R V

40

(配列番号54; f s p Nタンパク質のN-末端部分アミノ酸配列を示す)。

【0110】

本発明の処方物はまた、配列番号56のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する少なくとも1つの単離されたタンパク質をも含み得、配列番号56は、配列番号55によって示される核酸配列の見かけの全長翻訳産物を示し、明らかにf s p N3タンパク質に対応する。GenBankに報告されたアミノ酸配列と配列番号56のアミノ酸配列との比較は

50

配列番号56がヒト前立腺酸ホスファターゼと約30%同一であることを示している。

【0111】

本発明の外部寄生生物唾液タンパク質は、唾液抽出物FS-1、FS-2若しくはFS-3に含まれるタンパク質の少なくとも一部、及び好ましくは下記の唾液タンパク質の少なくとも一部の完全長タンパク質、ハイブリッドタンパク質、融合タンパク質、多価タンパク質、及び短縮型相同体であるタンパク質、若しくはタンパク質分解生成物であるタンパク質を含むがこれらに限定されないということが理解されるはずである：fspA、fspB、fspC1、fspC2、fspD1、fspD2、fspE、fspF、fspG1、fspG2、fspG3、fspH、fspI、fspJ1、fspJ2、fspK、fspL1、fspL2、fspM1、fspM2、fspN1、fspN2及び/又はfspN3。同様に、以下のアミノ酸配列のうちの一つの少なくとも一部を有するタンパク質もまた含まれる；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14、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号51、配列番号53、配列番号54及び/又は配列番号56。本明細書中で用いられるように、用語ハイブリッドタンパク質とは2つの異なるタンパク質から生成された単一のタンパク質をいう。

10

【0112】

前述の配列番号は実施例に開示された方法に従って推定したアミノ酸配列を表す。アミノ酸配列決定技術は完全にエラーがないというわけではないので前述の配列番号は、本発明の外部寄生生物唾液タンパク質の最良の、見かけのアミノ酸配列を示すということを留意すべきである。更に、前述の配列番号において見られる変化もまた、少なくとも部分的には対立遺伝子変化が原因であり得る。この理由は、配列決定されるタンパク質がノミの集団から誘導されたものだからである。

20

【0113】

本発明によれば、本発明の処方物は、翻訳後修飾を受けたノミ唾液タンパク質を含み得る。そのような修飾は、例えば、グリコシル化を含み得る。グリコシル化はN-結合及び/又はO-結合オリゴサッカライドの付加を含み得る。本発明のタンパク質の翻訳後修飾は、即時型若しくは遅延型過敏症応答において、エピトープがそのタンパク質に対してアレルギー性応答を誘導する能力に寄与し得るということが理解される。

30

【0114】

本発明の別の実施態様は、厳格な条件下で、本発明の外部寄生生物唾液タンパク質をコードする外部寄生生物唾液タンパク質遺伝子とハイブリダイズし得る単離された核酸分子である。本発明によれば、単離された核酸分子は、その天然の環境から取り出された（すなわち、ヒトの操作の対象となった）核酸分子である。このように、「単離された」とは、どの程度核酸分子が精製されているかを反映するものではない。単離された核酸分子はDNA、RNA、又はDNA若しくはRNAのいずれかの誘導体を含み得る。

【0115】

本発明の単離された核酸分子は、その遺伝子と安定なハイブリッドを形成し得る、全体の（すなわち完全な）遺伝子若しくはそれらの一部として、天然の供給源から入手され得る。本明細書中で用いられるように、ある物の「少なくとも一部」という用語は、少なくともその物の機能的な側面を持つのに十分なその物の量をいう。例えば、本明細書中で用いられるように、核酸配列の少なくとも一部とは、厳格なハイブリダイゼーション条件下で、対応する遺伝子と安定にハイブリッドを形成し得る核酸配列の量をいう。本発明の単離された核酸分子はまた、組換えDNA技術（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、クローニング）若しくは化学合成を用いて生成し得る。単離された外部寄生生物唾液タンパク質核酸分子は、天然の核酸分子及びそれらの相同体を含み、それは、天然の対立遺伝子変種及び改変された核酸分子を含むがこれらに限定されない。この改変された核酸分子は、そのような改変によってその核酸分子が本発明の外部寄生生物唾液タンパク質

40

50

をコードする能力若しくは厳格な条件下で天然の核酸分子単離物と安定なハイブリッドを形成する能力を実質的に妨げないような方法で、ヌクレオチドが挿入、欠失、置換及び/又は逆位されている。

【0116】

本発明の単離された核酸分子は、本発明の少なくとも1つの外部寄生生物唾液タンパク質をコードする核酸配列を含み得、そのようなタンパク質の例が本明細書中に開示される。「核酸分子」という用語は主に物理的な核酸分子をいい、そして「核酸配列」という用語は主にその核酸分子上のヌクレオチドの配列をいうが、これら2つの用語は、特に、外部寄生生物唾液タンパク質をコードし得る核酸分子若しくは核酸配列に関しては、交換可能に用いることができる。これまでに開示してきたように、本発明の外部寄生生物唾液タンパク質は、全長外部寄生生物唾液タンパク質コード領域、それらの部分を有するタンパク質、及び他の外部寄生生物唾液タンパク質相同体を含むがこれらに限定されない。

10

【0117】

本発明の外部寄生生物唾液タンパク質は、ポリタンパク質をコードする完全長核酸配列によってコードされ得るということが理解される。このポリタンパク質は、唾液中に見られる多数のタンパク質に翻訳後にプロセスされ得る。本明細書中で用いられるように、外部寄生生物唾液タンパク質遺伝子は、天然の外部寄生生物唾液タンパク質に関与する全ての核酸配列、例えば、その遺伝子によってコードされる外部寄生生物唾液タンパク質の生成を制御する調節領域（例えば、転写制御領域、翻訳制御領域、若しくは翻訳後制御領域があるがこれらに限定されない）並びにそのコード領域を含む。本発明の核酸分子は単離された天然の外部寄生生物唾液タンパク質核酸分子若しくはその相同体であり得る。本発明の核酸分子は、1以上の調節領域、完全長若しくは部分コード領域、又はそれらの組合せを含み得る。本発明の外部寄生生物唾液タンパク質核酸分子の最小サイズは、厳格なハイブリダイゼーションの条件下で対応する天然の遺伝子と安定なハイブリッドを形成し得る最小のサイズである。

20

【0118】

外部寄生生物唾液タンパク質核酸分子相同体は、当業者に公知の多くの方法（例えば、Sambrook et al., 前出、を参照）を用いて生成され得る。例えば、核酸分子は、伝統的な変異誘発技術及び部位特異的変異誘発のような組換えDNA技術、変異を誘発するための核酸分子の化学的処理、核酸フラグメントの制限酵素消化、核酸分子の連結、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、及び/又は核酸配列の選択した領域の変異誘発、オリゴヌクレオチド混合物の合成、及び核酸分子の混合物の「構築」のための混合物群の連結、及びそれらの組合せ、を含むがこれらに限定されない種々の方法を用いて改変され得る。核酸分子相同体は、核酸によってコードされるタンパク質の機能（例えば、相同体がアレルギー性皮膚炎の動物内のアレルギー反応を誘発する能力若しくは相同体が抗凝血物質として作用する能力）についてのスクリーニングによって、及び/又は厳格な条件下での単離された外部寄生生物唾液タンパク質核酸とのハイブリダイゼーションによって、改変された核酸分子の混合物から選択され得る。

30

【0119】

本発明の一つの実施態様は、唾液抽出物FS-1、FS-2若しくはFS-3に含まれる、ノミ唾液産生物の少なくとも一部をコードし得る外部寄生生物唾液タンパク質核酸分子、若しくはその相同体（例えば、他の外部寄生生物の唾液産生物）である。ここで、FS-1は、HPLCにかけられた場合、ピークA、ピークB、ピークC、ピークD、ピークE、ピークF、ピークG、ピークH、ピークI、ピークJ、ピークK、ピークL、ピークM、及び/又はピークNに分離する。好ましい核酸分子は、下記の1以上のタンパク質の少なくとも一部をコードし得る：f s p A、f s p B、f s p C 1、f s p C 2、f s p D 1、f s p D 2、f s p E、f s p F、f s p G 1、f s p G 2、f s p G 3、f s p H、f s p I、f s p J 1、f s p J 2、f s p K、f s p L 1、f s p L 2、f s p M 1、f s p M 2、f s p N 1、f s p N 2及びf s p N 3、若しくはこれらの相同体。同様に、好ましい核酸分子は、下記の1以上のアミノ酸配列の少なくとも一部を有する

40

50

タンパク質をコードする核酸分子であるが、それらに限定されない：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 14、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 51、配列番号 53、配列番号 54 及び / 又は配列番号 56、若しくはこれらの相同体。

【0120】

本発明の好ましい核酸分子は、厳格な条件下で、唾液抽出物 FS - 1、FS - 2 若しくは FS - 3 に含まれる、ノミ唾液産生物若しくはその相同体（例えば、別の外部寄生生物の唾液産生物）の少なくとも一部をコードする核酸とハイブリダイズし得る。唾液抽出物 FS - 1、FS - 2 若しくは FS - 3 に含まれる、ノミ唾液産生物若しくはその相同体（例えば、別の外部寄生生物の唾液産生物）の少なくとも一部をコードする核酸配列の対応する領域と、少なくとも約 65%、より好ましくは少なくとも約 75%、更に好ましくは少なくとも約 85%、そしてより一層好ましくは少なくとも約 95% の相同体を有する核酸配列を含む外部寄生生物唾液タンパク質核酸分子もまた好ましい。特に好ましい核酸配列は、下記の 1 以上のタンパク質の少なくとも一部をコードする核酸配列と、少なくとも約 65%、より好ましくは少なくとも約 75%、更に好ましくは少なくとも約 85%、そしてより一層好ましくは少なくとも約 95% の相同体を有する核酸配列である：f s p A、f s p B、f s p C 1、f s p C 2、f s p D 1、f s p D 2、f s p E、f s p F、f s p G 1、f s p G 2、f s p G 3、f s p H、f s p I、f s p J 1、f s p J 2、f s p K、f s p L 1、f s p L 2、f s p M 1、f s p M 2、f s p N 1、f s p N 2 及び f s p N 3。同様に、下記の 1 以上のアミノ酸配列の少なくとも一部をコードする核酸配列と、少なくとも約 65%、より好ましくは少なくとも約 75%、更に好ましくは少なくとも約 85%、そしてより一層好ましくは少なくとも約 95% の相同体を有する核酸分子もまた好ましい：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 14、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 51、配列番号 53、配列番号 54 及び / 又は配列番号 56。

【0121】

このような核酸分子は、完全長タンパク質、ハイブリッドタンパク質、融合タンパク質、多価タンパク質若しくは短縮型フラグメントをコードする完全長遺伝子及び / 又は核酸分子であり得る。本発明のより好ましい核酸分子は、配列番号 20、配列番号 24、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 50、配列番号 52、若しくは配列番号 55 によって示される核酸配列を有する単離された核酸分子を含む。配列番号 20 は、ノミ唾液タンパク質 f s p H をコードする見かけの遺伝子の約 60 ヌクレオチドを含む核酸配列であり、f s p H のコード領域の約 25% を含む。配列番号 24 は、ノミ唾液タンパク質 f s p I をコードする見かけの遺伝子の約 573 ヌクレオチドを含む核酸配列であり、配列番号 25 で示される約 149 アミノ酸をコードする。f s p I の全翻訳産物は、見かけ上約 158 アミノ酸であり、配列番号 26 と表される。配列番号 32 は、ノミ唾液タンパク質 f s p H をコードする見かけの遺伝子の 242 b p の核酸配列であり、配列番号 33 で示される約 80 アミノ酸のタンパク質をコードする。配列番号 34 は、ノミ唾液タンパク質 f s p I をコードする見かけの遺伝子の 591 b p の核酸配列であり、配列番号 35 で示される約 155 アミノ酸のタンパク質をコードする。配列番号 50 は、f s p N ノミ唾液タンパク質をコードする見かけの遺伝子の 646 b p の核酸配列であり、配列番号 51 で示される約 172 アミノ酸のタンパク質をコードする。配列番号 52 は、f s p N ノミ唾液タンパク質をコードする見かけの遺伝子の 612 b p の核酸配列であり、配列番号 53 で示される約 153 アミノ酸のタンパク質をコードする。配列番号 55 は、f s p N 3 をコードする見かけの遺伝子の 1197 b p の核酸配列であり、配列番号 56 で示される約 398 アミノ酸のタンパク質をコードする。

【 0 1 2 2 】

本発明の外部寄生生物唾液タンパク質の核酸配列を知ることにより、当業者は、その核酸分子のコピーを作製すること、並びに外部寄生生物唾液タンパク質をコードする遺伝子の別の部分の核酸分子（例えば、翻訳開始部位及び／又は転写及び／又は翻訳制御領域を含む核酸分子）、及び／又は外部寄生生物唾液タンパク質核酸分子相同体入手することが可能になる。本発明の外部寄生生物唾液タンパク質のアミノ酸配列を知ることにより、当業者は、そのような外部寄生生物唾液タンパク質をコードする核酸配列をクローン化することが可能になる。更に、所望の外部寄生生物唾液タンパク質核酸分子は、適切な発現ライブラリーを、本発明の外部寄生生物唾液タンパク質に結合する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若しくはDNA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用いる従来のクローニング技術；及び本発明のオリゴヌクレオチドプライマーを用いる適切なライブラリー、あるいはRNA若しくはDNA（ゲノムDNA及び／又はcDNAを用いることができる）のPCR増幅を含む種々の方法で入手し得る。ノミ唾液タンパク質核酸分子を単離するために、好ましいcDNAライブラリーは、餌を与えられていないノミ全体（*unfed whole flea*）、餌を与えられたノミ全体、餌を与えられたノミ中腸、餌を与えられていないノミ中腸、及びノミ唾液腺から作製されたcDNAライブラリーを含む。遺伝子をクローン化しそして増幅する技術は、例えば、*Sambrook et al.*、前出、に開示されている。実施例の節は、本発明のノミ唾液タンパク質をコードするcDNA配列の単離の実施例を含む。

10

20

【 0 1 2 3 】

本発明はまた、唾液抽出物FS-1、FS-2若しくはFS-3に含まれる、ノミ唾液産生物若しくはその相同体（例えば、他の外部寄生生物の唾液産生物）の少なくとも一部をコードする本発明の他の核酸分子、好ましくはより長い核酸分子の相補的領域と、厳格な条件下で、ハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドである核酸分子をも含む。好ましいオリゴヌクレオチドは、下記の1以上のタンパク質の少なくとも一部をコードし得る核酸分子と、厳格な条件下でハイブリダイズし得る：*fspA*、*fspB*、*fspC1*、*fspC2*、*fspD1*、*fspD2*、*fspE*、*fspF*、*fspG1*、*fspG2*、*fspG3*、*fspH*、*fspI*、*fspJ1*、*fspJ2*、*fspK*、*fspL1*、*fspL2*、*fspM1*、*fspM2*、*fspN1*、*fspN2*及び*fspN3*、若しくはこれらの相同体。同様に、特定の好ましいオリゴヌクレオチドは、下記の1以上のアミノ酸配列の少なくとも一部を有するタンパク質をコードし得る核酸分子と、ハイブリダイズし得る：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14、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号51、配列番号53、配列番号54及び／又は配列番号56、若しくはこれらの相同体。特定の好ましいオリゴヌクレオチドは、配列番号20、配列番号24、配列番号32、配列番号34、配列番号50、配列番号52、配列番号55によって表される核酸配列を含む核酸分子若しくはこれらの相補物とハイブリダイズし得る。

30

40

【 0 1 2 4 】

本発明のオリゴヌクレオチドは、RNA、DNA、若しくはいずれかの誘導體であり得る。このようなオリゴヌクレオチドの最小サイズは、所定のオリゴヌクレオチドと本発明のもう一つの核酸分子上の相補的な配列との間に安定なハイブリッドを形成するのに必要とされるサイズである。最小サイズの特性を本明細書中に開示する。このオリゴヌクレオチドのサイズは、本発明によるオリゴヌクレオチドの使用に十分でなければならない。本発明のオリゴヌクレオチドは、さらなる核酸分子を同定するためのプローブとして、核酸分子を増幅若しくは伸張するためのプライマーとして、若しくは、例えば、外部寄生生物による唾液タンパク質の発現を阻害する治療的応用を含むがこれらに限定されない種々の応用に用いることができる。このような治療的応用は、例えば、アンチセンス - 、三重鎖

50

形成 -、リボザイム -、及び / 又は RNA 薬剤 - を基礎にした技術におけるそのようなオリゴヌクレオチドの使用を包含する。したがって、本発明は、そのような技術の一つ以上用いることにより、外部寄生生物唾液タンパク質の生成を妨げるそのようなオリゴヌクレオチド及び方法を包含する。

【 0 1 2 5 】

本発明はまた、組換えベクターを含み、この組換えベクターは、宿主細胞内に本発明の核酸分子を送達し得る任意のベクターに挿入された本発明の外部寄生生物唾液タンパク質核酸分子を含む。このようなベクターは、異種核酸配列、すなわち、天然では本発明の外部寄生生物唾液タンパク質核酸分子に隣接して見いだされることはない核酸配列を含む。このベクターは、RNA 若しくは DNA のいずれかであり得、原核細胞性若しくは真核細胞性のいずれかであり得、そして代表的にはウイルス若しくはプラスミドである。組換えベクターは、本発明の外部寄生生物唾液タンパク質核酸分子のクローニング、配列決定、及び / 又は他の操作に用いることができる。組換えベクターの一つのタイプを、本明細書中では組換え分子といい、以下により詳細に記載するが、本発明の核酸分子の発現に用いることができる。好ましい組換えベクターは、形質転換された細胞内で複製が可能なものである。

【 0 1 2 6 】

本発明の組換えベクターに含まれる好ましい核酸分子は、唾液抽出物 FS - 1、FS - 2 若しくは FS - 3 に含まれる少なくとも 1 つのノミ唾液産生物若しくはそれらの相同体（例えば、他の外部寄生生物の唾液産生物）の少なくとも一部をコードする核酸分子である。組換えベクターに含まれる特に好ましい核酸分子は、下記の 1 以上のタンパク質の少なくとも一部をコードし得る： f s p A、f s p B、f s p C 1、f s p C 2、f s p D 1、f s p D 2、f s p E、f s p F、f s p G 1、f s p G 2、f s p G 3、f s p H、f s p I、f s p J 1、f s p J 2、f s p K、f s p L 1、f s p L 2、f s p M 1、f s p M 2、f s p N 1、f s p N 2 及び f s p N 3、若しくはこれらの相同体。同様に、下記の 1 以上のアミノ酸配列の少なくとも一部を有するタンパク質をコードする核酸分子もまた含まれる：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 14、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 51、配列番号 53、配列番号 54 及び / 又は配列番号 56、若しくはこれらの相同体、及び配列番号 20、配列番号 24、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 50、配列番号 52 及び / 又は配列番号 55 によって表される核酸配列の少なくとも一部を含む核酸分子。

【 0 1 2 7 】

一つの実施態様において、本発明の単離された外部寄生生物唾液タンパク質は、そのタンパク質を生成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する工程、及びそのタンパク質を回収する工程によって生成される。培養する好ましい細胞は、外部寄生生物唾液タンパク質を発現し得る組換え細胞であり、この組換え細胞は、宿主細胞を本発明の 1 以上の核酸分子で形質転換することにより生成される。核酸分子の細胞への形質転換は、核酸分子をその細胞に挿入し得る任意の方法により達成し得る。形質転換技術は、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、及びプロトプラスト融合を含むがそれらに限定されない。組換え細胞は、単細胞のままであってもよいし、あるいは組織、器官、若しくは多細胞生物へ生育していてもよい。形質転換された本発明の核酸分子は、染色体外に留まっていてもよいし、あるいは形質転換された（すなわち、組換え）細胞の染色体内の 1 以上の部位に、それらが発現される能力を保持するように組み込まれることもできる。宿主細胞を形質転換するのに用いられる好ましい核酸分子は、唾液抽出物 FS - 1、FS - 2、若しくは FS - 3 に含まれる、ノミ唾液産生物若しくはそれらの相同体（例えば、別の外部寄生生物の唾液産生物）の少なくとも一部をコードする核酸分子を含む。宿主細胞を形質転換する

のに用いられる特に好ましい核酸分子は、本発明の組換えベクターに含まれ、本明細書中に開示される。

【0128】

形質転換のための適切な宿主細胞は、形質転換可能で、導入される外部寄生生物唾液タンパク質を発現することができる任意の細胞を含む。したがってこのような細胞は、少なくとも1つの本発明の核酸分子で形質転換後、本発明の外部寄生生物唾液タンパク質を産生することができる。宿主細胞は、形質転換されていない細胞であっても、又は既に少なくとも1つの核酸分子で形質転換されている細胞であってもよい。本発明の適切な宿主細胞は、細菌、真菌（酵母を含む）、昆虫、動物及び植物細胞を含んでよい。好適な宿主細胞は、細菌、酵母、昆虫及び哺乳動物細胞を含み、細菌（例えば *E. coli*（大腸菌）及び昆虫（例えばスポドプテラ（*Spodoptera*））細胞が特に好適である。

10

【0129】

組換え細胞は、好適には宿主細胞を、各々、1つ以上の転写制御配列を含有する発現ベクターに機能的に結合された本発明の1つ以上の核酸分子を含む、1つ以上の組換え分子で形質転換することにより産生される。機能的に結合されたという用語は、宿主細胞に形質転換される時、核酸分子が発現できるように発現ベクターに核酸分子を挿入することを意味する。本明細書で使用される時、発現ベクターは、宿主細胞を形質転換することができ、特定の核酸分子を発現させることができる、DNA又はRNAベクターである。好適には、この発現ベクターはまた、宿主細胞中で複製することができる。発現ベクターは、原核又は真核生物であってよく、典型的にはウイルス又はプラスミドである。本発明の発現ベクターは、本発明の組換え細胞（細菌、真菌、昆虫、動物、及び/又は植物細胞を含む）内で機能する（すなわち、遺伝子発現を指令する）任意のベクターを含む。このようものとして、本発明の核酸分子は、プロモーター、オペレーター、リプレッサー、エンハンサー、終結配列、複製の開始点のような調節配列、及び組換え細胞と融和性であり、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有する発現ベクターに機能的に結合させることができる。本明細書で使用される時、転写制御配列は、転写の開始、伸長、及び終結を制御することができる配列を含む。特に重要な転写制御配列は、転写の開始を制御する、プロモーター、エンハンサー、オペレーター及びリプレッサー配列のような配列である。適切な転写制御配列は、本発明の少なくとも1つの組換え細胞内で機能することができる任意の転写制御配列を含む。このような種々の転写制御配列が、当業者には知られている。好適な転写制御配列は、細菌、酵母、蠕虫、昆虫及び哺乳動物細胞中で機能する、例えば、*tac*、*lac*、*trp*、*trc*、*oxy-pro*、*omp/lpp*、*rrnB*、バクテリオファージラムダ（ λ ）（例えば、 p_L 及び p_R 並びに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、T7*lac*、バクテリオファージT3、バクテリオファージSP6、バクテリオファージSP01、メタロチオネイン、アルファ接合因子（*alpha mating factor*）、ピキア（*Pichia*）アルコールオキシダーゼ、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（*Sindbis*）ウイルスサブゲノムプロモーター）、バキュロウイルス、ヘリオチス・ゼア（*Heliothis zea*）昆虫ウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40、レトロウイルスのアクチン、レトロウイルスのロングターミナルリピート（*long terminal repeat*）、ラウス肉腫ウイルス、熱ショック、リン酸及び硝酸転写制御配列、並びに原核又は真核細胞における遺伝子発現を制御することができる他の配列を含むが、これらに限定されない。これらに追加して適切な転写制御配列は、組織特異的プロモーター及びエンハンサー並びにリンホカイン-誘導性プロモーター（例えば、インターフェロン又はインターロイキンにより誘導可能なプロモーター）を含む。本発明の転写制御配列はまた、外部寄生生物唾液タンパク質をコードするDNA配列に本来結合している天然の転写制御配列も含む。

20

30

40

【0130】

本発明の発現ベクターはまた、発現した外部寄生生物唾液タンパク質を、このタンパク

50

質を産生する細胞から分泌させることのできる分泌シグナル（すなわち、シグナルセグメント核酸配列）を含有してもよい。適切なシグナルセグメントは、外部寄生生物唾液タンパク質シグナルセグメント、又は本発明の外部寄生生物唾液タンパク質（融合タンパク質を含む）の分泌を指令することができる任意の異種性シグナルセグメントを含む。好適なシグナルセグメントは、組織プラスミノゲンアクチベーター（t - P A）、インターフェロン、インターロイキン、成長ホルモン、組織適合性及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を含むが、これらに限定されない。

【0131】

本発明の発現ベクターはまた、融合タンパク質としての本発明の挿入された核酸分子の発現を引き起こす融合配列を含有してもよい。本発明の外部寄生生物核酸分子の一部として融合配列を含むと、核酸分子によりコードされるタンパク質の産生、貯蔵及び/又は使用の間の安定性が増強される。更には、融合セグメントは、外部寄生生物唾液タンパク質の精製を単純化する（例えば、生じた融合タンパク質の、親和性クロマトグラフィーを利用した精製を可能にする）ための道具として機能することができる。適切な融合セグメントは、目的の機能（例えば、安定性の向上及び/又は精製の道具）を有する任意の大きさのドメインであってよい。1つ以上の融合セグメントを使用することは、本発明の範囲内である。融合セグメントは、外部寄生生物唾液タンパク質のアミノ末端及び/又はカルボキシル末端に結合することができる。融合セグメントと外部寄生生物唾液タンパク質との間の結合は、外部寄生生物唾液タンパク質の直接の回収ができるように開裂を受けやすく構築することができる。好適には融合タンパク質は、外部寄生生物唾液タンパク質のカルボキシル末端及び/又はアミノ末端に結合し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配列で形質転換した組換え細胞を培養することにより産生される。

【0132】

本発明の組換え分子は、形質転換すべき細胞内で核酸分子の発現を有効に調節することができる少なくとも1つの任意の転写制御配列に、機能的に結合された少なくとも1つの前述の任意の核酸分子を含んでよい分子である。好適な組換え分子は、唾液抽出物のFS - 1、FS - 2、又はFS - 3に含有されている、ノミの唾液産生物又はその相同体（例えば、他の外部寄生生物の唾液産生物）の少なくとも一部をコードする1つ以上の核酸分子を含む。組換え分子に含まれる特に好適な核酸分子は、本発明の組換えベクターに含まれる分子として本明細書に開示されている分子である。

【0133】

本発明の組換え細胞は、本発明の少なくとも1つの任意の核酸分子で形質転換された任意の細胞を含む。好適な組換え細胞は、唾液抽出物のFS - 1、FS - 2、及び/又はFS - 3に含有されている、ノミの唾液産生物又はその相同体（例えば、他の外部寄生生物の唾液産生物）の少なくとも一部をコードする少なくとも1つの核酸分子で形質転換された細胞である。好適な組換え細胞は、fspA、fspB、fspC1、fspC2、fspD1、fspD2、fspE、fspF、fspG1、fspG2、fspG3、fspH、fspI、fspJ1、fspJ2、fspK、fspL1、fspL2、fspM1、fspM2、fspN1、fspN2及びfspN3の1つ以上のタンパク質又はその相同体の、少なくとも一部をコードすることができる少なくとも1つの核酸分子で形質転換されている。このようなものとして、1つ以上の下記アミノ酸配列：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14、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号51、配列番号53、配列番号54及び/又は配列番号56、あるいはこれらの相同体の少なくとも一部を有するタンパク質をコードする核酸分子、並びに配列番号20、配列番号24、配列番号32、配列番号34、配列番号50、配列番号52及び/又は配列番号55で表される核酸配列の少なくとも一部を含む核酸分子も含まれる。特に好適な組換え細胞は、少なくとも1つの前述の核酸分子で形質転換されたE. coliを含む。

【0134】

組換えDNA法の使用により、例えば、宿主細胞内の核酸分子のコピー数、これらの核酸分子が転写される効率、生じた転写物が翻訳される効率、及び翻訳後修飾の効率を操作することにより、形質転換された核酸分子の発現を改善できることは当業者には理解されるであろう。本発明の核酸分子の発現を増大させるのに有用な組換え法は、高コピー数のプラスミドへの核酸分子の機能的な結合、1つ以上の宿主細胞染色体中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）の置換又は修飾、翻訳制御シグナル（例えば、リボソーム結合部位、シャイン-ダルガーノ（Shine-Dalgarno）配列）の置換又は修飾、宿主細胞のコドンの使用法に対応するための本発明の核酸分子の修飾、転写物を不安定にする配列の削除、及び発酵中組換えタンパク質産生から組換え細胞増殖を一時的に分離する制御シグナルの使用を含むが、これらに限定されない。本発明の発現した組換えタンパク質の活性は、生じたタンパク質を断片化、修飾、又は誘導体化することにより改善することができる。

【0135】

本発明により、組換え細胞は、本発明の外部寄生生物唾液タンパク質を産生させるのに有効な条件下でこのような細胞を培養し、そのタンパク質を回収することにより、このようなタンパク質を産生するために使用することができる。タンパク質を産生するのに有効な条件は、適切な培地、バイオリアクター、温度、pH及びタンパク質産生が可能な酸素条件を含むが、これらに限定されない。適切な、又は有効な培地とは、本発明の細胞を培養するとき、外部寄生生物唾液タンパク質を産生することができる任意の培地を意味する。このような培地は、典型的には同化性炭水化物、窒素及びリン酸源、並びに適切な塩類、鉱物、金属及び他の栄養物（例えばビタミン）を含む水性培地である。この培地は、複合栄養を含んでもよいし、又は規定最少培地であってもよい。

【0136】

本発明の細胞は、従来の発酵バイオリアクター（バッチ、供給-バッチ（fed-batch）、細胞再循環、及び連続発酵槽を含むが、これらに限定されない）で培養することができる。培養はまた、振盪フラスコ、試験管、マイクロタイタープレート、及びシャーレでも実施することができる。培養は、組換え細胞に適切な温度、pH及び酸素含量で行われる。このような培養条件は、当業者には十分にその専門技術の範囲内である。

【0137】

産生に使用されるベクター及び宿主系により、生じる外部寄生生物唾液タンパク質は、組換え細胞内に残るか；発酵培地中に分泌されるか；E. coliの細胞周辺腔のような、2つの細胞膜の間の空隙中に分泌されるか；又は細胞若しくはウイルス膜の外表面に保持されるかのいずれかである。「タンパク質を回収する」という用語は、タンパク質を含有する全発酵培地を単に集めることを意味し、分離又は精製という追加の工程を包含する必要はない。本発明の外部寄生生物唾液タンパク質は、種々の標準的タンパク質精製法（例えば、親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、濾過、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、クロマトフォーカシング及び示差的可溶化（differential solubilization）であるが、これらに限定されない）を使用して精製することができる。

【0138】

外部寄生生物唾液タンパク質は、好適には「実質的に純粋な」形で回収される。本明細書で使用されるとき、「実質的に純粋な」とは、治療用組成物又は診断用としてこのタンパク質を有効に使用することができる純度を意味する。例えば、本発明の組換え細胞から単離される外部寄生生物唾液タンパク質の投薬を受けた動物は、このタンパク質と混合された混入物からの実質的な毒性を示してはならない。

【0139】

実質的に混入物質を含まない外部寄生生物唾液産生物は、本発明の唾液収集装置を使用

して単離することができる。本発明の唾液収集装置は、容器内に保持された外部寄生生物の摂餌を刺激し（すなわち、摂餌を引き起こし）、これにより唾液（混入物質とは別々に集められる）を放出させるように設計されている。

【0140】

外部寄生生物は温血宿主動物に付着し、そこから摂餌する。本明細書で使用される時、宿主動物とは、外部寄生生物がそこから又はそこで摂餌することができる動物を意味する。理論によって拘束されるわけではないが、ノミのような外部寄生生物は、宿主の暖かい皮膚と周囲の大気との温度差を、その外部寄生生物が感知することができるように熱受容体を有すると考えられている。温度の差が、外部寄生生物に暖かい表面からの（すなわち、暖かい動物の皮膚からの）摂餌を刺激する（すなわち、摂餌を引き起こす）。また、運動、振動及び暗闇も外部寄生生物は感知することができ、これにより、外部寄生生物の摂餌が促進されると考えられている。外部寄生生物は、動物の皮膚をその口器で貫通（口器はその位置に留まる）して摂餌し、一方で外部寄生生物は唾液を分泌して摂餌を助長している。摂餌中、外部寄生生物は血液タンパク質及び糞便のような汚染物を放出することができる。

10

【0141】

本発明の唾液収集装置は、ハウジングに保持される外部寄生生物に、チャンバーからの摂餌をさせるか、又はそれを促進する、装置のチャンバーとハウジングの間の温度差が維持されるような、チャンバーとハウジングを含む。このような装置に居る外部寄生生物が本発明により摂餌を試みるとき、この節足動物は唾液を放出し、唾液中のタンパク質及び他の産生物が、実質的に混入物質を含まずに単離されるようにこの唾液が収集される。実質的に混入物質を含まない唾液を収集するために、本発明の装置はまた、混入物質を捕捉する表面とは別の表面に唾液を捕捉するための収集手段を含む。

20

【0142】

本発明の唾液収集装置は、本明細書に開示されるような任意の外部寄生生物からの唾液を収集するのに使用することができる。本発明の外部寄生生物は、外部寄生生物の侵襲に感受性の種々の脊椎動物を含むが、これらに限定されない任意の動物（すなわち、宿主動物）で摂餌することができる。好適な宿主動物は、哺乳動物及び鳥類を含む。更に好適な宿主動物は、ネコ、イヌ、ヒト、ウマ、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ブタ、ヤギ、アライグマ、クロアシタチ、ラット及びオポッサム、並びに他のペット、経済的な食用動物及びペットや経済的な食用動物に寄生するノミの宿主である動物を含む。特に好適な宿主動物は、ネコとイヌである。

30

【0143】

唾液を収集するための本発明の特に好適な外部寄生生物は、任意の適切な種のノミを含む。好適なノミは、ネコとイヌに寄生することができるノミを含む。下記の理由から、最初の血液の餌を未だ摂っていない新たに孵化したノミ（すなわち、サナギ状態から出現したばかりの）が好適である：なぜならば、新たに出現したノミは、未だ最初の血液の餌を摂っておらず、このようなノミは摂餌を試みるからである。新たに出現したノミは未だ血液の餌を摂っていないため、また、血液を摂ったノミほど多くの混入物質を放出しない。新たに出現したノミは、少なくとも1回の血液の餌を摂ったノミよりも、血液の餌なしに長く生存する。本発明の装置では、摂餌したノミも使用することができることに注意されたい。

40

【0144】

当業者には、本発明の唾液収集装置が、任意の外部寄生生物から唾液を収集するのに有用であることが明白であろう。説明の目的で、本発明のノミの唾液収集装置が以下に詳細に記載される。このような説明は、本発明の範囲を何ら限定するものではない。ノミからの唾液を収集するための方法に直接基づいて他の外部寄生生物からの唾液を収集することは、当業者の技術の範囲内である。

【0145】

本発明の1つの実施態様は、チャンバーとハウジングの間に温度差が維持されるように

50

、インターフェースに機能的に接続されたチャンバーとハウジングを含む、唾液収集装置である。インターフェースは、摂餌を試みるために、ノミの口器が収集手段の前に障壁手段を貫通するように配置された、収集手段と障壁手段を含む。チャンバーとハウジングの間の温度差は、インターフェースを通して摂餌を試み、そして収集手段に唾液産生物を沈積するように、ハウジング内に保持されたノミを誘引するのに適切な温度の差である。収集手段と障壁手段の相対位置により、混入物質は障壁手段に沈積する。

【0146】

本発明のノミの唾液収集装置は、ハウジングを含む。ハウジングは、構造を支持し、かつ保持手段に接続することができる、ノミを保持することができる任意の物質からなっており、ハウジングは好適には、当業者に通常使用される洗浄及び/又は滅菌工程に耐えることのできる物質で作られる。このようなものとして、ハウジングは再使用することができる。本発明の好適なハウジング物質は、プラスチック、金属、ゴム、木及びガラス物質並びにこのような物質の組合せを含むが、これらに限定されない。更に好適なハウジング物質は、プラスチック及び金属物質を含むが、プラスチック物質が更になお好適である。好適なプラスチック物質は、プレキシガラス、テフロン、ナイロン及びポリカーボネートを含む。特に好適なプラスチック物質は、プレキシガラス、又は他の耐久性のある破損抵抗性で、好適には容器の中のノミが見えるように透明のプラスチックである。

10

【0147】

本発明により、本発明のハウジングの大きさは、ハウジングが、過密になることなく目的数のノミを支持することができるような大きさである。ハウジングの表面積及び容量は両方とも重要である。ハウジングの大きさは、ハウジング内に保持されるノミの数により変化させうる。好適には、ハウジングの大きさは、ハウジング当たり約1,000匹～約6,000匹のノミを約72時間、更に好適にはハウジング当たり約2,000匹～約5,000匹のノミを約72時間、そして更に好適にはハウジング当たり約3,000匹～約4,000匹のノミを約72時間、維持するのに十分な大きさである。

20

【0148】

本発明のハウジングの適切な高さは、摂餌しながら動きまわる空間をノミに与えるのに十分な高さである。ノミのハウジングの高さは、好適には約1.0センチメートル(cm)～約3.0cm、更に好適には約1.5cm～約2.5cm、そして更に好適には約1.8cm～約2.2cmである。

30

【0149】

本発明のハウジングの形は、ハウジングに入っているノミが摂餌するのに適切な少なくとも1つの平らな表面を有する任意の形であってよい。本発明のハウジングは、好適には円筒形、4つ以上の側面を有する箱形、半ドーム形、又は半円筒形である。特に好適な形は、短い円筒形である。

【0150】

本発明の好適なハウジングの直径は広範に変化してよい。例えば、過密になることなくハウジング中に入れられるノミの数により、異なる直径の容器を使用することができる。本発明の丸いハウジングの内径は、好適には約4.0cm～約5.5cm、更に好適には約4.5cm～約5.5cm、そして更に好適には約5.0cmである。

40

【0151】

本発明により、ハウジングの大きさ、形、高さ、及び直径は、ハウジング内に保持される節足動物の大きさ及び数に依存して、異なる外部寄生生物について変化させることができる。

【0152】

本発明により、ハウジングは、保持手段及び交換手段に機能的に接続される。本明細書で使用されるとき、「機能的に接続される」とは、本発明の唾液収集装置の部分を、ノミが装置内に保持され、収集手段に唾液を沈積することができるように結合することを意味する。本発明の保持手段は、ノミの口器により貫通可能である。本発明の保持手段は、ノミを保持するのに適切で、これを通してノミが摂餌できる(すなわち、保持手段は、ノミ

50

の口器により貫通可能である)任意の物質又は物質の組合せからなっていてよい。このようなものとして、保持手段は、ノミの口器が貫通するために十分なほど大きい(すなわち、十分大きい)が、ここに保持されるノミの損失を有効に防止するために十分なほど小さい(すなわち、十分小さい)開口部を有する物質からなっていてよい。好適な保持手段は、約0.25ミリメートル(mm)~約0.50mmの開口部を有し、更に好適には約0.30mm~約0.50mmの開口部を有し、そして更に好適には約0.35mm~約0.45mmの開口部を有する物質よりなっている。当業者は、開口部の大きさを装置のハウジング内に保持される外部寄生生物の型により変化させることができることに気付くであろう。例えば、特に小さい外部寄生生物(例えばシラミであるが、これに限定されない)は、より小さい開口部を有する保持手段を必要とする。逆に、その口器を宿主動物に接

10

【0153】

保持手段として使用するための好適な物質は、金属網、ナイロン網、プラスチックフィルム、布及びこのような物質の組合せを含むが、これらに限定されない。更に好適な保持手段は、ナイロン網及び金属網を含み、そして更に好適な保持手段は、ナイロン網を含む。この収集装置は、種々の保持手段により改装することができる。好適な保持手段は再使用可能なものである。

【0154】

本発明の交換手段は、ハウジングの内部環境とハウジングの外部環境の間の、ガス、湿度及び熱の交換を可能にすることにより、ハウジング内のノミにとって許容しうる環境を維持することができる、任意の物質又は物質の組合せよりなっていてよい。ハウジングは、異なるガス、湿度及び熱透過性を有する異なる交換手段により改装することができる。本明細書で使用されるとき、ガスという用語は、ノミの生存に必要な任意の大気中のガスを意味し、二酸化炭素、酸素、及び窒素を含むが、これらに限定されない。ガスはまた、呼吸作用を含む代謝の気体産物又は糞便からのガスのような、本発明のハウジング内に維持される間にノミにより産生される気体産物をも意味する。

20

【0155】

本発明の交換手段は、ガス、熱及び湿度が漏出するためには十分に大きい、ノミの損失を有効に防止するためには十分に小さい開口部を有する物質よりなる。好適な交換手段は、約0.10ミリメートル(mm)~約0.45mmの開口部を有し、更に好適には約0.10mm~約0.30mmの開口部を有し、そして更に好適には0.13mm~約0.15mmの開口部を有する物質よりなる。

30

【0156】

交換手段として使用すべき好適な物質は、金属網、ナイロン網、プラスチック、布及びこのような物質の組合せを含むが、これらに限定されない。更に好適な交換手段は、ナイロン網、金属網、及びこのような物質の組合せを含み、そして更に好適な交換手段は、ナイロン網を含む。好適な交換物質は再使用可能なものである。

【0157】

本発明により、装置はハウジングに機能的に接続されたチャンバーを含む。本発明のチャンバーは、ハウジング内に保持されたノミによる装置の収集手段への唾液の沈積を促進する、装置のハウジングとチャンバーの間の温度差を作るのに適切な内部温度を維持することができる。好適なチャンバーはまた、装置内に入っている外部寄生生物の生存に適切な内部湿度レベルを維持することができる(例えば、外部寄生生物の脱水を防止するのに適している)。本発明のチャンバーはまた、実施例に詳述されるような人工摂餌システムに取付けることができる。チャンバーは、チャンバー内の適切な温度と湿度レベルを維持することができる任意の物質からなっていてよい。チャンバーは、好適には、当業者に通常使用されている洗浄又は滅菌工程に耐えることができる物質から作られる。このようなものとして、チャンバーは再使用することができる。本発明の好適なチャンバー物質は、ガラス、プラスチック、金属、ゴム、及び木、並びにこのような物質の組合せを含むが、これ

40

50

らに限定されない。更に好適なチャンパー物質は、ガラス及びプラスチック物質を含み、ガラス物質が更になお好適である。

【0158】

本発明により、本発明のチャンパーの大きさは、装置の収集手段にノミが唾液を沈積するのを刺激するために適切な温度レベルを維持することができるような大きさである。チャンパーの大きさは、チャンパー内に入れられるプロットング物質（下記に詳述される）の量、チャンパーに取付けられる収集手段の直径、あるいはこのチャンパーが、実施例に詳述されるような人工摂餌システムに取付けられるかどうかにより変化させることができる。好適には、本発明のチャンパーの高さは、プロットング物質がノミの生存に適切なチャンパー内の湿度レベルを維持するように、適切な量のプロットング物質をチャンパーに入れるのに十分な高さである。チャンパーの高さは、好適には約1.0cm～約7.0cm、更に好適には約2.0cm～約6.0cm、そしてより一層好適には約3.0cm～約5.0cmである。

10

【0159】

本発明により、チャンパーの形は、本発明のインターフェースを取付けることのできる少なくとも1つの開放末端を有する任意の形であってよい。本発明のチャンパーは、好適には両方が開放端の円筒形か、又は一方が開放端の円筒形である。特に好適な形は、両方が開放端の円筒形である。

【0160】

本発明の好適なチャンパーの直径は広範に変化させることができる。例えば、チャンパーに取付けられるインターフェースの直径又はチャンパーに取付けられるハウジングの直径により、異なる直径のチャンパーを使用することができる。本発明のチャンパーの内径は、好適には約2.0cm～約6.5cm、更に好適には約3.0cm～約5.5cm、そしてより一層好適には約4.0cm～約4.5cmである。

20

【0161】

本発明のチャンパーは、チャンパー内の湿度レベルをノミの生存に適切に維持するのに適切なプロットング手段を含有してもよい。適切な湿度レベルを維持するための方法は、以下に詳述される。本発明のチャンパーは、食物又は水を含有してもよいが、好適には湿気があり（すなわち、湿っているが、濡れてはいない）、食物を含有しない。

【0162】

本発明の唾液収集装置はインターフェースを含む。本発明のインターフェースは、実質的に混入物質を含まない唾液産生物を収集することができる手段を含む。このようなものとして、本発明のインターフェースは、ノミの口器により貫通可能であるが、ノミが摂餌を試みるときに分泌されるノミの唾液産生物とは別に、混入物質（例えば、血液及び糞便）を保持することができる。本発明のインターフェースは、唾液産生物を収集する手段、及び混入物質と収集される唾液産生物の間の障壁を作る手段を含む。

30

【0163】

本発明の収集手段は、インターフェースを通して摂餌を試みる保持されたノミにより沈積（すなわち、分泌）される唾液タンパク質の少なくとも一部を収集（すなわち、吸着）することができる任意の物質からなっていてよい。更には、本発明の収集手段は、インターフェースを通して摂餌を試みるノミにより沈積される唾液タンパク質の他の唾液成分を収集することができる。この収集手段は、唾液産生物をこの収集手段に結合できるだけでなく、適切な溶離液（すなわち、抽出剤）に暴露することにより収集手段から溶出（すなわち、抽出）することができるものである。このようなものとして、本発明の好適な収集手段物質は、唾液成分がこのような物質から容易に溶出するため、疎水性であって低い結合能を有する物質を含む。本発明の収集手段の物質はまた、ノミの口器により貫通できる必要がある。

40

【0164】

本発明の好適な収集手段は、ナイロン、ニトロセルロース、誘導体化CM、誘導体化ジエチルアミノエチル（DEAE）、紙、ポリスルホン、セルロースエステル、ポリテトラ

50

フルオロエチレン (P T F E) 及びポリフッ化ビニリデン (P V D F) 膜を含むが、これらに限定されない。特に好適なアニオン交換膜の収集手段物質は、D E - 8 1 クロマトグラフィ紙 (これは、ワットマン社 (W h a t m a n ,)、クリフトン (C l i f t o n)、ニュージャージー州から入手することができる) を含む。特に好適な収集手段物質は、P V D F を含む。好適な P V D F 収集手段物質は、デュラポア (D u r a p o r e) (登録商標) を含む。

【 0 1 6 5 】

本発明の収集手段の形は、この収集手段が取付けられるチャンバーの形により変化させることができる。収集手段の好適な形は、丸い形又は4つ以上の側面を有する箱様の形を含む (丸い形が、更に好適である) が、これらに限定されない。

10

【 0 1 6 6 】

本発明の収集手段の大きさも、この収集手段が取付けられるチャンバーの大きさにより変化させることができる。収集手段の大きさは、好適にはチャンバーの開放端よりも大きく、こうして収集手段がチャンバー中に移行するのを防止する。収集手段の大きさは、好適には直径約 2 . 2 c m ~ 約 6 . 5 c m、更に好適には約 3 . 2 c m ~ 約 5 . 7 c m、そして更に好適には約 4 . 2 c m ~ 約 4 . 7 c m である。

【 0 1 6 7 】

本発明の唾液収集装置は、実質的に混入物質を含まない外部寄生生物の唾液の収集を可能にする新規な障壁手段を提供する。本発明の障壁手段は、混入物質が収集手段に接触するのを実質的に防止する (すなわち、ノミの糞便や血液産物が収集手段を通り抜けるのを実質的に防止する) ことができるが、またノミの口器により貫通することができ、障壁手段の唾液の通過を可能にすることができる、任意の物質であってよい。好適には、本発明の障壁手段物質の厚さは、ミクロンの厚さである。本発明の好適な障壁手段物質は、非常に薄いプラスチック、テフロン、布、紙、パラフィン及び蠟物質を含むが、これらに限定されない。本発明の更に好適な障壁手段物質は、延伸したプラスチックを含み、非常に薄く (すなわち、機械及びノミ又は手により延伸できる限り薄く) 延伸した、サランラップ (S a r a n W r a p) (登録商標) 及び特にパラフィルム (P a r a f i l m) (登録商標) が更になお好適である。

20

【 0 1 6 8 】

本発明の障壁手段の大きさは、この障壁手段が取付けられるチャンバーの大きさにより変化させることができる。障壁手段の大きさは、好適には本発明のチャンバーの側面を延長してチャンバーに固定することができるように十分に大きい。障壁手段の大きさは、障壁手段が、例えば、人工摂餌システムに取付けられるチャンバーを含有する唾液収集装置の能力を妨害しないように十分に小さい。

30

【 0 1 6 9 】

本発明により、収集手段と障壁手段は、このような装置のハウジング内に保持されるノミが、障壁手段と収集手段の両方を貫通して、収集手段に唾液を沈積することができるように、唾液収集装置のチャンバーに機能的に接続される。本発明の収集手段は、好適には障壁手段によりチャンバーのある部位に除去可能に取付けられる。収集手段と障壁手段の好適な取付け部位は、ハウジングで連結するように設計されたチャンバーの部分である。収集手段と障壁手段の更に好適な取付け部位は、チャンバーの開放端である。

40

【 0 1 7 0 】

本発明の唾液収集装置はまた、プロットティング手段を含んでもよい。本発明のプロットティング手段は、装置内の湿度をノミの生存に適するように維持することができる、このようなものとして、装置にノミが保持されている期間液体を保持することができる。このようなものとして、プロットティング手段は、任意の適切な吸収剤物質である。好適なプロットティング手段は、天然及び合成スポンジ、発泡体、紙、布、及びアガロースを含む。更に好適なプロットティング手段物質は、スポンジ及び紙を含み、濾紙が更になお好適である。特に好適な実施態様において、1片以上のVWRプロットティングパッド (V W R B l o t t i n g P a d s) # 3 2 0 (V W R サイエントフィック社、デンバー、コロラド州

50

から利用可能)をプロットング手段としている。

【0171】

上述のように、本発明の唾液収集装置は、装置のハウジングとチャンバーの間の温度差を維持することができる。本発明の装置内の適切な温度差は、装置内に保持されるノミを刺激して装置のインターフェースを貫通させて収集手段に唾液を沈積させる温度差を含む。本発明のチャンバー内の好適な温度は、約20～約45の範囲であり、一方本発明のハウジング内の好適な温度は、約5～約35の範囲である。好適な実施態様において、チャンバー内の温度は、約35～約40の範囲であり、ハウジング内の温度は、約10～約30の範囲である。特に好適なチャンパー温度は、約35～約37の範囲であり；そして特に好適なハウジングチャンパー温度は、約20～約27である。

10

【0172】

外部寄生生物の生存は、湿度に影響されうる。このようなものとして、本発明の装置のハウジング内の湿度レベルは、その中に保持されている外部寄生生物の生存を維持するのに適切なレベルである。本発明の装置内の適切な相対湿度レベルは、装置内に入っている外部寄生生物により変化させることができる。本明細書で使用されるとき、相対湿度とは、沈殿が生じる大気中の水蒸気の最大量に比較した大気中の水蒸気の量を意味する。このように、相対湿度は、パーセント湿度として表され、ここで100%湿度は、大気中の水蒸気の飽和を表す。本発明のチャンパー内の好適な湿度レベルは、約50%～約100%の範囲であり、一方本発明のハウジング内の好適な湿度レベルは、約40%～約60%の範囲である。好適な実施態様において、チャンパー内の湿度レベルは、約50%～約94%の範囲であり、そしてハウジング内の湿度レベルは、約50%である。

20

【0173】

本発明の別の実施態様では、ノミを誘引するため色の対比を使用する。例えば、本発明の収集装置の少なくとも1つの表面は、ノミを誘引して装置のインターフェースを貫通させるのに十分に暗い色であってもよい。理論によって拘束されるわけではないが、ノミは、暗さから明るさを感じることができ、好適には暗い表面に向かって摂餌する傾向にあると考えられている。したがって本発明により、チャンパーはハウジングよりも暗くして、ノミをチャンパーとハウジングの間のインターフェースに誘引することができる。適切な暗い色は、黒から明褐色の範囲の色を含み、好適には黒である。

30

【0174】

本発明の収集装置の好適な実施態様を図4A及び4Bに図示する。唾液収集装置2はハウジング4とチャンパー6に分離できる。本発明の唾液収集装置2の断面図を図4Aに示す。図4A及び4Bに関して、ハウジング4は、第1部分8と第2部分10を有する開放端の円筒形である。ハウジング4の第2部分10は、外径12と内径14を有する。交換手段16は、ハウジング4の第1部分8の一方の末端に機能的に取付けられ、そして保持手段18は、第1部分8と、第2部分10の外径12及び内径14との間の、第1部分の反対側の末端で取付けられる。交換手段16及び保持手段18は、ノミが逃げるのを防止するように取付けられる。ハウジング4の第1部分8への交換手段16と保持手段18の取付け方法は、ゴムのり、にかわ、テープ、はんだ及びアラルダイトを含むが、これらに限定されない。好適な取付け方法は、ゴムのりである。

40

【0175】

唾液収集装置2のチャンパー6は、頂部末端20と底部末端22を有する開放端円筒形を有する。頂部末端20は、実施例に詳述されるような人工摂餌システムにチャンパー6を取付けることを可能にする適切な直径を有する。底部末端22は、滑り込み嵌合(slid ing fit)を提供するようにハウジング4にこの底部末端22を可逆的に取付けることができるような適切な直径を有する。底部末端22は、収集手段24に覆われている。収集手段24は、チャンパー6の底部末端22の内周よりも大きな直径を有し、これにより収集手段24がチャンパー6の内部空間26に移行するのを防止している。好適には、収集手段24の直径は、チャンパー6の底部末端22の外周よりは大きくない。収

50

集手段 2 4 は、分離可能な接続を提供するように底部末端 2 2 に接続することができ、これにより収集手段 2 4 から唾液産生物を回収するための、唾液収集装置 2 からの収集手段 2 4 の取り外しを楽にしている。

【0176】

チャンバー 6 の底部末端 2 2 に取付けられた収集手段 2 4 は、障壁手段 2 8 に覆われる。この障壁手段 2 8 は、ノミにより沈積される混入物質が収集手段 2 4 に接触するのを防止するシールが形成されるように、チャンバー 6 に機能的に接続される。障壁手段 2 8 は、分離可能な接続を提供するようにチャンバー 6 に接続することができる。好適には、障壁手段 2 8 は、パラフィルム（登録商標）のような延伸可能なプラスチック物質であり、これをチャンバー 6 の底部末端 2 2 に接触している収集手段 2 4 にわたって可能な限り薄く延伸され、そして更にチャンバー 6 の側壁 3 0 に沿って、チャンバー 6 の頂部末端 2 0 に向かって延伸される。障壁手段 2 8 は更に、ゴムシール 3 2 を使用してチャンバー 6 の側壁 3 0 に固定することができる。ゴムシール 3 2 は、チャンバー 6 の側壁 3 0 に接する障壁手段 2 8 の部分を分離可能に接続し、これにより、更にチャンバー 6 及びチャンバー 6 環境内のシールに収集手段 2 4 を固定する。

10

【0177】

プロットイング（吸収剤）物質は、チャンバー 6 の底部末端 2 2 の内部空間 2 6 に置いて、プロットイング手段 3 4 を形成することができる。このプロットイング手段 3 4 は、1 つ以上の別々のプロットイングパッド（例えば、数片のプロットイング物質）からなっていてよい。好適には、プロットイング手段 3 4 は、4 7 mm の高さのチャンバー 6 に入れられる場合約 2 . 0 mm 厚～約 1 5 . 0 mm 厚（乾燥時）であり、更に好適には 4 7 mm の高さのチャンバー 6 に入れられる場合約 2 . 2 mm 厚～約 1 2 . 5 mm 厚（乾燥時）であり、そして更に好適には 4 7 mm の高さのチャンバー 6 に入れられる場合約 2 . 4 5 mm 厚～約 1 0 . 0 mm 厚（乾燥時）である。特に好適な実施態様において、プロットイング手段 3 4 は、約 2 ～ 6 片の VWR プロットイングパッド # 3 2 0、好適には約 3 ～ 5 片の VWR プロットイングパッド # 3 2 0 からなっている。プロットイング手段 3 4 の直径は、チャンバー 6 の内部側壁 3 6 に接触するように選択される。プロットイング手段（3 4）は、好適にはチャンバー 6 に湿度を与えるために十分に前もって濡らされるが、プロットイング手段 3 4 から液が垂れるほどには濡らさない。プロットイング手段 3 4 はチャンバー 6 の頂部末端 2 0 に向かって収集手段 2 4 の側面に並置される。プロットイング手段 3 4 は、分離可能に収集手段 2 4 に直接接触させてもよい。

20

30

【0178】

チャンバー 6 はハウジング 4 から可逆的に分離可能である。チャンバー 6 は、滑り込み、スナップ留め又はねじ込みのような任意の可逆的に保証された方法でハウジング 4 に相互接続することができる。好適には、チャンバー 6 は、ハウジング 4 に滑り込ませてゴムバンドを用いて固定される。

【0179】

チャンバー 6 の相対的な高さは、ハウジング 4 に対して種々に変化させることができる。典型的には、チャンバー 6 の高さはハウジング 4 よりも大きい。好適には、チャンバー 6 の高さは約 1 . 0 cm～約 7 . 0 cm、更に好適には約 2 . 0 cm～約 6 . 0 cm、そして更に好適には、約 3 . 0 mm～約 5 . 0 mm の範囲である。ハウジング 4 び高さは、好適には約 1 . 0 mm～約 3 . 0 mm、更に好適には約 1 . 5 mm～約 2 . 5 cm、そして更に好適には約 1 . 8 cm～約 2 . 2 cm の範囲である。

40

【0180】

本発明の 1 つの実施態様は、本発明の装置を使用する外部寄生生物からの唾液産生物の収集方法である。このような方法は、混入物質を実質的に含まない、唾液タンパク質を含む外部寄生生物の唾液の単離を可能にするため、特に有利である。このようなものとして、本方法は、例えば外部寄生生物唾液タンパク質を性状解析するために、並びに診断及び治療用途のために外部寄生生物唾液タンパク質を単離するために使用することができる。

【0181】

50

本方法の1つの実施態様は、(a)装置のハウジング内に外部寄生生物を含む唾液収集装置内の収集手段に外部寄生生物唾液産生物を収集し；そして(b)溶液により収集手段から収集された外部寄生生物唾液産生物を抽出(すなわち、溶出)して抽出産物含有溶液を形成する工程を含む。このような抽出された溶液は、本発明の処方物として直接使用することができるか、あるいは本明細書に詳述されるような分画及び/又は精製の更なる工程により本発明の別の処方物を形成することができる。このような抽出された溶液の例は、FS-1、FS-2及びFS-3を含む。

【0182】

本発明により、外部寄生生物を含有する唾液収集装置は、チャンパーとハウジングの間に、装置内に保持されている外部寄生生物により沈積される唾液産生物の少なくとも一部を収集することができる収集手段と、混入物質が収集手段に接触するのを実質的に防止することができる障壁手段とよりなる、インターフェースを有する。装置内に入れられた外部寄生生物は、チャンパーとハウジングの間に温度差が存在するような条件下で維持される；すなわち、チャンパー内の高い温度がハウジング内に保持されている外部寄生生物を誘引して障壁手段と収集手段を貫通させ、そして収集手段に唾液産生物を沈積するように、この装置のチャンパーは、外部寄生生物を含有するハウジングの温度よりも高い温度を有する。

【0183】

1つの実施態様において、唾液産生物を収集する方法は、本発明の装置に収集手段を配置する前に本発明の収集手段を前もって濡らすことを含む。本発明に適した前もって濡らす溶液は、唾液産生物が抽出工程(すなわち、適切な溶媒に暴露されるとき)の間にも抽出することができるように、唾液産生物の吸着(すなわち、収集)を促進することができる。本発明の適切な前もって濡らす溶液は、外部寄生生物に対して非毒性で、生理的pHを有する任意の緩衝液を含む。適切な緩衝液の例は、リン酸緩衝化生理食塩水、水、リン酸緩衝液、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(トリス-EDTA緩衝化生理食塩水)、トリス緩衝液及びTAE緩衝液(トリス-酢酸-EDTA)を含む。好適な前もって濡らす溶液は、50U/mlペニシリン及び50µg/mlストレプトマイシンを含有する滅菌水を含む。

【0184】

唾液産生物を収集するために使用される装置がプロットティング手段を含む場合、そのプロットティング手段は、チャンパーにプロットティング手段を配置する前か後のいずれかに加湿する必要がある。好適な加湿溶液は、水、リン酸緩衝化生理食塩水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、HEPES緩衝液、TEA緩衝液及びTES緩衝液を含むが、これらに限定されない。更に好適な加湿溶液は、水並びに50U/mlペニシリン及び50µg/mlストレプトマイシンを含む。本発明により、プロットティング手段はチャンパー内の湿度を生成するために十分に加湿されるが、装置内に保持される外部寄生生物がそこから飲むことができるように液体が垂れるほどではない。好適な実施態様において、直径約4.0cmで約2.5mm厚のプロットティング手段は、約2.3ミリリットル(ml)の加湿溶液で加湿される。

【0185】

1つの実施態様において、前もって決められた数の外部寄生生物が、本発明の装置のハウジング中に導入される。ハウジング内に導入すべき外部寄生生物の数は、ハウジングの大きさにより変化させることができ、本発明の収集手段に唾液を沈積する外部寄生生物の能力を妨げない数でなければならない。

【0186】

本発明の好適な実施態様において、ノミが本発明の装置に加えられる。ハウジングに導入されるノミの適切で好適な数は前に開示されている。特に、新たにサナギ状態から孵化したノミが使用される。このようなノミは、Wadeら, pp 186-190, 1988, J. Med Entomol., vol 25に記載されたように出現させることができ

10

20

30

40

50

る。好適には、このようなノミは血液の餌を未だ摂っていないものである。ノミを水槽に入れて真空下でハウジング内に吸引することにより、装置内にノミを入れることができる。動物の毛、及び乾燥組織のような、ノミの維持に適した追加の選択可能な成分を容器に添加することができる。

【0187】

好適な実施態様において、装置のハウジングにノミの入った本発明の少なくとも1つの装置を、本明細書に開示されるような人工摂餌システムに取付ける。この装置は、ノミが収集手段を貫通しながら唾液を放出し続ける限り、この摂餌システムに取付けられたままでよい。好適には、ノミは、約12時間～約120時間、更に好適には約24時間～約96時間、そして更に好適には約72時間（ノミは基本的に、およそこの時間で唾液を分泌するのを停止するため）、この摂餌システムに取付けられた装置内で維持される。本発明の方法により、バイオラッド・ブラッドフォード測定法（Bio-Rad Bradford assay）（バイオラッド（Bio-Rad）、ハーキュリーズ（Hercules）、カリフォルニア州から入手可能）を使用して測定するとき、好適には少なくとも約80マイクログラム（ μg ）、更に好適には少なくとも約90 μg 、そして更に好適には少なくとも約200 μg のノミの唾液タンパク質を、約10⁶匹のノミ-時間から収集することができる。

10

【0188】

本発明により、外部寄生生物唾液産生物は、好適には溶出した産物の機能的活性が維持される形で、本発明の収集手段から唾液産生物を抽出することができる溶媒を使用して抽出することができる。ノミの唾液タンパク質の機能的活性が、例えば維持されないならば、当業者に知られている方法を使用して機能性を回復するためにタンパク質を再生することは本発明の範囲内である。適切な抽出溶媒は、リン酸緩衝化生理食塩水、塩化ナトリウムを含有するリン酸緩衝化生理食塩水、アセトニトリル中のTFA、カオトロピック剤、界面活性剤、有機物、塩類又はそれらの組合せを含むが、これらに限定されない。好適な抽出溶媒は、リン酸緩衝化生理食塩水、塩化ナトリウムを含有するリン酸緩衝化生理食塩水、アセトニトリル及びアセトニトリル中のTFAを含む。更に好適な抽出溶媒は、リン酸緩衝化生理食塩水中の1M・NaCl、50%アセトニトリル中の0.1%・TFA、12.8%アセトニトリル及び50%アセトニトリルを含む。タンパク質及び他の産物を収集手段から溶出するための適切な抽出時間は、実施例に詳述される。

20

30

【0189】

本発明の収集手段から抽出された唾液タンパク質の更なる精製は、抽出された産物を含有する溶液を分画して分離したピークのフラクションを得て、残りのフラクションを実質的に含まない少なくとも1つのピークフラクションを回収して外部寄生生物唾液タンパク質の処方物を得ることにより行うことができる。好適な実施態様において、本発明の抽出された唾液産生物に含まれるタンパク質は、HPLC精製により抽出してピークフラクションを得ることにより更に分割される。特に好適な実施態様において、本発明の抽出された唾液タンパク質は、HPLCにより更に分割して図2に示されるピークフラクションを得る。このようなタンパク質の抽出と分割に関する詳細は、実施例に示される。

【0190】

本発明により、本発明の少なくとも1つの外部寄生生物唾液産生物又はそのミメトープ（mimetope）を含む処方物は、アレルギー性皮膚炎に感受性の又は同皮膚炎の動物を同定するために使用することができる。

40

【0191】

本発明により、「ミメトープ（mimetope）」とは、本発明の単離された外部寄生生物唾液産生物のその機能（例えば、抗凝血、抗補体、血管拡張、プロテアーゼ、酸ホスファターゼ、あるいはアレルギー性皮膚炎に感受性の又は同皮膚炎の動物の過敏症を検出及び/又は治療する機能）を果たす能力を模倣することができる任意の化合物を意味する。ミメトープは、分解に対する感受性が低下しているが、目的の活性はなお保持しているように修飾されたペプチドであってもよい。ミメトープの他の例は、炭水化物に基づく

50

化合物、脂質に基づく化合物、核酸に基づく化合物、天然有機化合物、合成で誘導した有機化合物、抗イディオタイプ抗体及び/又は触媒的抗体、あるいはその断片を含むが、これらに限定されない。本発明のミメトープはまた、アレルゲン及び/又は抗原活性を有する外部寄生生物唾液産生物の非タンパク質部分を含んでもよい(例えば、外部寄生生物唾液タンパク質に結合した炭水化物部分)。ミメトープは、例えば外部寄生生物を摂餌させる能力を代替できる化合物、あるいは外部寄生生物の噛み傷から生じるアレルギー性皮膚炎を検出及び/又は治療することができる化合物に関する、合成化合物のライブラリーのスクリーニングにより得ることができる。ミメトープはまた、例えば、合理的薬剤設計により得ることができる。合理的薬剤設計において、本発明の化合物の三次元構造を、例えば、核磁気共鳴(NMR)又はX線結晶解析により解析することができる。次にこの三次元構造を使用して、例えばコンピュータモデル作成により、可能性あるミメトープの構造を予測することができる。次に、例えば化学合成、組換えDNA法により、又は天然資源(例えば、植物、動物、細菌及び真菌)からミメトープを単離することにより、予測されたミメトープ構造を生成することができる。

10

【0192】

本発明の1つの実施態様は、ある動物が外部寄生生物唾液産生物に対して過敏症かどうかを検出することができる *in vivo* 試験である。本発明の *in vivo* 試験は、最初にある動物が外部寄生生物唾液産生物に対して過敏症であるかどうかを決定し、次にある動物が特定の外部寄生生物唾液成分、特に外部寄生生物唾液タンパク質に過敏症であるかどうかを決定するために使用することができる。本発明の *in vivo* 過敏症試験は、アレルギー性皮膚炎に感受性の又は同皮膚炎の動物を同定するために特に有用である。本発明の *in vivo* 過敏症試験は、FADに感受性の又はFADの動物を同定するために更に有用である。本発明の適切な *in vivo* 過敏症試験は、少なくとも1つの外部寄生生物唾液産生物又はそのミメトープを含有する有効量の処方物を投与(例えば、皮内注入又は皮膚表面のひっかき)することからなる皮膚試験であってよいが、これに限定されない。本発明の皮膚試験を実施するための方法は、当業者には既知であり、本明細書で簡単に開示される。

20

【0193】

In vivo 皮膚試験に使用するために適した処方物は、外部寄生生物唾液成分(すなわち、本発明の収集手段に収集され吸収されたまま残っている唾液産生物、外部寄生生物唾液抽出物、及び1つ以上の単離された外部寄生生物唾液タンパク質)を含む。好適な処方物は、抽出物及び1つ以上の単離されたタンパク質を含む。

30

【0194】

本発明の皮膚試験に使用するための外部寄生生物唾液産生物の適切な量は、試験に使用される産物のアレルゲン性、及び産物が送達される部位により、広い範囲で変化させることができる。本発明の皮膚試験に使用するための外部寄生生物唾液産生物の適切な量は、その産物に対するアレルギー反応から生じる検出可能な膨疹又は硬化(*induration*)(硬度)のような、反応を形成することができる量を含む。本発明の皮膚試験に使用するための外部寄生生物唾液抽出物又はタンパク質の好適な量は、約1ナノグラム(*ng*)~約500マイクログラム(μg)、更に好適には約5*ng*~約300 μg 、そして更に好適には約10*ng*~約50 μg の外部寄生生物唾液抽出物又はタンパク質の範囲である。このような量が、投与される抽出物及び/又はタンパク質のアレルゲン性により変化することは、当業者には理解されるところである。

40

【0195】

本発明により、本発明の外部寄生生物唾液産生物は、免疫増強剤(例えば、以下に詳細に定義される本発明の担体又はアジュバント)と一緒に合わせることができる。しかし、本発明の新規な態様は、本発明の外部寄生生物唾液産生物が、免疫増強剤の非存在下で過敏性応答を誘導することができることである。

【0196】

本発明の皮膚試験は、更に動物への対照溶液の投与を含む。対照溶液は、陰性対照溶液

50

及び/又は陽性対照溶液を含んでよい。本発明の陽性対照溶液は、動物に投与されると過敏性応答を誘導することが知られている有効量の少なくとも1つの化合物を含有する。陽性対照溶液として使用するための好適な化合物は、ヒスタミンを含むが、これに限定されない。本発明の陰性対照溶液は、動物に投与されるとき過敏性応答を誘導しないことが知られている溶液を含んでよい。このようなものとして、陰性対照溶液は、本質的に過敏性応答を誘導できない化合物を含む溶液、又は単に処方物を調製するために使用される生理食塩水のような緩衝液であってよい。好適な陰性対照溶液の例は、フェノール化リン酸緩衝化生理食塩水(グリアラボラトリーズ社(Greer Laboratories)、ルノーワール(Lenoir)、ノースカロライナ州)である。

【0197】

本発明の1つ以上の処方物に対する動物の過敏症は、動物への1つ以上の実験試料及び対照試料の投与から生じる反応(例えば、膨疹の大きさ、硬化又は硬度;当業者に知られている方法を使用して)を測定し、そして1つ以上の対照溶液の投与から生じる反応と実験試料に対する反応を比較することにより、評価することができる。皮内注入の好適な装置は、個別のシリンジを含む。ひっかきのための好適な装置は、同時に多くの試料を投与することができる装置を含む。動物の過敏症は、本発明の処方物の投与から生じる反応が、陰性対照の投与から生じる反応よりも大きいどうかを測定し、かつ/又は本処方物の投与から生じる反応が、陽性対照溶液の投与から生じる反応と少なくともほぼ同じ大きさであるかどうかを測定することにより、評価することができる。このようなものとして、もし実験試料が、動物への陽性対照試料の投与により生成する膨疹の大きさと同等かそれ以上の反応を起こすならば、その動物は実験試料に対して過敏症である。逆に、もし実験試料が、動物への陰性対照試料の投与により生成する反応と同様な反応を起こすならば、その動物は実験試料に対して過敏症ではない。

【0198】

動物の過敏症の評価のための好適な膨疹の大きさは、直径が約16mm~約8mm、更に好適には約15mm~約9mm、そして更に好適には約14mm~約10mmの範囲である。

【0199】

好適には、動物が、本発明の処方物に対する即時型過敏性応答を示すことができるか又はできないかは、試料の投与の約2分~約30分後、更に好適には試料の投与の約10分~約25分後、そして更に好適には試料の投与の約15分後に膨疹の大きさを測定することにより決定される。

【0200】

好適には、動物が、本発明の処方物に対する遅延型過敏性応答を示すことができるか又はできないかは、試料の投与の約18時間~約30時間後、更に好適には試料の投与の約20時間~約28時間後、そして更に好適には試料の投与の約24時間後に硬化及び/又は紅斑を測定することにより決定される。遅延型過敏性応答はまた、当業者には既知の方法を使用して直前に規定された時間投与部位の細胞浸潤の程度を測定することによるなどの他の方法を使用して測定することができる。

【0201】

好適な実施態様において、本発明の皮膚試験は、動物の所定の部位に、ノミの唾液抽出物(すなわち、本発明の収集手段から抽出されたノミの唾液産生物)又は少なくとも1つの本発明のノミの唾液タンパク質を含む有効量の処方物を皮内注入して、同じ動物の異なる部位に有効量の対照溶液を皮内注入することからなる。好適には多くの処方物の同時評価を可能にする、多くの部位に同時に複数の試料を送達することができる装置を使用することは、当該分野の技術の範囲内である。1つの好適な処方物は、本発明により収集されたノミの唾液産生物からなる。同じく好適な処方物は、組換えにより産生された1つ以上のノミの唾液タンパク質を含む処方物である。

【0202】

本発明の皮膚試験で使用するための適切なノミの唾液産生物は、FS-1、FS-2、

10

20

30

40

50

及び/又はFS-3、並びにFS-1、FS-2、及び/又はFS-3から単離することができる少なくとも1つのノミの唾液産生物の少なくとも一部を含む。皮膚試験で使用するための好適なノミの唾液産生物は、FS-1、FS-2、FS-3、及び/又はfspA、fspB、fspC1、fspC2、fspD1、fspD2、fspE、fspF、fspG1、fspG2、fspG3、fspH、fspI、fspJ1、fspJ2、fspK、fspL1、fspL2、fspM1、fspM2、fspN1、fspN2及びfspN3の1つ以上のタンパク質、又はその相同体の少なくとも一部を含む。皮膚試験で使用するための更に好適なノミの唾液産生物は、FS-1、FS-2、FS-3、及び/又はfspE、fspF、fspG1、fspG2、fspG3、fspH、fspI、fspJ1、fspJ2、fspK、fspL1、fspL2、fspM1、fspM2、fspN1、fspN2及びfspN3の1つ以上のタンパク質の少なくとも一部を含む。そして更に好適な皮膚試験で使用するためのノミの唾液産生物は、FS-1、FS-2、FS-3、及び/又はfspG1、fspG2、fspG3、fspH、fspM1、fspM2、fspN1、fspN2及びfspN3の1つ以上のタンパク質の少なくとも一部を含む。このような処方物は、イヌにFADを誘導することができるものとして実施例の項に示される。好適な陽性対照試料は、ヒスタミンからなる試料であってよい。好適な陰性対照試料は、希釈剤からなる試料であってよい。

10

【0203】

本発明の皮膚試験を使用する外部寄生生物唾液タンパク質に対する過敏症に関して試験するために適切で好適な動物は、本明細書に開示される。本発明の皮膚試験で試験するのに特に好適な動物は、イヌ、ネコ及びウマを含み、イヌ及びネコが更に好適である。

20

【0204】

本発明の別の実施態様は、免疫複合体が生成し検出できるように、抗体を含有することが推定される溶液を、外部寄生生物唾液産生物を含有する溶液と接触させることにより、1つ以上の本発明の外部寄生生物唾液産生物に結合することができる抗体の存在を検出することができる *in vitro* の免疫吸収剤試験である。このように、本発明の *in vitro* 免疫吸収剤試験は、ある動物が以前に外部寄生生物唾液抗原に暴露されたことがあり、そのため外部寄生生物唾液抗原への更なる暴露に対して過敏症であるかかもしれないことを証明することにより、アレルギー性皮膚炎に感受性であるか又は同皮膚炎の動物を同定するのに、特に有用である。

30

【0205】

本発明により、本発明の *in vitro* 過敏症試験は、(a)本発明の処方物と動物からの体液とを、この処方物と(もし存在すれば)体液中の抗体との間の免疫複合体の形成に十分な条件下で接触させ;そして(b)形成された免疫複合体の量を測定する(ここで、免疫複合体の形成は、この動物がアレルギー性皮膚炎に感受性であるか又は同皮膚炎であることを示す)ことからなる免疫吸収剤試験であってよいが、これに限定されない。この免疫吸収剤試験は、体液中のIgE抗体の検出(これにより動物の即時型過敏症を示す)に特に有用である。形成された免疫複合体の量の測定は、検出法により分離の工程を含んでもよい。免疫吸収剤測定法は、種々のプロトコールであってよく、そして当業者はこれを組み上げることができる。

40

【0206】

本発明の好適な免疫吸収剤試験は、固体基質の1部分以上を1つ以上の本発明の外部寄生生物唾液産生物又はそのミメトープでコーティングし、そしてその(又は別の)固体基質の他の1部分以上を適切な量の本発明の陽性及び/又は陰性対照溶液でコーティングする第1の工程よりなる。本発明の好適な固体基質は、ELISAプレート、ディップスティック、放射免疫測定法プレート、アガロースビーズ、プラスチックビーズ、免疫プロット膜及び紙を含むが、これらに限定されない;更に好適な固体基質は、ELISAプレート、ディップスティック又は放射免疫測定法プレートを含み、ELISAプレートとディップスティックが更になお好適である。本明細書で使用されるとき、ディップスティックとは抗体が結合できる表面を有する任意の固体物質を意味し、このような固体物質は試験

50

管に挿入できるスティック様の形を有する。本発明の *in vitro* 過敏症試験で使用するために適切で好適なノミの唾液産生物は、本発明の皮膚試験について開示されたものと同じである。

【0207】

本発明の好適な *in vitro* 過敏症試験の第2の工程は、コーティングされた基質を、アレルギー性皮膚炎に感受性の動物からの血清、血漿又は全血のような体液に、外部寄生生物唾液産生物に結合することができる体液中に含有される抗体が、基質に結合したそのような産物に結合して免疫複合体を形成できるように、接触させることよりなる。次に過剰の体液及び抗体を基質から洗いだす。体液中の IgE 抗体が測定される好適な実施態様において、体液は、体液中に存在する少なくとも幾つかの他のアイソタイプのイムノグロブリン及び/又はアルブミンのような他のタンパク質を除去するために前処理してもよい。そのような除去は、体液をプロテインGのような物質と接触させてIgG抗体を除去すること、及び/又は体液を、例えばコンカナバリンA (Con-A) に暴露することにより体液の他の成分からIgE抗体を親和性精製することを含むが、これらに限定されない。

10

【0208】

本発明の好適な *in vitro* 過敏症試験の第3の工程は、基質に結合した免疫複合体を、外部寄生生物に対してアレルギー性の動物により生成されるアレルギー関連抗体の重鎖に結合することができる二次抗体又は他の化合物のような、免疫複合体に結合することができる化合物と、その化合物が免疫複合体に結合できるように接触させることからなる。好適な結合性化合物は、IgE抗体の重鎖に結合することができる二次抗体を含むが、これに限定されない。試験される好適な動物は本明細書に開示される。免疫複合体に結合することができる化合物は、通常体液からの抗体に結合した化合物の量が測定できる標識を付けられている。このような標識は、放射活性標識、基質との接触により着色反応を起こすことのできる酵素、蛍光標識、化学発光標識、発色標識又はもう1つの化合物により結合することの可能な化合物を含むが、これらに限定されない。好適な標識は、フルオレセイン、放射性同位体、アルカリホスファターゼ、ビオチン、アビジン、又はペルオキシダーゼを含むが、これらに限定されない。

20

【0209】

本発明の好適な *in vitro* 過敏症試験の第4の工程は、当業者に既知の方法を使用する、固体基質に結合した検出可能な標識の量を測定することよりなる。基質に結合した体液からの抗体の量を、1層以上の二次抗体又は他の結合性化合物を使用して測定できることは、本発明の範囲内である。例えば、未標識の二次抗体が血清抗体に結合することができ、次にこの未標識二次抗体を標識三次抗体により結合させることができる。

30

【0210】

過敏症の動物は、体液の試料を使用した免疫複合体形成のレベルを、対照試料を使用した免疫複合体形成のレベルと比較することにより同定される。免疫複合体とは、抗体とそのリガンド(すなわち、抗原)とからなる複合体を意味する。このようなものとして、免疫複合体は陽性対照試料を使用して形成し、陰性対照試料では形成しない。このようなものとして、体液試料が、陽性対照試料を使用した免疫複合体の形成と同等かそれ以上の免疫複合体形成を引き起こせば、その体液をとった動物は、基質に結合した外部寄生生物唾液産生物に過敏症である。逆に、体液試料が、陰性対照試料を使用した免疫複合体形成と同程度の免疫複合体形成を引き起こせば、その体液をとった動物は、基質に結合した外部寄生生物唾液産生物に過敏症ではない。

40

【0211】

本発明の1つの実施態様は、アレルギー性皮膚炎に感受性の又は同皮膚炎の動物の同定に有用なキットである。本明細書で使用されるとき、疑わしい動物とは試験される動物である。本発明のキットは、本発明の処方物、及び動物がアレルギー性皮膚炎に感受性又は同皮膚炎であるかどうかを決定するための手段(ここで、処方物はアレルギー性皮膚炎に感受性の又は同皮膚炎の動物を同定するために使用される)よりなる。動物が、アレルギー

50

一性皮膚炎に感受性又は同皮膚炎であるかどうかを決定するための手段は、上に詳述された本発明の *in vivo* 又は *in vitro* 過敏症試験を含む。本発明のキットは、更に本明細書に開示されたような少なくとも1つの対照溶液を含む。

【0212】

本発明の好適なキットは、免疫測定法を実施するために有用な要素からなる。本発明のキットは、1つ以上の実験試料（すなわち、本発明の処方物）及び少なくとも1つの前もって包装されたディップスティックに結合した1つ以上の対照試料、並びに試験動物の体液に含有される抗体と、ディップスティックに結合したタンパク質の間の免疫複合体形成を検出するための必要な手段（例えば、上に詳述されるような、標識二次抗体又は他の結合性化合物、並びにこのような標識を分解するために必要な任意の溶液）を含んでよい。

10

【0213】

本発明の代替となる好適なキットは、皮膚試験を実施するために有用な要素よりなる。本発明のキットは、1つ以上の実験試料及び/又は1つ以上の対照試料を含有する、少なくとも1つの前もって包装されたシリンジと針の装置からなっていてよい。

【0214】

2つ以上の異なる *in vivo* 及び/又は *in vitro* 試験を診断目的に組合せて使用することができることは、本発明の範囲内である。例えば、外部寄生生物唾液アレルギーに対する動物の即時型過敏症は、動物の体液中の外部寄生生物唾液アレルギーに特異的なIgE抗体を検出することができる *in vitro* 免疫吸収剤試験を使用して試験することができる。外部寄生生物唾液アレルギーに対して遅延型過敏症を示す多くの動物はまた、アレルギーに対する即時型過敏症をも示すが、アレルギーに対する遅延型過敏症を示す少数の動物は、アレルギーに対する即時型過敏症は示さない。このような場合には、IgE特異的 *in vitro* 試験からの陰性結果後、本発明の *in vivo* 試験を使用して外部寄生生物唾液アレルギーに対する動物の遅延型過敏症を試験することができる。

20

【0215】

本発明の別の態様は、アレルギー性皮膚炎に感受性の又は同皮膚炎の動物を、本発明の処方物で治療することを含む。本発明による、治療という用語は、外部寄生生物の噛み傷に対する動物による過敏性応答の調節を意味しうる。調節は、例えば、動物の過敏性応答に参与する細胞の免疫調節、あるいは、例えば唾液酵素の抗凝固活性を阻害して、そして動物の皮膚に貫通して摂餌する節足動物の能力を障害することによる、動物にアレルギーを導入する外部寄生生物の能力の改変を含む。免疫調節は、典型的には免疫応答に参与する分子（例えば、抗体、抗原、腫瘍組織適合分子（MHC）及びMHC分子と同時反応性の分子）の活性を調節することを含む。特に、免疫調節は、過敏性応答に参与する細胞の炎症性応答、免疫抑制、及び免疫寛容を引き起こす抗原：抗体相互作用の調節を意味する。免疫抑制とは、例えば、免疫応答に参与する特定の細胞を殺すことにより免疫応答を阻害することを意味する。免疫寛容とは、免疫応答に参与する特定の細胞をアネルギー化する（すなわち、抗原に対するT細胞の反応性を減少させる）ことにより免疫応答を阻害することを意味する。動物を治療するのに適切で好適な外部寄生生物は、本明細書に開示される。特に好適な本発明の処方物は、FADを治療するために使用される。

30

40

【0216】

本発明の1つの実施態様は、有効に動物に投与されるとき、外部寄生生物からの噛み傷により伝達されるアレルギー性成分に次に暴露されるとき動物による過敏性応答を遮断するため（すなわち、阻害、低下又は実質的に防止するため）の、動物の免疫応答を免疫調節する（すなわち、動物を免疫調節する）ために有用な治療用組成物である。このような治療用組成物は、外部寄生生物唾液産生物に過敏症であることが知られている動物及び外部寄生生物唾液産生物に対する過敏性応答に感受性の動物を免疫調節するために有用である。

50

【0217】

本発明の1つの実施態様は、本発明の外部寄生生物唾液産生物に対する免疫応答を阻害することができる脱感作性化合物を含む治療用組成物である。このような脱感作性化合物は、ブロッキング化合物、寛容原及び/又はサプレッサー化合物を含む。ブロッキング化合物は、炎症性応答を引き起こしうる抗原：抗体相互作用を調節することができる化合物からなり、寛容原は、動物を免疫寛容化することができる化合物であり、そしてサプレッサー化合物は、動物を免疫抑制することができる。本発明の脱感作性化合物は、可溶性であるか、又は膜に結合していてもよい。膜に結合した脱感作性化合物は、細胞、リポソーム、平面膜又はミセルを含む生体膜に結合していてもよい。本発明の可溶性脱感作性化合物は、(1)マスト細胞のIgE：抗原媒介性脱顆粒化をブロックすることによりI型過敏症反応を阻害し；(2)細胞の補体分解を引き起こすIgG：抗原複合体形成をブロックすることによりIII型過敏症反応を阻害し；そして(3)マクロファージによるサイトカイン分泌のヘルパーT細胞刺激をブロックすることによりIV型過敏症反応を阻害するために有用である。本発明の膜に結合した脱感作性化合物は、(1)細胞の補体分解を引き起こす細胞の表面上のIgG：抗原複合体形成をブロックすることによりII型過敏症反応を阻害し；(2)免疫細胞内のIgGが調節するシグナル伝達をブロックすることによりII型過敏症反応を阻害し；そして(3)抗原提示細胞を細胞毒性T細胞が殺すのをブロックすることによりIV型過敏症反応を阻害するために有用である。

10

【0218】

本発明の脱感作性化合物はまた、脱感作性化合物に、外部寄生生物唾液産生物に対する過敏性応答に関与する特異的な細胞を標的とさせることの可能なリガンド分子に共有結合することができる。脱感作性化合物を結合させる適切なリガンドは、例えば、イムノグロブリン分子、サイトカイン、レクチン、異種アレルゲン、CD8分子又は主要組織適合分子(例えば、MHCクラスI又はMHCクラスII分子)の少なくとも一部を含む。脱感作性化合物に結合させるのに好適なイムノグロブリン分子の好適な部分は、免疫細胞特異的な表面分子に結合することができる可変領域、及び免疫細胞のFc受容体に結合することができる定常領域(特にIgE定常領域)を含む。好適なCD8分子は、少なくともCD8の鎖の細胞外機能性ドメインを含む。免疫細胞とは、免疫応答に関与する細胞、特にMHCクラスI又はMHCクラスII分子を有する細胞を意味する。好適な免疫細胞は、抗原提示細胞、T細胞及びB細胞を含む。

20

30

【0219】

1つの実施態様において、本発明の治療用組成物は、本発明の外部寄生生物唾液産生物、又はそのミメトープを含む。好適な治療用組成物は、外部寄生生物唾液抽出物又は少なくとも1つの本発明の外部寄生生物唾液産生物(好適にはタンパク質)若しくはそのミメトープからなる処方物を含む。

【0220】

ノミのアレルギー性皮膚炎を治療するための適切な本発明の治療用組成物は、ノミの唾液抽出物、及び少なくとも1つのノミの唾液産生物(好適にはタンパク質)又はそのミメトープを含む他の処方物を含む。好適な治療用組成物は、FS-1、FS-2及び/又はFS-3、並びにFS-1、FS-2及び/又はFS-3から単離することができる少なくとも1つのノミの唾液産生物の少なくとも一部を含む。このようなものとして、治療用組成物としての使用に好適な処方物は、FS-1、FS-2、FS-3、及び/又はfspA、fspB、fspC1、fspC2、fspD1、fspD2、fspE、fspF、fspG1、fspG2、fspG3、fspH、fspI、fspJ1、fspJ2、fspK、fspL1、fspL2、fspM1、fspM2、fspN1、fspN2及びfspN3又はその相同体の1つ以上のタンパク質の少なくとも一部を含む。治療用組成物としての使用に好適なノミの唾液抽出物は、FS-1、FS-2、FS-3、及び/又はfspE、fspF、fspG1、fspG2、fspG3、fspH、fspI、fspJ1、fspJ2、fspK、fspL1、fspL2、fspM1、fspM2、fspN1、fspN2及びfspN3の1つ以上のタンパク質の少なくとも一

40

50

部を含む。治療用組成物としての使用に更になお好適なノミの唾液抽出物は、FS-1、FS-2、及び/又はfspG1、fspG2、fspG3、fspH、fspM1、fspM2、fspN1、fspN2及びfspN3の1つ以上のタンパク質の少なくとも一部を含む。

【0221】

別の実施態様において、治療用組成物は、適切な賦形剤と一緒にした本発明の外部寄生生物産物を含んでよい。本発明の治療用組成物は、治療される動物が許容しうる賦形剤中に処方することができる。好適な賦形剤は、その細胞が刺激されて免疫応答を開始又は増強することができるように、動物のアレルギー応答に関与する細胞が結合できる形に本発明の産物を維持することができる。このような賦形剤の例は、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロス溶液、ハックス液、及び他の生理学的平衡塩類水溶液を含む。不揮発性油、ゴマ油、オレイン酸エチル、又はトリグリセリドのような非水性担体も使用することができる。他の有用な処方物は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、又はデキストランのような粘性増強剤を含有する懸濁液を含む。賦形剤はまた、等張性及び化学安定性を増強する物質のような、少量の添加物を含有してもよい。緩衝液の例は、リン酸緩衝液、重炭酸緩衝液及びトリス緩衝液を含み、一方保存料の例は、チメロサル、*m*-又は*o*-クレゾール、ホルマリン及びベンジルアルコールを含む。標準的な処方物は、注入可能な液体であるか、又は適切な液体にとって注入用の懸濁液若しくは溶液とすることができる固体であってよい。このため、非液体処方物において、賦形剤は、投与前に滅菌水又は生理食塩水を添加することができる、デキストロス、ヒト血清アルブミン、保存料などであってよい。

10

20

【0222】

別の実施態様において、本発明の治療用組成物はまた、担体又はアジュバントを含んでもよい（しかし、本発明の唾液産物の利点は、投与のためにアジュバント及び/又は担体を必要としないことであることは理解されたい）。アジュバントは典型的には、一般に特異的な抗原に対する動物の免疫応答を増強する物質である。適切なアジュバントは、フロイントアジュバント；他の細菌細胞壁成分；アルミニウムに基づく塩類；カルシウムに基づく塩類；シリカ；ポリヌクレオチド；トキシイド；血清タンパク質；ウイルスコートタンパク質；他の細菌由来の調製物；ガンマインターフェロン；ハンターのタイターマックスアジュバンド（Hunter's Titermax adjuvant）（バックセル（Vaxcel）（登録商標）社、ノークロス（Norcross）、ジョージア州）のようなブロックコポリマーアジュバント；リビ（Ribi）アジュバント（リビ・イムノケム・リサーチ社（Ribi ImmunoChem Research, Inc.）、ハミルトン、モンタナ州から入手可能）；及びキルA（Quil-A）（スーパーフォス・バイオセクター社（Superfos Biosector A/S）、デンマークから入手可能）のようなサポニンとその誘導体を含むが、これらに限定されない。

30

【0223】

担体は典型的には、治療される動物中の治療用組成物の半減期を増大させる化合物である。適切な担体は、ポリマー性放出制御処方物、生物分解性インプラント、リポソーム、細菌、ウイルス、油、エステル、及びグリコールを含むが、これらに限定されない。

40

【0224】

本発明の1つの実施態様は、本発明の治療用組成物を動物の血流中に徐々に放出することができる放出制御処方物である。適切な放出制御処方物は、生体適合性（生物分解性を含む）ポリマー、他のポリマー性マトリックス、カプセル、マイクロカプセル、微粒子、ポーラス調剤、浸透圧ポンプ、拡散装置、リポソーム、リポスフェア（liposphere）、及び経皮送達システムを含むが、これらに限定されない。本発明の他の放出制御処方物は、動物に投与されると、*in situ*で固体又はゲルを形成する液体を含む。

【0225】

本発明はまた、組換えウイルス粒子の治療用組成物も含む。このような組成物は、ウイ

50

ルスコートにパッケージされて投与後動物中で発現しうる本発明の組換え分子を含む。好適にはこの組換え分子は、パッケージングが欠損している。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、及びレトロウイルスに基づくウイルス粒子を含むが、これらに限定されない、多くの組換えウイルス粒子を使用することができる。好適な組換え粒子ウイルスは、アルファウイルス（例えばシンドビスウイルス）、ヘルペスウイルス及びポックスウイルスに基づくウイルスである。組換えウイルス粒子ワクチンを産生し使用する方法は、1993年2月8日出願の「組換えウイルス粒子ワクチン（Recombinant Virus Particle Vaccines）」という発明の名称の米国特許出願08/015/414号に開示されており、これはその全体が引用により本発明に組み込まれる。

10

【0226】

動物に投与されると、本発明の組換えウイルス粒子治療用組成物は、免疫化された動物の細胞に感染し、外部寄生生物の噛み傷により引き起こされるアレルギー性皮膚炎から動物を保護することができる保護タンパク質又はRNA核酸分子の産生を指令する。例えば、本発明の1つ以上の外部寄生生物唾液タンパク質をコードする核酸分子を含む組換えウイルス粒子は、外部寄生生物唾液アレルゲンに対する動物の寛容化を引き起こすプロトコールにより投与される。

【0227】

本発明の治療用組成物は、タンパク質分解を起こさない従来法（例えば、濾過）により滅菌するか、かつ/又は凍結乾燥することができる。

20

本発明の治療用組成物は、本明細書に記載されるような外部寄生生物の侵襲に感受性の任意の動物に投与することができる。本発明の治療用組成物を有効に投与するための許容しうるプロトコールは、個々の投薬量のサイズ、投薬回数、投薬の頻度、及び投与の様式により変化させることができる。このようなプロトコールの決定は、当業者であれば達成することができる。有効用量とは、外部寄生生物唾液アレルゲンに対する過敏症に対して動物を治療することができる用量を意味する。有効用量は、例えば、使用される治療用組成物、組成物が由来する節足動物、及び投与を受ける動物の大きさと型により変化させることができる。外部寄生生物唾液アレルゲンに対して動物を免疫調節するための有効用量は、外部寄生生物唾液アレルゲンに対して動物の過敏性応答を軽減することができる時間にわたって投与される用量を含む。例えば、初回寛容化用量は、過敏症動物に投与されると最小限の過敏性応答を引き起こす本発明の治療用組成物の量であってよい。2回目の寛容化用量は、初回用量よりも多量の同じ治療用組成物であってよい。有効寛容化用量は、動物が外部寄生生物の噛み傷に対して過敏性応答をしないように動物を寛容化するのに必要な、上昇する濃度の治療用組成物であってよい。動物を脱感作するための有効用量は、動物が外部寄生生物の噛み傷に対して過敏性応答をするのをブロックするために十分な、ある濃度の本発明の治療用組成物であってよい。有効脱感作用量は、過敏症動物に投与されると、最小限の過敏性応答を引き起こす治療用組成物の濃度を有する繰り返し用量を含んでよい。

30

【0228】

適切な単回用量は、適切な時間で1回以上投与されるとき、外部寄生生物唾液アレルゲンに対する過敏症に対して動物を治療することができる用量である。例えば、外部寄生生物唾液産生物、又はミメトープ治療用組成物の好適な単回用量は、動物の体重1キログラム当たり約0.5ng～約1gの治療用組成物である。この治療用組成物による更なる治療は、元の投与の約1時間～1年後に投与することができる。この治療用組成物による更なる治療は、好適には動物がもはや外部寄生生物に対する過敏性応答から保護されなくなったときに投与される。特定の投与用量及び投与計画は、上述のパラメーターに基づき当業者には展開することができる。投与の様式は、皮下、皮内、静脈内、鼻内、経口、経皮及び筋肉内経路を含んでよいが、これらに限定されない。

40

【0229】

本発明の治療用組成物は、外部寄生生物の噛み傷に対する動物の過敏症を調節すること

50

ができる他の化合物と組合せて使用することができる。例えば、過敏性応答に關与する細胞の機能を調節することができる化合物、全身性薬劑又は抗炎症劑（例えば、抗ヒスタミン劑、抗ステロイド劑、抗炎症劑、及びIgEからIgGへのイムノグロブリン重鎖のクラススイッチを行わせる薬劑）のようなアレルギー反応を低下させる化合物により動物を治療することができる。過敏性応答に關与する細胞の機能を調節するのに有用な適切な化合物は、抗ヒスタミン劑、クロモリンナトリウム（*chromolyn sodium*）、テオフィリン、シクロスポリンA、アドレナリン、コルチゾン、細胞のシグナル伝達を調節することができる化合物、アデノシン3',5'-サイクリックリン酸（*cAMP*）活性を調節することができる化合物、並びにIgE若しくはIgE特異的Fc受容体からのペプチド、IgE若しくはIgE特異的Fc受容体からのペプチドに特異的な抗体、又はFc受容体に対するIgEの結合をブロックすることができる抗体のような、IgE活性をブロックする化合物を含むが、これらに限定されない。

10

【0230】

本発明の別の態様は、本発明の処方物を使用する、アレルギー性皮膚炎に感受性の又は同皮膚炎の動物のための治療法を処方するための方法を含む。ノミのアレルギー性皮膚炎の治療法を処方するための好適な方法は、例えば、（1）動物の1つの部位に少なくとも1つの本発明のノミの唾液抗原、又はそのミメトープを含有する有効量の処方物（適切で好適な処方物は本明細書に開示される）を皮内注入し；（2）動物の第2の部位に有効量の対照溶液を皮内注入し；（3）処方物の注入により生じた膨疹の大きさを測定して、対照溶液の注入により生じた膨疹の大きさと比較することにより、その動物がノミのアレルギー性皮膚炎であるかどうかを評価し；そして（4）ノミのアレルギー性皮膚炎の治療法を処方することからなる。

20

【0231】

ノミのアレルギー性皮膚炎の治療法を処方する代替となる好適な方法は、（1）試験される動物から入手した体液の試料の第1の部分を、少なくとも1つのノミの唾液抗原、又はそのミメトープを含有する有効量の処方物（適切で好適な処方物は、本明細書に開示される）と接触させて第1の免疫複合体溶液を形成し；（2）陽性対照抗体を接触させて第2の免疫複合体溶液を形成し；（3）第1及び第2の免疫複合体溶液中の免疫複合体形成量を測定して比較することにより、その動物がノミのアレルギー性皮膚炎であるかどうかを評価し；そして（4）ノミのアレルギー性皮膚炎の治療法を処方することからなる。本明細書に開示される外部寄生生物唾液産生物処方物を使用して、他の外部寄生生物により引き起こされるアレルギーの治療法を処方するために同様の方法を使用することに注意されたい。

30

【0232】

本発明の別の態様は、本発明の処方物を使用して、アレルギー性皮膚炎に感受性の又は同皮膚炎の動物をモニターするための方法を含む。本発明の*in vivo*及び*in vitro*試験は、アレルギー性皮膚炎の治療前及び後にアレルギー性皮膚炎について動物を試験するために使用することができる。ノミのアレルギー性皮膚炎の治療をモニターするための好適な方法（この方法はまた、他の外部寄生生物アレルギーの治療をモニターするために適用することができる）は、（1）動物の1つの部位に少なくとも1つのノミの唾液産生物、又はそのミメトープを含有する有効量の処方物（適切で好適な処方物は本明細書に開示される）を皮内注入し；（2）動物の第2の部位に有効量の対照溶液を皮内注入し；そして（3）処方物の注入により生じた膨疹の大きさを測定して、対照溶液の注入により生じた膨疹の大きさと比較することにより、その動物がノミの唾液抗原に対して脱感作されているかどうかを決定することからなる。

40

【0233】

ノミのアレルギー性皮膚炎の治療をモニターするための代替となる好適な方法（これは、他の外部寄生生物のアレルギーの治療をモニターするために適用することができる）は、（1）試験される動物から入手した体液の試料の第1の部分を、少なくとも1つのノミの唾液産生物又はそのミメトープを含有する有効量の処方物（適切で好適な処方物は、本

50

明細書に開示される)と接触させて第1の免疫複合体溶液を形成し; (2)陽性対照抗体を接触させて第2の免疫複合体溶液を形成し;そして(3)第1及び第2の免疫複合体溶液中の免疫複合体形成量を測定して比較することにより、その動物がノミの唾液抗原に対して脱感作されているかどうか決定することからなる。

【0234】

本発明はまた、外部寄生生物唾液産生物、又はそのミメトープに選択的に結合することができる抗体を含む。本明細書ではこのような抗体は、抗外部寄生生物唾液産生物抗体と呼ばれる。本明細書で使用されるとき、「選択的に結合する」という用語は、外部寄生生物唾液産生物及びそのミメトープに優先的に結合するこのような抗体の能力を意味する。特に、本発明は、ノミの唾液産生物に選択的に結合することができる抗体を含む。結合は、免疫プロット測定法、免疫沈降測定法、酵素免疫測定法(例えばELISA)、放射性免疫測定法、免疫蛍光抗体測定法及び免疫電子顕微鏡法を含む、当業者に知られている種々の方法を使用して測定することができる;例えば、Sambrookらの同文献を参照のこと。

10

【0235】

本発明の抗体は、ポリクローナル又はモノクローナル抗体であってよい。本発明の抗体は、抗体を得るために使用されるタンパク質又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することができる、一本鎖抗体を含む、抗体断片及び遺伝子を改変した抗体のような機能的な同等物を含む。好適な抗体は、外部寄生生物唾液タンパク質、又はそのミメトープに応答して生じる。更に好適な抗体は、本発明の収集手段から溶出される外部寄生生物唾液タンパク質の少なくとも一部を有する、少なくとも1つの外部寄生生物唾液タンパク質、又はそのミメトープに応答して生じる。更になお好適な抗体は、唾液抽出物FS-1、FS-2及び/又はFS-3に含まれる、少なくとも1つのノミの唾液産生物、又はその相同体(例えば、他の外部寄生生物の唾液産生物)に応答して生じる。抗体を生成させる更に好適な外部寄生生物唾液タンパク質は、fspA、fspB、fspC1、fspC2、fspD1、fspD2、fspE、fspF、fspG1、fspG2、fspG3、fspH、fspI、fspJ1、fspJ2、fspK、fspL1、fspL2、fspM1、fspM2、fspN1、fspN2及びfspN3の1つ以上のタンパク質又はその相同体の少なくとも一部を含む。好適には、本発明の抗体は、本発明のノミの唾液産生物に対して約 $10^3 M^{-1}$ ~約 $10^{12} M^{-1}$ の単一部位結合親和性を有する。

20

30

【0236】

本発明の抗体を産生する好適な方法は、動物に有効量の外部寄生生物唾液産生物又はそのミメトープを投与して抗体を産生させて、その抗体を回収することを含む。規定された産物又はミメトープに対して生じた抗体は、このような抗体が、診断測定法において妨害を、又は治療用組成物に使用されると副作用を引き起こすかもしれない他の物質に対する抗体が実質的に混入していないため、有利である。

【0237】

本発明の抗体は、本発明の範囲内である種々の使用可能性を有する。例えば、このような抗体は、(a)アレルギー性皮膚炎から動物を保護するために、動物を受動免疫化するためのワクチンとして、(b)試験キットの陽性対照として、及び/又は(c)タンパク質と他の混入物の混合物から目的の外部寄生生物唾液産生物を回収するための道具として使用することができる。

40

【0238】

以下の実施例は、説明の目的で提供されるものであって、本発明の範囲を限定しようとするものではない。

【実施例1】

【0239】

この実施例は、本発明の唾液収集装置を用いるノミ唾液タンパク質の収集を記載している。

50

唾液収集装置は、以下のように準備した。

【0240】

図4A及び4Bを参照して、唾液収集装置2のチャンバー6の内径(直径約47mm)に合うVWRプロットングパッド#320(VWR, Denver, Co)の約4片を含む加湿装置34が、準備された。このプロットングパッドは、予備湿潤溶液(ペニシリン50単位/ml及びストレプトマイシン50 μ g/mlを含む滅菌水、Sigma, St. Louis, Moから入手しうる)の十分な量を用いて予備湿潤されて、プロットングパッドは、湿らせられたが、しずくのたれる湿りではなかった。予備湿潤されたフィルター34は、唾液収集装置2のチャンバー6の底部末端22の内側に置き、ろ紙はチャンバー6の底部末端22すぐ内側に置かれた。

10

【0241】

デュラポア(登録商標)膜(Millipore, Bedford, MAから入手しうる)を含む収集手段24を、唾液収集装置2のチャンバー6の外径(直径約48mm)に合うように切断した。デュラポア(登録商標)膜24を、上記の予備湿潤溶液を用いて予備湿潤した。デュラポア(登録商標)膜24は、チャンバー6の底部末端22のすぐ外側に置かれ、デュラポア(登録商標)膜24は、チャンバー6の底部末端22の外側の縁に接触させ、かつ湿潤ろ紙にも接触させた。延伸パラフィルム(登録商標)(American National Can(登録商標), Greenwich, CTから入手しうる)28の一片を含む障壁手段が、収集手段24及びチャンバー6の底部末端22を覆い、チャンバー6の側壁30まで引き伸ばされた。ラバーシール32(すなわち、O-リング)は、パラフィルム(登録商標)の上に置かれ、それにより収集手段24を越えて側壁30までパラフィルム(登録商標)を更にしっかり締めつけ、チャンバー6環境を封止した。

20

【0242】

収集装置2は、予め組み立てられ、次いでチャンバー6の頂部末端20は、Wadewet al., (前出)により記載されているように熱及び湿度源として作用することができる人工の供給システムに取り付けられた。人工の供給システムは、貫通して開けられた孔を有するプレキシグラスの棚で水平に上の区画と下の区画に分けられた大きなプレキシグラスの箱(40cm \times 40cm \times 40cm)から成り立つ。収集装置2は、孔に挿入され、装置2のチャンバー6は、上の区分の棚の上に置かれ、ハウジング4は下の区分の棚の下に置かれた。装置2は、棚に置かれた金属フックに取りつけられたゴムバンドを取りつけることにより棚にしっかりと止められている。棚の上のどのような孔も、ゴム栓を用いて閉じられ、下の区分の環境から上の区分の環境を隔離している。上の区分は、2個の水の受け皿、送風機及び加熱台を含んでいる。水の受け皿は、送風機が、受け皿に向き合うように置かれている。装置2は、人工供給システムに保持されているが、送風機は、連続的に送風され、それにより上の区分と収集装置2のチャンバー6を通して熱及び湿度を循環させる。そのようにして、チャンバー6中の相対湿度は、約94%湿度に維持され、温度は約37 $^{\circ}$ Cに維持されている。

30

【0243】

約3,000~5,000の新たに発生させた無給餌のCtenocephalides felisノミを収集装置2のハウジング4に加えた。このノミを、先ず約75リットル(20ガロン)のガラス水槽に集めた。次いで、このノミは、真空チャンバーの上部の交換手段16のナイロンメッシュを有するハウジング4の端部を置き、かつノミを水槽からタイゴン(tygon)チューブを通してハウジング4の中へ吸い込むことにより、収集装置2のハウジング4へ移動させた。ハウジング4は、次いでハウジング4の中にノミを閉じ込めるために保持手段18のナイロンメッシュで覆われた。チャンバー6の底部末端22は、次いでハウジング4に置かれ、パラフィルム(登録商標)28及び保持手段18のナイロンメッシュが並べて置かれた。収集装置2が、人工給餌システムに取り付けられたとき、ハウジング4内の周囲温度は約27 $^{\circ}$ Cに維持されたが、一方チャンバー6の周囲温度は約37 $^{\circ}$ Cに維持された。ハウジング4の相対湿度は、プレキシグラスの棚で下

40

50

の区分を閉じることにより約50%に維持された。

【0244】

一つの実験において、ノミ唾液産生物は、デュラポア（登録商標）膜24上で集められ、膜を0.1%クマシーブルー（Coomassie blue）染色液中に20分間浸し、膜を50%メタノール中で脱染色し、次いで膜を空気乾燥することにより可視化した。膜に沈積したタンパク質は、その青色によって検出された。

【0245】

別の実験として、ノミ唾液産生物が、ノミを収集装置に入れた後、0~24時間、24~72時間及び72~120時間の間収集された。24時間、72時間及び120時間の時点で、収集装置2に取り付けられたデュラポア（登録商標）膜を取りはずし、新しい予備湿潤されたデュラポア（登録商標）膜を同じ装置に取りつけた。プロッティングパッドは、デュラポア（登録商標）膜24が新しく取り替えられたとき、上記の予備湿潤溶液を用いて予備湿潤された。ノミ唾液産生物は、それぞれの膜をそれぞれの時点で別々に50%アセトニトリルと1%TFA溶液を含む溶液に室温で一晩浸し、溶液中に溶離されたノミ唾液産生物を含むノミ唾液産生物混合物を得るために攪拌することにより、デュラポア（登録商標）膜から抽出された。ノミ唾液産生物を含む混合物は、回収され、ペレットを形成するように乾燥するまで凍結乾燥された。それぞれの時点からそれぞれのデュラポア（登録商標）膜から溶離されたノミ唾液タンパク質の特性及び量は、Sambrook et al., 前出により記載されているものと同様な手法を用いて、14%トリス-グリシンSDS-PAGEを還元することにより測定された。得られたタンパク質パターンは、上記の手法を用いてゲルをクマシーブルー染色液で染色することにより可視化された。膜上に集められた唾液タンパク質の量は、ノミが72時間を越えて収集装置にいる場合には、減少した。

10

20

【実施例2】

【0246】

本発明の、FS-1、FS-2及びFS-3ノミ唾液抽出物を集める標準手順は、以下のように実施された。ノミ唾液産生物は、ノミ唾液抽出物FS-3を除いて、実施例1に記載した方法を用いて収集膜上で72時間収集され、収集膜は、Whatmann, Inc., Clifton, NJから入手しうるDE-81クロマト紙であった。

【0247】

A. ノミ唾液抽出物FS-1及びFS-2:

ノミ唾液産生物は、それぞれの時点のそれぞれの膜を、別々に50%アセトニトリルと0.1%TFAを含む第一の溶媒に8時間浸すことにより、デュラポア膜（登録商標）24から抽出された。溶離されたノミ唾液産生物を含む初めの混合物は、回収され、乾燥するまで凍結乾燥され、それにより最初のペレットを形成した。次いで、同じ膜は、50%アセトニトリルと1%TFAを含む第二の溶媒に室温で一晩攪拌しながら浸漬され、第二の溶媒に溶離したノミ唾液産生物を含む混合物を得た。この第二の混合物は、この第二の抽出物から回収され、乾燥するまで凍結乾燥され、第二のペレットを形成させた。

30

【0248】

二つの凍結乾燥工程から回収された二つのペレットは、12.8%アセトニトリルを含む第三の溶媒と混合され、この溶媒中に溶解させられたノミ唾液産生物が、回収された。非溶解物質は、再度12.8%アセトニトリルと混合され、その溶媒に溶解された更なるノミ唾液産生物が、回収された。この二つの混合物は、抽出物FS-1を得るために混合された。

40

【0249】

第二の可溶化工程の後の非溶解物質残留物は、次いで抽出物FS-2を得るために残留物質を可溶化させる50%アセトニトリルと混合した。

少なくとも一つの実験で得られたFS-1及びFS-2ノミ唾液に含まれたノミ唾液タンパク質の特性及び量は、以下の方法により測定された。それぞれの抽出物は、真空下での蒸発により濃縮され、16%トリス-グリシンSDS-PAGEを、Sambrook

50

et al., 前出により記載された技術と同様の技術を用いて還元することにより評価した。そのような標準方法を用いて、デュラポア（登録商標）膜から溶離されたFS-1又はFS-2の約10 μ gが、16%トリス-グリシンポリアクリルアミドゲル上に載せられ、還元条件下で電気泳動に付された。このゲルを、クマシーブルーで染色し、乾燥した。

【0250】

結果が、図1Bに示されている。FS-1は、図1Bのレーン13に示され、FS-2は、図1Bのレーン14及び15に示されている。FS-1は、以下の分子量を有すると評価されたタンパク質を含むことが見いだされた：9kD、11kD、12kD、15kD、22kD、48kD、50kD、53kD、80kD、124kD、130kD、189kD及び201kD。80kD及びそれを越えるそれらのタンパク質は、より低い分子量バンドよりも更に弱い。FS-2は、以下の分子量を有するタンパク質を含むことが見いだされた：47kD、49kD、52kD、57kD、64kD、71kD、88kD、96kD、97kD、130kD、161kD、175kD、189kD、222kD、235kD及び302kD。47kD、49kD及び52kDのバンドは、より高い分子量を有するバンドよりも明瞭であった。この結果は、FS-2に含まれているタンパク質の実質的な部分が、fspN1、fspN2及び/又はfspN3であることを示唆している。

10

【0251】

タンパク質濃度は、Bio-Rad Bradfordアッセイ（Bio-Rad, Hercules, CAから入手しうる）を用いて測定された。この結果は、タンパク質の約750 μ gが、FS-1抽出物の約3.66 $\times 10^7$ ノミ時間（72時間での5.08 $\times 10^5$ ノミ）で、集められ、タンパク質の約2.35mgが、FS-2抽出物中の3.66 $\times 10^7$ ノミ時間で集められることを示している。

20

【0252】

B. ノミ唾液抽出物FS-3：

FS-3ノミ唾液抽出物を生成するためのノミ唾液産生物は、収集膜24がDE-81クロマト紙であったことを除いて、FS-1及びFS-2が集められた方法と同様な方法で集められた。ノミ唾液産生物は、DE-81膜から、それぞれの時点のそれぞれの膜を別々にリン酸塩緩衝塩溶液中の1M NaClを含む溶媒に8時間浸すことにより抽出された。この産生物は、FS-1及びFS-2のために開示されたような標準手法を用い溶媒から回収された。

30

【0253】

FS-3ノミ唾液抽出物の分析は、少なくとも1次ゲル電気泳動に基づいて、FS-3が、FS-1及びFS-2で見いだされたタンパク質のようなタンパク質を含むように見えることを示した。FS-3のSDS-PAGEパターンは、例えばFS-3抽出物中の高分子量タンパク質の量を増大させるように見えることを除いて、FS-1のパターンに非常に似ている。FS-3ノミ唾液抽出物は、当技術での標準技術を用いて、抗凝血活性を有することも示された；例えばDunwiddie et al., 1991, Thrombosis Research 64, 787-794; Ribeiro et al., 1990, Comp. Biochem. Physiol. 95, 215-218; Ribeiro et al., 1990, Br. J. Pharmacol. 101, 932-936; Ribeiro et al., 1987, Exper. Parasitol. 64, 347-353; Cupp et al., 1994, Am. J. Trop. Med. Hyg. 50, 241-246; Garcia et al., 1994, Exper. Parasitol. 78, 287-293参照。FS-3抽出物は、Sigmaにより供給される技術のような当技術での標準技術を用いて、Sigmaの酸ホスフォターゼアッセイキットにより、酸ホスフォターゼ活性を表すことも示された。

40

【実施例3】

【0254】

50

この実施例は、本発明の唾液収集装置を用いて集めたノミ唾液タンパク質のHPLCによる特性決定を記載している。

FS-1ノミ唾液抽出物は、実施例2に記載されたように、約140,000ノミから72時間で集められた。FS-1中に含まれているタンパク質は、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)の標準技術を用いて分析された。具体的には、このタンパク質は、15cm×0.46cmC4カラム上を、水中の0.1% TFA(溶媒A)から90%アセトニトリル中の0.085% TFA(溶媒B)までの勾配を用いて1分当たり0.8mlの流速で通された。したがって、この勾配は、15分で約5.6%溶媒Bであり、75分で約100%溶媒Bであった。

【0255】

この結果が、図2に示されている。約14の主要タンパク質画分が、分析された。それぞれのピークの回収は、ピーク当たり約5 μ g~10 μ gであった。このピークは、図2に示すように、ピークA、ピークB、ピークC、ピークD、ピークE、ピークF、ピークG、ピークH、ピークI、ピークJ、ピークK、ピークL、ピークM及びピークNと標識され、それぞれ、タンパク質組成物fspA、fspB、fspC1及びfspC2、fspD1及びfspD2、fspE、fspF、fspG1、fspG2、fspG3、fspH、fspI、fspJ1及びfspJ2、fspK、fspL1及びfspL2、fspM1及びfspM2、並びにfspN1、fspN2及びfspN3を表す。

10

【0256】

それぞれのHPLCピークからの試料は、実施例1に記載された方法を用いてトリスグリシンSDS-PAGEゲルにより分析された。結果を図1A、1B及び1Cに示す。図1A及び1Bに示されたタンパク質は、16%トリスグリシンSDS-PAGEゲルにより分析され、図1Cに示されたタンパク質は、14%トリスグリシンSDS-PAGEゲルにより分析された。タンパク質マーカーは、図1Aのレーン1、図1Bのレーン2及び図1Cのレーン1に示されている。別のレーンは、以下のように唾液組成物試料を示している。

20

【0257】

【表 1】

図1A

レーン	フラクション	Fs-(分子量 (標準)
1)	--	--
2)	10	--
3)	11-13	A
4)	14	B
5)	15	B
6)	16	C1
7)	17	C2
8)	18	D1
9)	19	D1
10)	20	D2
11)	21	D2
12)	22	E
13)	23	F
14)	24	G
15)	25	G

10

図1B

レーン	フラクション	Fs-(分子量 (標準)
1)	26-27	G
2)	--	分子量 (標準)
3)	28	H
4)	29-30	I
5)	31	J
6)	32	K
7)	33	K
8)	34	L
9)	35	M1
10)	36-37	M1
11)	38	M1
12)	39-50	M2
13)	--	FS-1
14)	--	FS-2
15)	--	FS-2

20

30

図1C

レーン	フラクション	FS-(分子量 (標準)
1)	--	分子量 (標準)
2)	56-68	N

図 1 A を参照して、以下のノミ唾液タンパク質（バンドとして示される）が、観察された：ピーク A 及びピーク B 試料での約 10 kD の明瞭なバンド；C 1 として示されるピーク C 試料での約 6 kD の明瞭なバンド及び 9 kD のやや明瞭でないバンド；C 2 として示されるピーク C での約 7 kD の明瞭なバンド；D 1 として示されるピーク D 試料での約 7 kD の明瞭なバンド及び 8 kD のやや明瞭でないバンド；D 2 として示されるピーク D 試料での約 8 kD の明瞭なバンド及び 9 kD のやや明瞭でないバンド；ピーク E 及び F 試料での 8 kD の明瞭なバンド及び約 7 kD のやや明瞭でないバンド；ピーク G 試料での約 9 kD の明瞭なバンド並びに約 7 kD 及び 10 kD のやや明瞭でないバンド。図 1 B を参照して、以下のノミ唾液タンパク質が、観察された：ピーク H 試料での約 9 kD の明瞭なバンド及び約 12 kD のやや明瞭でないバンド；ピーク I 試料での約 21 kD の明瞭なバンド並びに約 7 kD、9 kD、12 kD、14 kD 及び 70 kD のやや明瞭でないバンド；ピーク J 試料の約 14 kD 及び 21 kD の明瞭なバンド並びに約 11 kD 及び 17 kD のやや明瞭でないバンド；ピーク K 試料の約 14 kD 及び 15 kD の明瞭なバンド並びに約 12 kD、18 kD 及び 21 kD のやや明瞭でないバンド；ピーク L 試料の約 15 kD の

40

50

明瞭なバンド；M 1として示されるピークM試料の約11 kD、12 kD及び21 kDの明瞭なバンド並びに約15 kD、17 kD、22 kD及び37 kDのやや明瞭でないバンド；M 2として示されるピークM試料の約36 kDの明瞭なバンド並びに約11 kD、21 kD及び22 kDのやや明瞭でないバンド。図1Cを参照して、ピークN試料中の、約42 kD、43 kD及び44 kDの明瞭なバンド並びに約32 kDのやや明瞭でないバンドが検出された。

【実施例4】

【0258】

この実施例は、単離され、HPLC精製されたノミ唾液タンパク質のアミノ酸配列分析を記載している。

アミノ(N-)末端アミノ酸配列分析は、当業者に知られている標準手法を用いて、実施例3に記載したHPLC分離のノミ唾液タンパク質のいくつかで実施された(例えば、Geisow et al., 1989, in Protein Sequencing: A Practical Approach, JBC Findlay and MJ Geisow (eds.), IRL Press, Oxford, England, pp. 85-98; Hewick et al., 1981, J. Biol. Chem., Vol. 256, pp. 7990-7997参照)。

【0259】

ノミ唾液タンパク質f s p AのN末端部分アミノ酸配列(これは、図2のピークAとして移動した)は、標準一文字コードで表現して：

【0260】

【化27】

```

Y G K Q Y S E K G G R G Q R H Q I L K K G K
Q Y S           S K           I           L   D   L
S
R

```

であると決定された。このf s p AのN末端部分アミノ酸配列は、配列番号1と表示されている。配列エラー(すなわち、アミノ酸の誤同定)が存在しうるいくつかの位置での異種混成又は唾液タンパク質が集められたノミ母集団での対立変異が存在することに注意すべきである。指示位置での別のアミノ酸のいずれかを見いだすことが明らかに起こりうる。

【0261】

f s p Bのノミ唾液タンパク質のN末端部分アミノ酸配列(これは、図2のピークBとして移動した)は、S/QGKQYSEXG/SKと決定され、配列番号27と表示された。

【0262】

このアミノ酸配列は、ノミ唾液タンパク質f s p Aから得たN末端部分アミノ酸配列と本質的に同じか、又は少なくともその一部分であった。

ピークGタンパク質の配列分析は、そのピークに三個のタンパク質(ここで、f s p G 1、f s p G 2及びf s p G 3に対応する)の存在を示した。約9 kDの分子量を有するノミ唾液タンパク質f s p G 1は、DRRVSKのN末端部分アミノ酸配列を有し、配列番号28と表示された。N末端部分アミノ酸配列は、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5及び配列番号14で示されているように、f s p Hの配列と同一である。約7 kDの分子量を有するノミ唾液タンパク質f s p G 2は、SKMVT EKXKSGGNPSTKEVSI PのN末端部分アミノ酸配列を有し、配列番号29と表示された。約6 kDの分子量を有するノミ唾液タンパク質f s p G 3は、EVSIPSGKLTIEDFXIGNHQのN末端部分アミノ酸配列を有し、配列番号30と表示された。配列番号30と配列番号29の比較は、f s p G 2の最後の5個のアミノ酸がf s p G 3のN末端でのそれらと同一であるので、f s p G 3はf s p G 2のタンパク質分解的分解生成物でありうることを示している。

10

20

30

40

50

【0263】

ノミ唾液タンパク質 f s p H (これは、図2のピークHに移動していた)のN末端部分アミノ酸配列は、D R R V S K T X Q S G G K I Q S E X Q V V I K S G Q H / Y I L E N Y X S D G Rであると決定され、本明細書で配列番号14と表示された。ヒスチジン及びチロシンは、アミノ酸位置27で同等にあるようであった。

【0264】

ノミ唾液タンパク質 f s p Hは、内部のアミノ酸配列を得るためにタンパク質分解的開裂にも付された。特に、f s p Hは、当技術の標準方法を用いて、エンドプロテイナーゼ A s p - N (Boehringer Mannheim Biochemica, Indianapolis, INから入手しうる)で開裂された。消化されたタンパク質は、次いでStone et al. (前出)により記載された方法を用いてHPLCにより分析された。得られた結果は、図3に示されている。3個のタンパク質分解断片が、単離され、ここでf s p H e、f s p H h及びf s p H jとして対応されている。

10

【0265】

f s p H eのN末端部分アミノ酸配列は、D S K H C Y C E A P Y Sであると決定され、配列番号3と表示された。f s p H hのN末端部分アミノ酸配列は、D G R N N N N P C H L F C M R E C R S G N G G C G N G G R T R P D S K H Cであると決定され、配列番号4と表示された。f s p H jのN末端部分アミノ酸配列は、D R R V S K T C Q S Gであると決定され、配列番号5と表示された。配列番号5～配列番号14の比較は、f s p H jは、f s p HのN末端断片であることを示した。

20

【0266】

配列番号14、配列番号3、配列番号4及び配列番号5を並べることにより、f s p HのN末端から出発して、以下のアミノ酸配列が、推論された：D R R V S K T C Q S G G K I Q S E X Q V V I K S G Q H / Y I L E N Y X S D G R N N N N P C H L F C M R E C R S G N G G C G N G G R T R P D S K H C Y C E A P Y S。このアミノ酸配列は、配列番号2と表示され、この配列を有するタンパク質の分子量は約8,600kDであるので、ほとんどのf s p Hを表すと思われる。

【0267】

ノミ唾液タンパク質 f s p I (これは、図2のピークIとして移動した)のN末端部分アミノ酸配列は、E D I W K V N K K X T S G G K N Q D R K L D Q I I Q K G Q Q V X X Q N X X Kであると決定され、本明細書では配列番号6と表示された。

30

【0268】

ピークJタンパク質の配列分析は、本明細書でf s p J 1及びf s p J 2として示される、ピークの2個のタンパク質の存在を示した。ノミ唾液タンパク質 f s p J 1のN末端部分アミノ酸配列は、N S H E P G N T R K I R E V M D K L R K Q H Pであると決定され、本明細書で配列番号7と表示された。ノミ唾液タンパク質 f s p J 2のN末端部分アミノ酸配列は、E I K R N S H E P G N T R K I R E V M D K L R K Q H Pであると決定され、本明細書で配列番号8と表示された。配列番号7及び配列番号8で表されるタンパク質は、実施例1に記載されているSDS-PAGEにより別々に分析されなかった。配列番号7と配列番号8の比較は、f s p J 1がf s p J 2のN末端で見られた初めの4個のアミノ酸を欠くことを除いて、f s p J 1のN末端部分アミノ酸配列はf s p J 2の配列に非常に似ているように見えることで、f s p J 1は、f s p J 2の端を切ったものでありうることを示唆している。

40

【0269】

ピークLタンパク質の配列分析は、ここでf s p L 1及びf s p L 2として示されるピークの2個のタンパク質の存在を示した。2個のタンパク質、すなわちf s p L 1とf s p L 2が存在することは、ピークLを0.13%ヘプタフルオロ酪酸(溶媒A)及び90%アセトニトリル中の0.1%ヘプタフルオロ酪酸(溶媒B)を以下の傾斜処方(80分:30%溶媒Bから70%溶媒B)によるC4逆相クロマトグラフィーに付すことにより示された。HPLC分離されたf s p L 1のN末端部分アミノ酸配列は、N D K E P G N

50

TRKIREVMDKLRKQAQPRTDGQRPKTXIMであると決定され、配列番号9と表示された。f s p L 2のN末端部分アミノ酸配列は、XLXRNDKEPGNTRKIREVMDKであると決定され、配列番号10と表示された。配列番号9と配列番号10の比較は、f s p L 1がN末端でf s p L 2よりも4個のアミノ酸が短いことを除いて、f s p L 1及びf s p L 2は類似したタンパク質であることを示している。

【0270】

実施例3に記載したようにSDS-PAGEによるピークNに含まれているタンパク質の分析は、3個の異なるバンドを示した。このバンドは、ノミ唾液タンパク質f s p N 1、f s p N 2及びf s p N 3と表示された。f s p N 1のN末端部分アミノ酸配列は、NDELKFFVFMMAKであると決定され、配列番号11と表示された。f s p N 2のN末端部分アミノ酸配列は、XDELKFFVFMMAKGP SXQAXDYP Cであると決定され、配列番号12と表示された。f s p N 3のN末端部分アミノ酸配列は、ELKFFVFATARGMSHTPCDYPであると決定され、配列番号13と表示された。配列番号11と配列番号12の比較は、f s p N 1及びf s p N 2が同一のN末端配列を共有していることを示唆している。f s p N 1とf s p N 2は、SDS-PAGEに付した場合に異なって移動するので、多分より長いC末端ドメインを有する1個のタンパク質のためか及び/又は後翻訳的改質のためにこの2個のタンパク質は異なる相同体であるようである。配列番号11及び配列番号12に対する配列番号13の比較は、f s p N 3は、内部配列変化を有するf s p N 1及びf s p N 2の相同体であってよいことを示唆している。

10

20

【0271】

ピークNのノミ唾液タンパク質は、内部アミノ酸配列データを得るために、タンパク質分解的開裂に付された。特に、ピークNのタンパク質は、当技術の標準方法を用いて、エンドプロテイナーゼA s p - N (Boehringer Mannheim Biochemica, Indianapolis, Inから入手しうる)で開裂された。消化されたタンパク質は、次いでStone et al. (前出)により記載された方法を用いてHPLCにより分析され、前述したように配列化された。ピークNのノミ唾液タンパク質(断片f s p N (100-101)と名づけた)のN末端部分アミノ酸配列は、DIENIKKGGEGQPGAPGGKENNLS/LVLと決定され、本明細書で配列番号31と表示された。

30

【実施例5】

【0272】

この実施例は、ピークHに含まれているタンパク質の別の特性分析を記載している。

ピークHに含まれているタンパク質の等電的pHを決定するために、そのピークに存在するタンパク質が、当業者に知られている等電点電気泳動の技術を用いて分析された；例えば、O'Farrell, 1975, J. Biol. Chem., Vol. 250, p p. 4007-4021を参照。ピークHに含まれているタンパク質のpI値は、約pI 8.5から約pI 9.6の範囲である約pI 9である。

【0273】

ピークHに含まれているタンパク質の分子量は、ESMSにより決定された。ESMSの方法は、Fisons VG quattro-SQマスマススペクトロメーターで実施された。質量範囲は、100~2,000 m/zに対して測定された。注入速度は、1分当たり4 µlで実施された。円錐電圧は、45ボルトで行われた。注入試料は、50%アセトニトリル中の0.1%ギ酸をµl当たり約100 pモルのタンパク質濃度で含んだ。この結果は、ピークHが、明らかに8,618 ± 6ダルトンの分子量を有するすべてのタンパク質の母集団を含むことを示している。

40

【実施例6】

【0274】

この実施例は、ノミ唾液タンパク質f s p H及びf s p Iの少なくとも部分をコードする核酸配列の単離を記載している。

50

A. ノミライブラリーの説明

給餌及び非給餌ノミ cDNA ライブラリーは、標準方法により調製した。要約すると、約 3,000 ~ 4,000 給餌ノミ及び非給餌ノミの同数が、別々に集められ、ドライアイス冷却のすりばち/きね中に置かれ、そして微粒子に粉碎された。粉碎したノミからの RNA は、グアニジンチオシアナート法を用いて直接抽出し、セシウムクロリド傾斜媒体中で遠心分離により調製された（例えば、Sambrook et al., 前出参照）。セシウムクロリド精製のゼラチン質 RNA ベレットが、集められ、0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む滅菌 TE 緩衝液（10 mM トリス - HCl、pH 7.6 及び 1 mM EDTA）に溶解させた。

【0275】

この溶解されたベレットは、3 M 酢酸ナトリウム、pH 5.2 最終濃度 0.2 mM 及び残留 CsCl を除くために無水エタノールの 2 倍容量の添加により沈殿させた。全 RNA 量は、ファーストトラック (Fast Track) (登録商標) キット (方法と共に、Invitron Corp., San Diego, CA から入手しうる) を用いて mRNA を多くするために分画された。

【0276】

単離された全ノミ mRNA は、cDNA 合成及び分子クローニングのために直接に用いられた。cDNA 合成及び分子クローニングの方法は、Lambda Zap-cDNA 合成キット (登録商標) (Stratagene, Inc., La Jolla, CA から入手しうる) で供給される方法であった。以下は、包装された全プラーク形成単位 (PFU) の指示された数を有して調製されたノミ cDNA ライブラリーの表である：(a) ライブラリー C (約 2.5×10^6 PFU) 及びライブラリー H (約 1.3×10^6 PFU) に対応する二つの全給餌ノミ cDNA 発現ライブラリー；(b) 全ノミ非給餌 cDNA 発現ライブラリー (約 1.3×10^6 PFU)；(c) 給餌及び非給餌ノミから集められた約 6,000 の唾液腺から調製されたノミ唾液腺 cDNA 発現ライブラリー (約 1.5×10^6 PFU)；及び (d) 約 5,000 の単離された中腸から調製されたノミ中腸 cDNA 発現ライブラリー (約 2.3×10^6)。

【0277】

B. fspH をコードする核酸分子の単離

ノミ唾液タンパク質 fspH の一部をコードする核酸分子は、実施例 6A に記載されたノミ唾液腺 cDNA 発現ライブラリーを用いて同定された。

【0278】

縮重合成オリゴヌクレオチドプライマーは、fspH のために演繹されたアミノ酸 (実施例 4 参照) から設計された。配列番号 2 の約 38 ~ 51 の残基に広がる fspH の領域に相当する 3 個の合成オリゴヌクレオチドが、合成された：プライマー 1、配列番号 2 の約 38 ~ 約 44 のアミノ酸残基に相当する「センス」プライマーは、核酸配列、5' AAT(C) AAT(C) AAT(C) AAT(C) CCT(GAC) TGT(C) CA 3' を有し、配列番号 15 と表示される。プライマー 2、配列番号 2 の約 46 ~ 約 51 のアミノ酸残基に相当する「アンチセンス」プライマーは、核酸配列、5' CAC(T)TC C(TAG)CT(G) CATG(A)CA G(A)AA 3' を有し、配列番号 16 と表示される。プライマー 3、配列番号 2 の約 43 ~ 約 48 のアミノ酸残基に相当する「センス」プライマーは、核酸配列、5' TGT(C) CAT(C) T(C)TG(ATC) TTT(C) TGC(T) ATG-3' に相当し、配列番号 17 と表示される。4 番目のプライマー、プライマー 4 (fspH のカルボキシル領域、すなわち配列番号 2 の約 69 ~ 76 のアミノ酸残基に広がる領域に相当する) が、合成された。プライマー 4、アンチセンスプライマーは、核酸配列、5' GGA(CGA) GCT(C) TCA(G) CAA(G) TAA(G) CAA(G) TGT(C) TT' 3' を有し、配列番号 18 と表示される。

【0279】

ノミ唾液腺ライブラリーからの断片の PCR 増幅は、標準手法を用いて行われた。PC

10

20

30

40

50

R増幅生成物は、プライマー1及び配列番号19と表示されたM13前進ユニバーサル標準プライマー、5'GTAAACGACGGCCAGT3'の組み合わせを用いて生成された。得られたPCR増幅生成物は、プライマー3とプライマー4を用いて組み合わせたPCR増幅に用いられた。得られたPCR増幅生成物、nfspH₁₀₁と表された101個のヌクレオチド断片は、Invitrogen, Corp., TA(登録商標)クローニングベクターへクローン化(Invitrogen, Corp.により供給された手法)し、標準手法を用いるDNA配列分析に付された。得られた核酸配列は、配列番号20として示された:

【0280】

【化28】

T TGT CAC TTT TTT TGT ATG AGA GAA TGC AGG TCA GGA AAC GGC

GGT TGC GGA AAC GGA GGA AGG ACA AGA CCT GAT TCG AAG CAC TGC

TAT GC

10

(プライマー誘導配列は、下線部分である)

内部の非プライマー誘導された配列の60個のヌクレオチドは、nfspHの20個のアミノ酸、配列番号2の番号として約48~約68に相当する領域をコードする。

【0281】

標準手法を用いて、核酸分子nfspH₁₀₁は、完全長、又は大きな部分のnfspHタンパク質に相当するタンパク質をコードする核酸分子を単離するためのプローブとして用いることができる。

20

【0282】

c.fspIをコードする核酸分子の単離

実施例4に開示されたfspI(配列番号6)のアミノ酸配列は、縮重オリゴヌクレオチドPCR増幅プライマー合成の組として用いられた。縮重プライマー5、配列番号6の約1~約8の残基に相当するセンスプライマーは、核酸配列、5'GAA(G)GAT(C)ATT(CA)TGGAAA(G)GTT(CAG)AAT(C)AAA3'を有し、配列番号21と表示される。縮重プライマー6、配列番号6の約11~約18の残基に相当するセンスプライマーは、核酸配列、5'ACT(CGA)TCT(CGA)GGT(CGA)GGT(CGA)AAA(G)AAT(C)CAA(G)GA3'を有し、配列番号22と表示される。

30

【0283】

プライマー5及び6は、PCR増幅生成物を生成させるために、ベクタープライマーBSKX(5'TTGGGTACCGGGCCCCCT3'、配列番号23)及び配列番号19と表示されているM13プライマーとの組み合わせで用いられた。

【0284】

PCR生成物は、Invitrogen TA(登録商標)ベクターにクローン化され、DNA配列分析に付された。分析され、nfspI₅₇₃と名づけられた一個のクローン化生成物は、fspIのために決定された部分アミノ酸配列に、少なくとも部分的に相当する573-ヌクレオチドを含んでいた。nfspI₅₇₃のヌクレオチド配列は、配列番号24として表される。配列番号24の翻訳は、配列番号25と表示される、以下の最長の読みとり枠を与える。

40

【0285】

fspI(配列番号6)の部分N末端配列と、核酸配列番号24から演繹されたタンパク質配列番号25を組み合わせ、fspIのための見かけの完全長アミノ酸配列を得ることができる。

【実施例7】

【0286】

この実施例は、ノミ唾液タンパク質fspH及びfspIの最少部分をコードする核酸

50

配列の単離を記載している。

A. f s p H をコードする核酸分子の増幅

実施例 6 B のカルボキシル末端 PCR 生成物 (配列番号 20) から決定された DNA 配列は、2 個の非縮重合成相同体プライマーを合成するために用いられた: プライマー 7 は、5' CCT GAC CTG CAT TCT CTC ATA C 3' を有し、配列番号 38 と表示され、プライマー 8 は、5' AGG TCT TGT CCT TCC TCC GTT TCC GCA 3' を有し、配列番号 39 と表示された。プライマー 8 は、配列番号 40 と表示された M13 逆プライマー、5' GGAAACAGCTAT GACCATG 3' との組み合わせで、標準技術を用いて実施例 6 A において上述した唾液腺 cDNA 発現ライブラリーの分画からの f s p H 遺伝子の 5' 末端部分を増幅するために用いられる。得られた PCR 生成物は、ゲル上で明瞭に見られないけれども、 $[^3\text{ }^2\text{ P}]$ -放射性標識化プローブとしてプライマー 7 を用いてサザンハイブリダイゼーションにより単一生成物として同定された。明瞭に見うるエチジウムブロミド染色 PCR 生成物が、プライマー 7 及び配列番号 41 と表示されたベクター T3 プライマー、5' ATTAACCCCTCACTAAAG 3' を利用する組み合わせ PCR 反応を行うことにより得られた。約 400 - bp 生成物は、1% アガロースゲル上で明瞭に見ることができ、 $[^3\text{ }^2\text{ P}]$ 標識縮重プライマー 1 (配列番号 15) とハイブリダイゼーション陽性であった。

10

【0287】

f s p H₂₄₂ と名づけられた、f s p H の 400 - bp 生成物の、部分的な、242 - bp、ヌクレオチド配列は、配列番号 32 として表される。配列番号 32 の翻訳は、配列番号 33 と表示される f s p H₈₀ と名づけられたアミノ酸配列を与える。

20

【0288】

B. f s p I をコードする核酸分子の増幅

二個の別のプライマーが、実施例 6 A に記載されたようにして調製されたノミ唾液腺ライブラリーからの f s p I タンパク質 cDNA 配列を単離するために製造された。単離方法は、ノミ唾液腺ライブラリーの PCR 反復及び PCR 生成の生成物に対するプローブハイブリダイゼーションを用いた。ノミ唾液腺ライブラリー (ミニライブラリー) のフラクションで PCR の反復は、最終プラークの取り上げ及び $[^3\text{ }^2\text{ P}]$ 標識プローブとハイブリダイゼーションによる同定の前に、200 プラーク形成単位 (PFU) においてほぼ 1 に、クローン化された f s p I タンパク質 cDNA の発生頻度をせばめた。

30

【0289】

配列番号 24 に基づく 2 個のプライマーが、用いられた: プライマー 9 は、5' GCA AAG GTT ATA GAG GAG CTT G 3' を有し、配列番号 42 と表示され、そしてプライマー 10 は、5' AGC TTT CCA TCA CAT CCA GC 3' を有し、配列番号 43 と表示された。このプライマーは、唾液腺ミニライブラリーをスクリーニングするためのマーカー配列として用いられる 268 bp (プライマーを含む) の内部 PCR の DNA 配列を生成した。唾液腺ミニライブラリーの最終スクリーニングは、標準方法を用いて 4 個の $[^3\text{ }^2\text{ P}]$ 標識プライマー; プライマー 5、配列番号 21、プライマー 6、配列番号 22、プライマー 8、配列番号 42 及びプライマー 10、配列番号 43、のプールで行われた。この技術で同定された、n f s p I₅₉₁ と名づけられた核酸分子は、標準方法を用いて配列化され、配列番号 34 を得た。得られた配列番号 34 の翻訳は、n f s p I₁₅₅ と名づけられたタンパク質のための配列番号 35 と表示されるアミノ酸配列を与えた。このアミノ酸配列は、配列番号 35 がアミノ末端にアミノ酸配列 E D I を含まないことを除いて、配列番号 26 と類似であり、そして配列番号 35 は位置 7 に「C」含むが、一方配列番号 26 は、相当する位置に「L」を含む。

40

【実施例 8】

【0290】

この実施例は、ノミアレルギーに敏感な動物でのノミアレルギー皮膚炎を誘導する本発

50

明の処方物の活性を示している。

実施例 2 及び 3 に記載された単離されたノミ唾液タンパク質が、ノミアレルギーに感受性の動物でのノミアレルギー皮膚炎を誘導しうるかどうかを決定するために、皮膚試験が、感受性にされたイヌで行われた。6頭のイヌが、Gross, et al., 1985, Veterinary Pathology, Vol. 22, pp. 78-71の方法を用いて、ノミに感受性にさせられた。要約すると、イヌは各々、複数のチャンバーに入れられた約 25 の C. files ノミに曝露され、チャンバー内のノミに対して 1 週間間隔で約 15 分間、実験イヌ上で摂餌を行った。この 6 頭のイヌは、以下の期間に感受性にさせられた：イヌ 2080109 は、1993 年 8 月 31 日から 1994 年 6 月 7 日まで 38 回ノミに曝された。イヌ 2082101 は、1993 年 12 月 14 日から 1994 年 6 月 7 日まで 22 回ノミに曝された。イヌ 2082128 は、1993 年 8 月 31 日から 1994 年 5 月 24 日まで 20 回ノミに曝された。イヌ BFQ2 は、1994 年 3 月 15 日から 1994 年 7 月 12 日まで 17 回ノミに曝された。イヌ CPO2 は、3 月 15 日から 1994 年 6 月 7 日まで 12 回ノミに曝された。イヌ CQQ2 は、1994 年 3 月 15 日に 1 回ノミに曝された。

10

【0291】

皮膚試験は、1994 年 7 月 21 日の朝に行われた。これらのイヌは、外側の胸郭 / 腹部領域で剃られ、その領域に本発明の種々な処方物及び対照溶液を皮内的に注射された。注射当たりの全容量は、フェノール化塩溶液中で希釈された処方物及び対照の 50 マイクロリットル (μl) であった。それぞれのイヌは、表 1 に示された注射を受けた。

20

【0292】

【表 2】

表1. イヌへ投与された試料

試料	反復	μg/注入	ノミ-時間
希釈剤	2	N/A*	N/A
ヒスタミン	2	1.38	N/A
GREER	3	50 (w/v)	N/A
FS-1	3	1.88	4,660
A	3	0.23	23,000
B	3	0.32	23,000
C1	3	1.10**	23,000
C2	3	0.42	23,000
D1	3	0.24	23,000
D2	3	0.29	23,000
E	3	0.16	23,000
F	3	0.10	23,000
G	3	0.21	23,000
H	3	0.20	23,000
I	3	0.12	23,000
J	3	0.08	23,000
K	3	0.12	23,000
L	3	0.08	23,000
M1	3	0.16	23,000
M2	3	0.27	23,000
N	3	0.20	23,000
FS-2	3	0.71	4,660

* N/A:適用されず

** 見かけ量、検定干渉のために多分人為的に高い

これらの研究において、f s p J 1 及び f s p J 2 は、f s p J として一緒に投与された；f s p L 1 及び f s p L 2 は、f s p L として一緒に投与された；f s p N 1、f s p N 2 及び f s p N 3 は、f s p N として一緒に投与されたことに留意すること。A、B、C 1、C 2、D 1、D 2、E、F、G、H、I、J、K、L、M 1、M 2 及び N は、それぞれノミ唾液タンパク質 f s p A、f s p B、f s p C 1、f s p C 2、f s p D 1、f s p D 2、f s p E、f s p F、f s p G、f s p H、f s p I、f s p J、f s p K、f s p L、f s p M 1、f s p M 2 及び f s p N として示されていることに留意すべきである。この陰性の対照は希釈剤 (N C) を含み、陽性の対照は Greer 抗原 (G R) 及びヒスタミン (H I S) を含む。用いられた Greer 抗原の量は、製造者 (G r e e r L a b o r a t o r i e s , I n c . , L e n o i r , N C) により与えられた情報に従い、重量 / 容量 (w / v) で決定した。用いられたヒスタミンの量は、供給者のラベル (G r e e r L a b o r a t o r i e s , I n c . , L e n o i r , N C から入手しうる) により与えられた情報により決定した。

【0293】

A. 注射位置での虫刺傷跡寸法の比較

すべての注射部位は、客観的 (o b j) に 15 分、ミリメートル (m m) で測定され、0 ~ 4 の尺度で主観的 (s u b j) に評価された。主観的評価は、O h i o S t a t e

10

20

30

40

50

University, Columbus, OHでのKenneth W. Kwochka, D.V.M., Diplomate ACVD, (American College of Veterinary Dermatologists)により実施された。表2～7は、それぞれのイヌで得られた結果を示している。#は、それぞれの試料に与えられた指示の数を示している；抗原は、試料を示している。Inj 1、Inj 2及びInj 3は、3回の注射を示し、NAは、「適用せず」を示す。

【0294】

【表3】

表2. イヌの番号は: 2082101

# 抗原	注入1 主観	注入1 客観	注入2 主観	注入2 客観	注入3 主観	注入3 客観
1 陰性の対照	0	6	NA	NA	NA	NA
2 ヒスタミン	4	12	NA	NA	NA	NA
3 Greer	3	10	3	10	3	10
4 FS-1	3	10	4	12	4	12
5 A	1	8	0	8	0	8
6 B	0	6	0	6	0	6
7 C1	0	6	0	6	0	6
8 C2	0	6	0	6	0	6
9 D1	0	8	0	8	0	6
10 D2	0	6	0	6	0	8
11 E	3	12	3	12	3	12
12 F	3	14	3	12	3	12
13 G	3	12	3	12	3	12
14 H	3	11	2	12	3	12
15 I	3	12	2	12	3	11
16 J	2	10	2	11	2	10
17 K	2	11	2	10	2	9
18 L	2	9	1	10	1	10
19 M1	2	12	2	11	2	11
20 M2	3	12	3	11	3	12
21 N	3	11	3	10	2	11
22 FS-2	2	11	3	12	2	10
23 陰性の対照	0	8	NA	NA	NA	NA
24 ヒスタミン	4	14	NA	NA	NA	NA

10

20

30

40

【0295】

【表4】

表3. イヌの番号は: 2080109

# 抗原	注入1 主観	注入1 客観	注入2 主観	注入2 客観	注入3 主観	注入3 客観	
1 陰性の対照	0	7	NA	NA	NA	NA	
2 ヒスタミン	4	14	NA	NA	NA	NA	
3 Greer	0	8	0	8	0	8	
4 FS-1	4	13	4	13	4	13	
5 A	0	9	0	8	0	8	10
6 B	0	7	0	7	0	7	
7 C1	0	8	0	7	0	7	
8 C2	0	8	0	7	0	8	
9 D1	1	9	1	9	1	9	
10 D2	1	9	1	8	1	8	
11 E	3	11	3	11	2	10	
12 F	3	11	3	13	4	13	
13 G	3	14	3	13	3	13	20
14 H	2	12	2	11	2	10	
15 I	2	10	3	10	3	10	
16 J	2	10	3	10	3	10	
17 K	2	9	2	9	2	9	
18 L	1	9	1	6	1	7	
19 M1	3	11	3	13	3	13	
20 M2	3	14	3	13	3	14	
21 N	3	13	3	14	2	10	
22 FS-2	2	9	1	7	1	8	30
23 陰性の対照	0	6	NA	NA	NA	NA	
24 ヒスタミン	4	16	NA	NA	NA	NA	

【0296】

【表5】

表4. イヌの番号は: 2082128

# 抗原	注入1 主観	注入1 客観	注入2 主観	注入2 客観	注入3 主観	注入3 客観	
1 陰性の対照	0	6	NA	NA	NA	NA	
2 ヒスタミン	4	12	NA	NA	NA	NA	
3 Greer	0	6	0	6	0	6	
4 FS-1	3	12	3	12	3	12	
5 A	0	7	0	7	0	6	10
6 B	0	7	0	7	0	6	
7 C1	0	7	0	6	0	7	
8 C2	0	6	0	7	0	7	
9 D1	0	7	0	7	0	7	
10 D2	0	7	0	7	0	7	
11 E	0	7	0	6	0	7	
12 F	0	6	0	6	0	6	
13 G	1	10	1	9	1	9	20
14 H	2	10	2	10	2	11	
15 I	3	12	3	12	3	11	
16 J	3	12	3	11	3	11	
17 K	3	11	3	12	3	12	
18 L	3	11	3	10	3	11	
19 M1	3	11	3	11	3	12	
20 M2	3	12	3	12	3	12	
21 N	3	12	3	12	3	12	
22 FS-2	3	12	3	11	3	12	30
23 陰性の対照	0	6	NA	NA	NA	NA	
24 ヒスタミン	4	14	NA	NA	NA	NA	

【0297】

【表 6】

表5. イヌの番号は: BFQ2

# 抗原	注入1 主観	注入1 客観	注入2 主観	注入2 客観	注入3 主観	注入3 客観
1 陰性の対照	0	6	NA	NA	NA	NA
2 ヒスタミン	4	12	NA	NA	NA	NA
3 Greer	0	6	0	6	0	6
4 FS-1	1	9	1	9	1	9
5 A	0	7	0	7	0	7
6 B	0	7	0	7	0	7
7 C1	0	7	1	7	1	7
8 C2	0	7	0	7	0	6
9 D1	0	8	1	7	1	8
10 D2	0	7	0	6	1	7
11 E	1	7	0	6	0	6
12 F	1	6	1	7	0	7
13 G	0	8	1	8	1	8
14 H	0	8	0	7	0	7
15 I	1	7	0	7	0	8
16 J	0	7	0	7	0	7
17 K	0	7	0	7	0	6
18 L	0	8	0	7	0	7
19 M1	0	7	0	7	0	7
20 M2	0	7	0	7	1	8
21 N	3	12	3	11	3	11
22 FS-2	3	11	3	11	3	11
23 陰性の対照	0	7	NA	NA	NA	NA
24 ヒスタミン	4	15	NA	NA	NA	NA

10

20

30

【 0 2 9 8 】

【表7】

表6. イヌの番号は: CPO2

# 抗原	注入1 主観	注入1 客観	注入2 主観	注入2 客観	注入3 主観	注入3 客観
1 陰性の対照	0	3	NA	NA	NA	NA
2 ヒスタミン	4	13	NA	NA	NA	NA
3 Greer	0	7	0	7	0	6
4 FS-1	4	12	4	12	4	12
5 A	0	7	0	6	0	6
6 B	0	6	0	7	0	7
7 C1	0	7	0	6	0	7
8 C2	0	6	0	6	0	6
9 D1	0	7	1	7	0	7
10 D2	1	6	0	6	0	5
11 E	0	6	0	6	0	6
12 F	0	6	0	6	2	7
13 G	2	9	2	8	2	8
14 H	4	11	4	12	4	11
15 I	3	12	3	11	3	10
16 J	3	10	3	11	3	10
17 K	2	8	2	8	2	8
18 L	1	8	1	7	1	7
19 M1	3	11	3	11	3	11
20 M2	3	11	4	12	4	12
21 N	4	12	3	10	3	11
22 FS-2	3	11	3	12	3	12
23 陰性の対照	0	6	NA	NA	NA	NA
24 ヒスタミン	4	13	NA	NA	NA	NA

10

20

30

【0299】

【表 8】

表7. イヌの番号は: CQQ2

# 抗原	注入1 主観	注入1 客観	注入2 主観	注入2 客観	注入3 主観	注入3 客観
1 陰性の対照	0	6	NA	NA	NA	NA
2 ヒスタミン	4	13	NA	NA	NA	NA
3 Greer	0	7	0	7	0	7
4 FS-1	2	8	2	8	2	8
5 A	0	6	0	6	0	7
6 B	0	7	0	7	0	6
7 C1	0	7	0	6	0	6
8 C2	0	7	0	7	0	6
9 D1	0	6	0	6	0	6
10 D2	0	6	0	6	0	7
11 E	0	6	0	6	0	6
12 F	0	6	0	7	0	7
13 G	0	7	0	7	0	6
14 H	1	7	1	7	1	7
15 I	2	8	2	9	2	8
16 J	2	8	2	8	2	8
17 K	1	7	1	7	1	7
18 L	1	6	0	6	0	6
19 M1	2	7	2	8	2	8
20 M2	2	8	2	8	2	9
21 N	3	11	3	12	3	11
22 FS-2	3	11	3	11	3	10
23 陰性の対照	0	7	NA	NA	NA	NA
24 ヒスタミン	4	14	NA	NA	NA	NA

対照として、ノミに慣れていない2頭のイヌ(すなわち、ノミに曝されていないイヌ)が、感受性にされたイヌに注射された同じ試料の単回の反復物で試験された。これらのイヌは、WANU及びWBCEとして示されされている。注射後15分での客観的及主観的虫刺傷跡寸法測定を、表8及び9に示す。

【0300】

【表 9】

表8. イヌの番号は: WANU

# 抗原	注入1 主観	注入1 客観	
1 陰性の対照	0	7	
2 ヒスタミン	4	10	
3 Greer	0	6	
4 FS-1	0	6	
5 A	0	7	10
6 B	0	6	
7 C1	0	6	
8 C2	0	6	
9 D1	0	7	
10 D2	0	6	
11 E	0	6	
12 F	0	6	
13 G	0	7	
14 H	0	7	20
15 I	0	7	
16 J	0	7	
17 K	0	6	
18 L	0	7	
19 M1	0	6	
20 M2	0	6	
21 N	1	8	
22 FS-2	1	8	30
23 陰性の対照	NA	NA	
24 ヒスタミン	NA	NA	

【0301】

【表 10】

表9. DOG IDは: WBCE

# 抗原	注入1 主観	注入1 客観
1 陰性の対照	0	6
2 ヒスタミン	4	12
3 Greer	0	7
4 FS-1	0	7
5 A	0	7
6 B	0	7
7 C1	0	7
8 C2	0	7
9 D1	0	7
10 D2	0	6
11 E	0	7
12 F	0	7
13 G	0	8
14 H	0	7
15 I	0	7
16 J	0	7
17 K	0	7
18 L	0	6
19 M1	0	7
20 M2	0	7
21 N	0	7
22 FS-2	0	7
23 陰性の対照	NA	NA
24 ヒスタミン	NA	NA

10

20

30

40

50

試験された6頭の感受性イヌからのそれぞれのノミ唾液抗原に対して得られた平均的な主観的評価が、計算され、図5に要約されている。この結果は、実施例2及び3に記載されたように製造されたノミ唾液産生物は、感受性イヌでの即時過敏応答を誘導することのできる少なくとも1個のアレルギー性タンパク質を含む。特に、FS-1及びFS-2に対応するノミ唾液抗原の混合物の注射は、実質的な虫刺傷形成をもたらした。ノミ唾液タンパク質f s p E、f s p F、f s p G、f s p H、f s p I、f s p J、f s p K、f s p L、f s p M 1、f s p M 2及びf s p Nは、また実質的な虫刺傷形成をもたらした。ノミ唾液タンパク質f s p A、f s p B、f s p C 1、f s p C 2、f s p D 1及びf s p D 2は、試験したイヌに依存して、もしあったとしても、最小のアレルギー応答を示した。f s p Hを含む試料は、他のノミ唾液タンパク質と比較した場合、最大の虫刺傷形成をもたらした。

【0302】

* B . 注射位置での硬化及び紅斑の程度の比較

虫刺傷寸法に加えて、硬化及び紅斑の量についても、それぞれの注射部位で測定した。ノミ唾液抗原の注射により生成した硬化は、6時間及び24時間で主観的評価により測定された。そのような主観的硬化測定は、Kenneth W. Kwochka, D. V.

M.により実施された。更に、それぞれの注射部位での紅斑の量は、Kenneth W. Kwochka, D.V.M.により主観的に評価された。

【0303】

6時間での主観的評価により測定された硬化及び紅斑の量は、以下の感受性イヌでの以下の処方を除いて、感受性イヌ及び対照のイヌのそれぞれで陰性であった。イヌ2082101へのFS-1の投与は、2か所の注射部位での1の平均硬化評価を与えたが、紅斑を与えなかった。イヌ2082101へのfspLの投与は、硬化を与えなかったが、1か所の注射部位で1の紅斑評価を与えた。イヌ2082101へのfspM1の投与は、硬化を与えなかったが、1か所の注射部位で3の紅斑評価を与えた。イヌ2082101へのFS-2の投与は、硬化を与えなかったが、3か所の注射部位で1.33の紅斑評価を与えた。イヌ2082128へのfspHの投与は、硬化を与えなかったが、3か所の注射部位で平均2の紅斑評価を与えた。イヌ2082128へのfspIの投与は、2か所の注射部位で平均1の硬化評価を与え、平均1の紅斑評価を与えた。イヌ2082128へのfspJの投与は、3か所の注射部位で平均1の硬化評価を与え、平均1の紅斑評価を与えた。イヌ2082128へのFS-2の投与は、硬化を与えなかったが、3か所の注射部位で平均2の紅斑評価を与えた。

10

【0304】

イヌBFQ2へのFS-1の投与は、3か所の注射部位で、平均2の硬化評価及び平均2の紅斑評価を与えた。イヌBFQ2へのfspNの投与は、2か所の注射部位で、平均1の硬化評価及び平均2の紅斑評価を与えた。イヌBFQ2へのFS-2の投与は、2か所の注射部位で、平均1の硬化評価及び平均2の紅斑評価を与えた。

20

【0305】

イヌCPO2へのFS-1の投与は、2か所の注射部位で、平均2.5の硬化評価を与えたが、紅斑は与えなかった。イヌCPO2へのfspGの投与は、硬化を与えなかったが、3か所の注射部位で平均2の紅斑評価を与えた。イヌCPO2へのfspHの投与は、硬化を与えなかったが、2か所の注射部位で1の紅斑評価を与えた。イヌCPO2へのFS-2の投与は、硬化を与えなかったが、3か所の注射部位で2の紅斑評価を与えた。

【0306】

試験された6頭の感受性イヌからのそれぞれのノミ唾液抗原で得られた硬化の主観的な平均評価が、計算され、図6に要約されている。試験された6頭の感受性イヌからのそれぞれのノミ唾液抗原で得られた紅斑の主観的な平均評価が、計算され、図7に要約されている。

30

【0307】

ノミに感受性の5頭のイヌ及び2頭の対照のイヌでの24時間の結果の主観的評価により測定された硬化及び紅斑の量は、以下の感受性イヌでの以下の処方を除いて、陰性であった。

【0308】

イヌ2082101へのfspIの投与は、3か所の注射部位で、1の硬化評価及び平均1の紅斑評価を与えた。イヌ2082101へのfspJの投与は、3か所の注射部位で、平均1の硬化評価及び平均1の紅斑評価を与えた。イヌ2082101へのfspM1の投与は、3か所の注射部位で、平均1の硬化評価及び平均3の紅斑評価を与えた。イヌ2082101へのfspNの投与は、3か所の注射部位で、平均1の硬化評価及び平均2の紅斑評価を与えた。イヌ2082101へのFS-2の投与は、3か所の注射部位で、平均3の硬化評価及び平均4の紅斑評価を与えた。

40

【0309】

イヌBFQ2へのFS-1の投与は、3か所の注射部位で、平均1の硬化評価及び平均1の紅斑評価を与えた。イヌBFQ2へのFS-2の投与は、1か所の注射部位で、1の硬化評価及び1の紅斑評価を与えた。

【0310】

イヌCPO2へのFS-1の投与は、1か所の注射部位で、2の硬化評価及び1の紅斑

50

評価を与えた。イヌCPO2へのf s p Iの投与は、3か所の注射部位で、平均1の硬化評価及び平均1の紅斑評価を与えた。イヌCPO2へのFS-2の投与は、3か所の注射部位で、平均1の硬化評価及び平均2の紅斑評価を与えた。

【0311】

イヌCQQ2へのGreer抗原の投与は、硬化を与えなかったが、3か所の注射部位で、平均1の紅斑評価を与えた。イヌCQQ2へのFS-1の投与は、1か所の注射部位で、1の硬化評価及び1の紅斑評価を与えた。イヌCQQ2へのf s p I、f s p J、f s p M1又はf s p M2の投与は、硬化を与えなかったが、3か所の注射部位で、平均1の紅斑評価を与えた。イヌCQQ2へのf s p Nの投与は、1か所の注射部位で、1の硬化評価及び1の紅斑評価を与えた。イヌCQQ2へのFS-2の投与は、3か所の注射部位で、平均1の硬化評価及び平均2の紅斑評価を与えた。

10

【0312】

試験された6頭の感受性イヌからのそれぞれのノミ唾液抗原で得られた硬化の主観的な平均評価が、計算され、図8に要約されている。試験された6頭の感受性イヌからのそれぞれのノミ唾液抗原で得られた紅斑の主観的な平均評価が、計算され、図9に要約されている。

【0313】

この結果は、実施例2及び3に記載のようにして調製したノミ唾液タンパク質処方物の少なくともいくつかは、感受性イヌでの遅延過敏応答を誘導することができる少なくとも1個のアレルギー性タンパク質を含むことを示している。FS-1及びFS-2に対応するノミ唾液タンパク質の混合物の注射は、少なくとも24時間で実質的な硬化と紅斑を誘導した。更に、ノミ唾液タンパク質試料f s p I、f s p J、M1及びf s p Nは、少なくとも24時間で硬化と紅斑を誘導するに十分にアレルギー性であった。ノミ唾液タンパク質試料f s p L及びf s p M2は、24時間で実質的なレベルの硬化を誘導したが、紅斑のレベルは十分ではなかった。

20

【0314】

上記及び図5～9に示された両方の結果は、本発明のノミ唾液タンパク質処方物は、感受性イヌでの過敏応答を誘導するに十分にアレルギー性であること示した。多くの試料が、即時過敏応答及び遅延過敏応答の両方を誘導した。

【実施例9】

【0315】

この実施例は、実施例8に記載されたイヌでの選択された病変から取り出された組織の組織病理学により、実施例2及び3で単離された多くのノミ唾液タンパク質の過敏応答誘導能力を示している。

【0316】

イヌ1頭当たり二つの組織試料が、実施例8に記載したそれぞれの感受性イヌから取り出された。ノミに曝されていないイヌは、生体組織検査法は実施されなかった。組織試料が取り出された選択部位は、下記表10に示されている。生体組織検査は、リドカインの皮下注射の後4mm生体組織検査打ち抜き(punch)で行われた。生体組織検査は、Dr . David M . Getzy , DVM , Diplomate ACVP (American College of Veterinary Pathologists) at the Colorado Veterinary Diagnostic Laboratory (College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences , Colorado State University , Fort Collins , Co) により行われ、かつ理解されている。

40

【0317】

【表 1 1】

表 1 0. 組織病理学

イヌ	抗原	時間	No.	スライド	病変タイプ	等級
101	FS-1	15 min.	1	A	A	1
		6 hr.	2	B	A	2.5
		24 hr.	3	C	A	3
109	FS-1	15 min.	4	D	A	1
		6 hr.	5	E	C	2
		24 hr.	6	F	C	3
128	FS-1	15 min.	7	G	A	1.5
		6 hr.	8	H	C	1.5
		24 hr.	9	I	C	3
CPO2	FS-1	15 min.	10	J	A	1.5
		6 hr.	11	K	C	3
		24 hr.	12	L	C	4
CQQ2	FS-1	15 min.	13	M	A	1.5
		6 hr.	14	N	C	2.5
		24 hr.	15	O	C	2.5
101	fspE	15 min.	16	P	A	1
		6 hr.	17	Q	C	1.5
		24 hr.	18	R	A	1.5
109	fspF	15 min.	19	S	A	1
		6 hr.	20	T	A	1.5
		24 hr.	21	U	A	1.5
128	fspI	15 min.	22	V	A	1
		6 hr.	23	W	C	2.5
		24 hr.	24	X	C	2.5
BFQ2	fspN	15 min.	25	Y	A	1.5
		6 hr.	26	Z	C	2
		24 hr.	27	AA	C	3.5

10

20

30

【 0 3 1 8 】

【表 1 2】

表 1 0. 組織病理学

イヌ	抗原	時間	No.	スライド	病変タイプ	等級
BFQ2	fspO	15 min.	28	BB	A	1
		6 hr.	29	CC	C	3
		24 hr.	30	DD	C	2.5
CPO2	fspH	15 min.	31	EE	A	1.5
		6 hr.	32	FF	C	1.5
		24 hr.	33	GG	A	1.5
CQQ2	fspN	15 min.	34	HH	A	1
		6 hr.	35	II	C	2.5
		24 hr.	36	JJ	C	2.5

10

病変の二つのタイプが、試験した組織試料に見い出された。病変タイプ A は、表面皮膚の脈管周囲方向の中程度の数の肥満細胞を有する穏和な表面皮膚浮腫を示す。脈管内皮は、穏和な反応性肥大を示した。好中球の最小数は、同様にこの領域で注目されていた。病変タイプ C は、好酸球が重篤度を緩和するに穏やかであることを除いて、病変タイプ A で記載されたそれらに類似である病変を示しているが、好中球及び肥満細胞は重篤度において穏和である。

20

【0319】

0 ~ 5 の尺度で、病変は等級 1 から重篤の等級 4 の範囲である。標本のいくつかは、主として肥満細胞性炎症、脈管周囲浸潤、浮腫及び最小数の他の細胞性成分を有していた。他の部分は、肥満細胞及び好中球が少ない好酸球性炎症性浸潤を示した。しかしながら、これらの病変の重篤度は、いくつかの領域で変化しうるものであり、それは表皮内の好酸性膿胞形成及び表面皮膚のコラーゲン生理的組織変性を進行させた。

【0320】

この組織試料は、表面の周囲脈管/周囲付属器官、肥満細胞及び好酸性、皮下皮膚炎の存在を示した。試験されたすべてのスライド標本での病変は、常にアレルギータイプ I の過敏反応を有していた。

30

【実施例 1 0】

【0321】

この実施例は、イヌで実施された皮膚試験によりノミアレルギー応答を皮膚炎に本来感受性である動物にアレルギーを誘導するための、実施例 2 及び 3 に記載されたタンパク質の能力を示している。これらの反応は、ノミアレルギー皮膚炎の診断のための現在の標準、Greer Whole Flea Extract (Greer Laboratories, Inc., Lenoir, NC) を用いて得られた反応に比較された。更に、反応の特異性を決めるために、試験結果は、正常な皮膚を有する対照イヌの母集団及びノミアレルギー皮膚炎以外のかゆみ性皮膚疾患のイヌの母集団から得られた結果と比較された。

40

【0322】

3 群のイヌが、この研究に用いられた：(1) 臨床的徴候、診断時点でノミの存在及び Greer Whole Flea Extract への陽性の即時又は遅延反応により決定された本来的にノミアレルギー皮膚炎の 10 頭のイヌ；(2) 限定されないが、アトピー、食品アレルギー皮膚炎、膿皮症、脂漏症及び他の寄生虫過敏反応を含む非ノミ関連かゆみ性皮膚炎の 10 頭のイヌ；及び(3) 正常皮膚かつ慢性皮膚疾患の病歴をもたない 10 頭のイヌ。これらのイヌは、あらゆる種、年齢又は性のイヌであった。これらは、Ohio State University Veterinary Teaching Hospital, Columbus, Ohio の病院の母集団から集められた。全て

50

のイヌは、この研究に参加するためにオーナーの同意書を持っていた。

【0323】

全ての試験及び主観的評価は、Kenneth W. Kwochka, D.V.M., Diplomate ACVD, (American College of Veterinary Dermatologists), in the Dermatology Examination Room at the Veterinary Teaching Hospital, College of Veterinary Medicine, The Ohio State University, Columbus, Ohioにより行われた。試験された全てのイヌは、左側の胸部の前側腹部で試験された。イヌは、皮膚試験の前に静脈内に直接に投与された標準用量のキシラジンとアトロピンを用いて試験のために沈静化された。グルココルチコイド、抗ヒスタミン、又は他の非ステロイドの抗炎症薬剤は、試験前少なくとも3週間用いられなかった。試験領域は、#40電気バリカンの刃で穏やかに刈られ、注射部位は消えない黒のフェルトマーカーペンでしるしをつけた。22の部位にしるしをつけた。2列の10個の点及び1列の2点。皮内注射は、それぞれのしるしの上と下の両方で全部で44の部位に以下の順序で行われた：

列1：陰性対照 - ヒスタミン - Greer - Greer - ノミ唾液 - ノミ唾液 - A - A - B - B

列2：C1 - C1 - C2 - C2 - D1 - D1 - D2 - D2 - E - E

列3：F - F - G - G - H - H - I - I - J - J

列4：K - K - L - L - M1 - M1 - M2 - M2 - N - N

列5：FS - 2 - FS - 2

列6：陰性対照 - ヒスタミン

それぞれの部位は、滅菌希釈剤 (Neg. cont.)、1/100,000、W/Vヒスタミンホスファート (ヒスタミン)。Greer全ノミ抽出物 (Whole Flea Extract) (Greer)、全ノミ唾液 (ノミ唾液)、又は個々の唾液タンパク質フラクション (fspA、(A); fspB、(B); fspC1、(C1); fspC2、(C2); fspD1、(D1); fspD2、(D2); fspE、(E); fspF、(F); fspG、(G); fspH、(H); fspI、(I); fspJ、(J); fspK、(K); fspL、(L); fspM1、(M1); fspM2、(M2); fspN、(N)及びFS-2 (FS2)の50µlで皮内的に注射された。すべての注射は、陰性対照と同じ滅菌希釈剤で希釈された。

【0324】

皮膚反応は、注射後15分及び24時間に、主観的及び客観的に観察された。オーナーは、24時間観察のためにVeterinary Teaching Hospitalへかれらのイヌを返すことを求められた。主観的評価は、虫刺傷寸法に基づいて0、1+、2+、3+及び4+の尺度で評価された。客観的評価は、ミリメートルで測定された虫刺傷径に基づくものであった。

皮膚反応の比較

A. FADイヌ：

Greerに陽性である10頭のイヌのうち、7頭(70%)は、ノミ唾液(FS)に陽性であった。FSに陰性であった3頭のイヌは、すべて唾液タンパク質に反応しなかった。更に、15分でFSに陰性の3頭のイヌは、24時間ではすべてのものに陰性であった。FSに陽性の7頭のイヌが用いられ、5分の反応を要約したものが、下記の表11に示されている。

【0325】

10

20

30

40

【表 1 3】

表 1 1. 試験抗原に対してFS陽性のイヌ(7頭)の即時(15分)主観的評価

陽性率 (%)	評価 $\geq 2+$	評価 $\geq 3+$
0		I
14	B, I, J, L	B, D1, J, L
29	A, C1, C2, D1	A, C1, C2, K
43	E, F, K	D2, E, F, H, M2
57	D2, H, M2	G, N, FS2
71	G, M1	M1
86	N, FS2	Greer
100	Greer, FS	FS

10

即時反応の重篤度が抗炎症の治療を必要としたので、FS陽性の7頭のイヌのうち4頭が、24時間で評価されることができなかった。FS陽性の残りの3頭は、24時間での要約に用いられ、下記の表12に示されている。

20

【0326】

【表 1 4】

表 1 2. 試験抗原に対してFS陽性のイヌ(3頭)の遅延(24時間)主観的評価

陽性率 (%)	評価 $\geq 2+$	評価 $\geq 3+$
0		
33	M2	
67	Greer, FS, N, FS2	FS, N, FS2
100		

30

B. 正常なイヌ

3頭のイヌが、皮膚試験抗原への即時反応をある程度有していた。24時間の遅延反応に陽性であるイヌはいなかった。即時(15分)の主観的結果の要約は、下記の表13に示されている。

40

【0327】

【表 15】

表 13. 試験抗原に対して正常のイヌ (10頭) の即時 (15分) 主観的評価

陽性率 (%)	評価 $\geq 2+$	評価 $\geq 3+$
0		
10	N, FS2	FS2
20	Greer, FS	Greer, FS
30		
40		
50		
60		
70		
80		
90		
100		

10

20

それぞれのイヌのコメント：

イヌ # 1 : Greer 3+、FS 3+、N 2+、FS2 4+

イヌ # 2 : Greer 3+

イヌ # 3 : FS 3+

C. 非FADかゆみ症のイヌ

6頭のイヌが、皮膚試験抗原への即時反応をある程度有していた。即時 (15分) の主観的結果の要約は、下記の表 14 に示されている。 30

【0328】

【表 1 6】

表 1 4. 試験抗原に対して非FADかゆみ性のイヌ (10頭) の即時 (15分) 主観的評価

陽性率 (%)	評価 $\geq 2+$	評価 $\geq 3+$
0		
10	G, O	G, O
20	Greer, M1	Greer, FS, M1, M2
30	FS, M2, N	N
40		
50		
60		
70		
80		
90		
100		

10

20

それぞれのイヌのコメント :

イヌ # 1 : FS 2+, M1 3+, M2 3+, N 3+, FS 2 3+

長時間ノミに暴露されたアトピー性イヌ

イヌ # 2 : FS 4+, G 4+, M1 4+, M2 3+, N 3+

長時間ノミに暴露されたアトピー性イヌ

イヌ # 3 : FS 4+, M2 2+

長時間ノミに暴露されたアトピー性イヌ

イヌ # 4 : N 3+

長時間ノミに暴露されたアトピー性イヌ

イヌ # 5 : Greer 4+

慢性外耳炎

イヌ # 6 : Greer 4+

一般的なダニ (ダニ症)

イヌ # 1、# 2 及び # 3 はすべてその後クリニックへ返され、FADであると診断され、Greerに陽性であった。

【0329】

3頭のイヌが、皮膚試験抗原への即時反応をある程度有していた。遅延 (24時間) の主観的結果の要約は、下記の表 1 5 に示されている。

30

40

【0330】

【表 17】

表 15. 試験抗原に対して非FADかゆみ性のイヌ(10頭)の
遅延(24時間)主観的評価

陽性率 (%)	評価 $\geq 2+$	評価 $\geq 3+$
0		
10	FS, N, FS2	Greer, FS, N, FS2
20		
30	Greer	
40		
50		
60		
70		
80		
90		
100		

10

20

それぞれのイヌのコメント：

イヌ#3：Greer 2+

長時間ノミに暴露されたアトピー性イヌ

イヌ#4：Greer 2+

長時間ノミに暴露されたアトピー性イヌ

イヌ#6：Greer 3+、FS 3+、N 3+、FS2 3+

一般的なダニ(ダニ症)

30

陽性の皮膚試験結果での最良のものに関連するノミ唾液のフラクションを決定するために、人工的に感受性にさせたイヌ及び臨床的に診断されたFADイヌ(これらは、FSに対して2+又はそれ以上である)(全部で12頭；5頭が人工的に感受性にされ、7頭は臨床的にFAD陽性と診断された)の全てのデータは、試験抗原への応答に従い、表示された。即時(15分)主観的結果は下記の表16に、遅延(24時間)主観的結果は、下記表17に示されている。

【0331】

【表 18】

表16.

応答率(%)
(15分の主観的評価)

抗原	人工的に感作された (5)		臨床的診断 (7)		組合せ (12)	
	評価 ≥2+	評価 ≥3+	評価 ≥2+	評価 ≥3+	評価 ≥2+	評価 ≥3+
Greer	20	20	100	86	67	58
FS	100	80	100	100	100	92
A	0	0	29	29	17	17
B	0	0	14	14	8	8
C	0	0	29	29	17	17
D1	0	0	29	14	17	8
D2	0	0	57	43	33	25
E	40	20	43	43	42	33
F	40	40	43	43	42	42
G	60	40	71	57	67	50
H	80	20	57	43	67	33
I	100	40	14	0	50	17
J	100	40	14	14	50	25
K	80	20	43	29	58	25
L	20	20	14	14	17	17
M1	100	60	71	71	83	67
M2	100	80	57	43	75	58
N	100	60	86	57	92	58
FS2	80	60	86	57	83	58

10

20

【0332】

【表 19】

表17.

応答率(%)
(24時間の主観的評価)

抗原	人工的に感作された (5)		臨床的診断 (7)		組合せ (12)	
	評価 ≥2+	評価 ≥3+	評価 ≥2+	評価 ≥3+	評価 ≥2+	評価 ≥3+
Greer	0	0	67	0	25	0
FS	0	0	67	67	25	25
A	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0
D1	0	0	0	0	0	0
D2	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0
I	0	0	0	0	0	0
J	0	0	0	0	0	0
K	0	0	0	0	0	0
L	0	0	0	0	0	0
M1	20	0	0	0	13	0
M2	0	0	33	0	13	0
N	20	0	67	67	38	25
FS2	60	20	67	67	63	38

30

40

これらの研究の結果は、ほとんどの実質的応答が、フラクシオン f s p G、f s p H、f s p M1、f s p M2 及び f s p N から得られることを示している。

【実施例 11】

【0333】

以下の実施例は、バクテリア及び昆虫細胞中での f s p I タンパク質の発現を示してい

50

る。

A. E. coli 中でのノミタンパク質 f s p I の発現

f s p I の 500 bp DNA 断片は、核酸分子 n f s p ₅₉₁ から、プライマー 11、核酸配列、5' ATTCGGATCC ATGGAAAGTTAATAAATAATGTA C 3' (下線部分は、BamHI 部位である) を有するセンスプライマーを用いて、PCR 増幅され、配列番号 36 と表示され; プライマー 12、核酸配列、5' TAAATGGATCCTTATTTT TGGTCGACAATAAC 3' を有するアンチセンスを用いて、PCR 増幅され、配列番号 37 と表示された。PCR 生成物、約 535 ヌクレオチドの断片、n f s p I ₅₃₅ と名付けられたものは、BamHI 制限エンドヌクレアーゼで消化され、ゲル精製され、次いで BamHI で消化され CIP 処理され組み換え分子 p His - n f s p I ₅₃₅ を生成させる発現ベクター p Trc His B (Invitrogen Corp. から入手しうる) ヘサブクローン化された。

【0334】

この組み換え分子は、組み換え細胞 E. coli HB: p His - n f s p I ₅₃₅ 及び E. coli BL: p His - n f s p I ₅₃₅ を形成するように、HB101 (BRL, Gaithersburg, MD から入手しうる) 及び BL21 (Novagen, Madison, WI から入手しうる) 成分細胞の両方へ形質転換された。この組み換え細胞は、0.1 mg/ml アンピシリン及び 0.1% グルコースを含む富化バクテリア成長培地中 32 で培養された。細胞が、約 0.4 - 0.5 の OD₆₀₀ に達したとき、発現はイソプロピル B - D - チオガラクトシド (IPTG) 0.5 mM の添加により誘導され、細胞は 32 で 2 時間培養された。

【0335】

融合タンパク質 PHIS - P f s p I ₁₅₅ を含む組み換え細胞溶解物の、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウエスタンイムノブロット分析は、T7 Tag モノクロナール抗体 (Invitrogen Corp. から入手しうる) 又はウサギ抗 FAD 抗血清 (#A3381) (実施例 2 に記載されたように製造されたノミ唾液を含むニトロセルロース膜でウサギを免疫することにより、Paravax, Inc. in Fort Collins, Co, により製造された) のどちらかを用いて、標準手法により達成された。抗原/抗体反応は、アルカリホスファターゼ抱合抗マウス又は抗ウサギ抗体を用いて比色酵素反応により検出された。28 kD タンパク質は、両方の第一の抗体と共に誘導された溶解物のイムノブロットで検出された。

【0336】

B. 昆虫細胞中でのノミ唾液タンパク質 f s p I の発現

核酸分子 n f s p I ₄₇₅ は、以下のプライマー (それは、バキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞中で容易に発現するように設計されている) を用いて f s p I 核酸分子から PCR 増幅された: センスプライマー 13 (下線部分は BamHI 部位) は、5' C G C GGA TCC TAT AAA TAT GCG GGA CAT CTG G AA AGT TAA TAA AAA ATG TAC ATC 3' であり、配列番号 44 と表示され; アンチセンスプライマー (下線部分は XbaI 部位である)、5' GCT CTA GAG CAT TTA TTT TTT GGT CGA CAA T AA CAA AAC 3' であり、配列番号 45 と表示された。PCR 生成物は、BamHI 及び XbaI で消化され、約 475 bp DNA 断片は、切り取られ、アガロースゲルから精製された。

【0337】

核酸分子 n f s p I ₄₇₅ は、BamHI 及び XbaI で消化された pVL1393 ベクター (Invitrogen Corp. から入手しうる) に結合され、組み換え分子 pVL - n f s p I ₄₇₅ を生成させた。

【0338】

この組み換え分子は、組み換え細胞 S. frugiperda: pVL - n f s p I ₄₇₅ を形成させるために、直線形にされたバキュロウイルス DNA を有する S. frugiperda

iperda Sf9へ形質転換された。この組み換え細胞は、組み換えウイルスを製造するために、標準手法で培養された。このトランスフェクション上清は、ウエスタンブロット分析により、また23kDタンパク質（それは、ウサギ抗FAD抗血清（#A3381）と反応する）を含むことが見いだされた。

【実施例12】

【0339】

この実施例は、fspN中のノミ唾液タンパク質の少なくとも部分をコードする核酸配列の単離、及びヒトプロスタチン酸（prostatic acid）ホスファターゼに関連する特性を記載している。

【0340】

実施例6Aに既に記載されたノミ唾液腺及び全摂餌ノミcDNAライブラリーは、ノミ唾液タンパク質の集められた混合物に対して開発された新しいニュージーランド白ウサギ抗血清（例えば、このウサギは、1回以上ノミ唾液タンパク質を集めるための収集膜として用いられるニトロセルロースの粉碎物で1回以上免疫され、次いでデュロポアフィルターから溶離されたノミ唾液タンパク質抽出物で1回以上免疫されている）を用いて、イムノスクリーニングされた。用いられたこのイムノスクリーニングプロトコルは、ピコブルー（登録商標）イムノスクリーニングキットの指示マニュアル（Stratagene, Inc. から入手しうる）に記載されているものである。イムノスクリーニングのためのcDNA発現ライブラリー、すなわちcDNAクローンの発現及びイムノスクリーニングのための膜へのラムダファージプラークを移行させるための方法は、ZAP-cDNA合成キットの指示マニュアル（Stratagene, Inc., La Jolla, Californiaから入手しうる）に記載されている。

【0341】

40の免疫陽性のクローンが、スクリーニングから選択された。一つの免疫陽性のクローンは、唾液腺cDNAライブラリーから誘導され、他の39の免疫陽性のクローンは、全摂餌ノミcDNAライブラリーから誘導された。初めのfspNタンパク質cDNA配列（nfspN(A)及びnfspN(B)と名づけられている）は、全摂餌ノミcDNAライブラリーから単離され、その初めのイムノスクリーニングから来ている。

【0342】

nfspN(A)及びnfspN(B)の部分核酸配列は、SEQ ID 番号で表される。それぞれの配列は、cDNA遺伝子コード領域のカルボキシル末端のほぼ半分、及びポリ(A)領域に至る3'非翻訳領域を表す。nfspN(A)₆₄₆と名づけられているnfspN(A)核酸分子のヌクレオチド配列は、配列番号50と表示されている。配列番号50の翻訳は、配列番号51と表示されるアミノ酸配列を有するPfspN(A)₁₇₂と名づけられたタンパク質を与える。nfspN(B)₆₁₂と名づけられているnfspN(B)核酸分子のヌクレオチド配列は、配列番号52と表示されている。配列番号52の翻訳は、配列番号53と表示されるアミノ酸配列を有するPfspN(B)₁₅₃と名づけられたタンパク質を与える。

【0343】

更に、PfspN(A)₅₆と名づけられ、配列番号54と表示される、nfspN(A)の核酸配列から演繹された見かけのN末端アミノ酸配列が、決定された。PfspN(A)₅₆（すなわち、（配列番号54）のアミノ酸配列は、fspN1（配列番号11）、fspN2（配列番号12）及びfspN3（配列番号13）のために得られたN末端アミノ酸配列と類似であるが、同一ではない。理論によって拘束されているわけではないが、ノミ唾液に見いだされているfspNファミリー（それはアレルギー性変異又はノミゲノムでの多重遺伝子のためでありうる）が存在していると思われる。

【0344】

核酸分子nfspN(A)₆₄₆及びnfspN(B)₆₁₂は、約76%同一であり、翻訳生成物は、約65%同一である。

実施例4に記載されたノミ唾液抽出物（すなわち、fspNタンパク質）のHPLC分

10

20

30

40

50

離物のピークNのタンパク質で免疫されたウサギから集められた抗血清が、ノミ唾液腺 cDNAライブラリー（実施例6に記載のようにして調製された）をプローブするために用いられた第二のイムノスクリーニング試験において、約20の陽性クローンが単離された。回収された核酸分子の一つの核酸配列は、n f s p N (A) の配列と同一であるように見える。他の核酸分子の少なくとも二つは、ノミ唾液の f s p N タンパク質のファミリーの可能性を再度支持して、n f s p N (A) のそれに類似であるが、同一ではない核酸配列を有する。更に、他の核酸分子は、ミオシン遺伝子配列に類似である核酸配列を持っているように見える。

【0345】

f s p N (A) 及び f s p N (B) 核酸分子及びタンパク質の核酸及びアミノ酸配列は、それぞれ、既知の核酸及びアミノ酸配列に、Genbank homology searchを用いて比較された。両方の核酸配列は、ヒトのプロスタン酸ホスファターゼの核酸配列の相当する（すなわち、カルボキシル末端）領域に類似であることが見い出された。ヒトのアミノ酸配列の連続する類似点の最も高度に保存された領域は、ヒトの酵素のアミノ酸約272から約333に広がっている。n f s p N (A) と n f s p N (B) の核酸配列の相当する領域を有するヒト酵素の約268から約333のアミノ酸をコードする核酸配列の比較は、ヒトのプロスタン酸ホスファターゼ遺伝子の領域に、n f s p N (A) 核酸は、約40%同一であり、n f s p N (B) は約43%同一であることを示している。ヒトの酵素の約268から約333のアミノ酸に広がる領域と p f s p N (A) と p f s p N (B) の相当する領域の比較は、ヒトのプロスタン酸ホスファターゼ遺伝子の領域に、n f s p N (A) 核酸は、約28%同一であり、n f s p N (B) は約30%同一であることを示している。少なくともいくつかの f s p N タンパク質が、活性酸ホスファターゼをコードする可能性は、ノミ唾液抽出物 F S - 3 が実施例3に記載されたように活性酸ホスファターゼを有することが示されていることを見い出したことにより支持されている。

【0346】

n f s p N (A)₁₁₉₇ と本明細書で示されている核酸分子 n f s p N (A) の見かけの完全な核酸配列は、配列番号55として本明細書に表示されている。配列番号55の翻訳は、ここで配列番号56として本明細書に表示されたアミノ酸配列を有する p f s p N (A)₃₉₈ と名づけられている見かけの完全長の f s p N タンパク質を与える。（核酸配列番号55及びアミノ酸配列番号56は、相当する領域で核酸配列番号50又はアミノ酸配列番号51若しくは配列番号54に正確に匹敵しないので、配列番号50、配列番号51及び配列番号54の配列エラーのために不適合がありそうであることに注意すべきである）。

【0347】

配列番号56と、f s p N 1（配列番号11）、f s p N 2（配列番号12）及び f s p N 3（配列番号13）のために得られたN末端アミノ酸配列との比較は、f s p N 1 及び f s p N 2 のアミノ末端アミノ酸が、配列番号56の18位のアミノ酸に相当するが、f s p N 3 のアミノ末端アミノ酸は配列番号56の20位のアミノ酸に相当することを示している。配列番号13は、20から39までの位置に広がるアミノ酸の配列番号56の領域に同一であるように見え、n f s p N (A) が f s p N 3 をコードすることを示唆している。配列番号11は、配列番号56の相当する領域に約67%同一であり、配列番号12は、配列番号56の相当する領域に（配列番号12の3個の未知のアミノ酸を除いて）約60%同一であり、f s p N 1 及び f s p N 2 が、f s p N 3 として同じノミ唾液タンパク質ファミリーの一員であることの示唆を支持している。

【0348】

配列番号56と、ヒトのプロスタン酸ホスファターゼのアミノ酸配列との比較は、二つの配列がアミノ酸レベルで約30%同一を共有していることを示している。

【実施例13】

【0349】

この実施例は、f s p Nタンパク質を含むバクテリア組み換え細胞及びf s p Nタンパク質を製造するその細胞の用途を示している。

n f s p N₁₀₀₀と名づけられた約1000bp DNA断片は、以下のプライマーを用いてf s p Nタンパク質をコードする核酸分子からPCR増幅された：F7センス、核酸配列，5' G G C G T C T C G A G A G A A T T G A A A T T T G T G T T T G C G 3' (X h o I部位は下線部分)、配列番号46と表示されている、及びF7アンチセンス、核酸配列，5' A G A C G A G A A T T C C A A T T T A T C A T G A G C G G 3' (E c o R I部位は下線部分)、配列番号47と表示されている。PCR生成物は、X h o I及びE c o R I制限エンドヌクレアーゼで消化され、ゲル精製され、X h o I及びE c o R Iで消化され、組み換え分子p H i s - n f s p N₁₀₀₀を形成する発現ベクターp T r c H i s B (I n V i t r o g e n , C o r pから入手しうる)へサブクローン化された。この組み換え体分子は、E . c o l i B L 2 1能力細胞(N o v a g e nから入手しうる)へ形質転換され、組み換え細胞E . c o l i : p H i s - n f s p N₁₀₀₀を形成した。

【0350】

組み換え細胞E . c o l i : p H i s - n f s p N₁₀₀₀は、培養され、実施例11Aに記載されたように融合タンパク質p H i s - P f s p N 3を形成するように誘導された。この組み換え融合タンパク質は、実施例11Aに記載されたようにT7標識モノクローナル抗体を用いて、イムノブロット分析により検出された。p H i s - P f s p N 3はN i - N T Aスピキット(Q i a g e n n , C h a t s w o r t h , C Aから入手しうる)を用いて、N i精製され、この精製は上記のようにT7標識モノクローナル抗体を用いて証明された。

【実施例14】

【0351】

この実施例は、昆虫細胞中でのf s p Nタンパク質の発現を示している。バキュロウイルスポリヘドリン転写制御配列に作動可能に連結しているn f s p N₁₀₀₀核酸分子を含む組み換え分子p V L - n f s p N₁₀₀₀は、以下の方法で製造された。n f s p N₁₀₀₀と名づけられた約1000bp DNA断片が、以下のプライマーを用いてf s p Nタンパク質をコードする核酸分子からPCR増幅された：センスプライマー17、核酸配列，5' C C G G A A T T C C G G T A T A A A T A T G T G G C G T C T A C T G 3' (E c o R I部位は下線部分)を有し、配列番号48と表示され、昆虫細胞中での発現を増強するように設計されている、及びアンチセンスプライマー18、核酸配列，5' C C G G A A T T C T T A A G A C G A T T T A C A C A A T T T A T C 3' (E c o R I部位は下線部分)を有し、配列番号49と表示されている。PCR生成物は、E c o R Iで消化され、非方向的にバキュロウイルスシャトルベクターp V L 1 3 9 3 (I n V i t r o g e n , C o r pから入手しうる)へクローン化された。配向は、酵素E c o R Vでの制限消化により決定された。得られた組み換え分子、すなわちp V L - n f s p N₁₀₀₀は、組み換え体細胞S . f r u g i p e r d a : p V L - n f s p N₁₀₀₀を製造するために、野生型線状バキュロウイルスDNA (A c M N P V)及びインセクチン(i n s e c t i n)カチオン性リポソームで、製造者の仕様書(I n V i t r o g e n , C o r pから入手しうる)に従い、S . f r u g i p e r d a細胞(C o l o r a d o B i o p r o c e s s i n g C e n t e r , F o r t C o l l i n s , C oにより提供された)へ同時トランスフェクションされた。この上清が、トランスフェクションの5日後にノミf s p Nタンパク質(実施例12に記載されている; B 2 2 3 7と表示される)に対するウサギ抗血清を用いるウエスタンブロット分析により試験され、約40kDのタンパク質が検出された。組み換えウイルス、v B V - n f s p N₁₀₀₀が、上清及び精製されたプラークから回収された。

【実施例15】

【0352】

この実施例は、ノミ又はノミ唾液に感受性にされたイヌの血清中の抗ノミ唾液I g Eを

検出するためのELISAの用途を記載している。

A. 第一の研究において、人工的にノミ刺傷に感受性にされた3頭のイヌから集めた血清が、プールされ、そのプールされた血清を、この血清に存在している非IgE免疫グロブリンを除くために、タンパク質Gに接触させて前処理された。IgE抗体は、次いでCon-A クロマトグラフィーを用いて前処理された血清からアフィニティ-精製された。

【0353】

このアフィニティ-精製されたIgE抗体は、以下のノミ唾液産生物及びタンパク質に曝された：2mg/mlのFS-1唾液抽出物(23,300ノミ時間/μl)；fspA、fspB、fspC1、fspC2、fspD1、fspD2、fspE、fspF、fspG、fspH、fspI、fspJ、fspK、fspL、fspM1、fspM2及びfspN(実施例3に記載されているように23,300ノミ時間/μlの試料をHPLCクロマトグラフィーに付した)。ノミ唾液産生物及びタンパク質は、0.1M炭酸ナトリウム、pH9.6に懸濁し、それぞれの100μl試料は、マイクロタイター皿のウエルに置かれた。この試料は、一晚室温で温置され、PBS/ツウイーンで5回洗浄され、PBS、2%BSA、0.02%NaN₃の溶液で1時間、37℃で保護し、PBS/ツウイーンで5回洗浄された。この洗浄されたウエルは、それぞれアフィニティ-精製されたイヌのIgE抗体の100μlのアリコートに37℃で1時間曝された。このウエルは、PBS/ツウイーンで5回洗浄され、PBS、2%BSA、0.05%トリトンX-100中で1:000に希釈されたモノクロナールマウス抗イヌIgE抗体調製物100μlに37℃で1時間曝された。このウエルは、PBS/ツウイーンで5回洗浄され、100μlのロバ抗マウスIgG(H+L)-HRPに37℃で1時間曝され、PBS/ツウイーンで5回洗浄された。このウエルは、100μlのKPL TMB:H₂O₂、1:1で10分間展開し、反応は、2.5N硫酸水素塩50μlで停止された。このウエルは、450nmで測定された。

【0354】

表18及び図10に示されたこの結果は、FAD+イヌは、それらの血清中に、FS-1ノミ唾液抽出物ならびにノミ唾液タンパク質、fspE、fspF、fspG、fspH、fspI、fspJ、fspK、fspL、fspM1、fspM2及びfspNに感受性であり、かつ特異的方法で反応するIgE抗体を持つことを示している。このIgE抗体調製物は、反応するならば、ノミ唾液タンパク質、fspA、fspB、fspC1、fspC2、fspD1及びfspD2と、最小量で反応した。したがって、このIgEの反応性は、同じノミ唾液生成物及びタンパク質での人工的に感受性にさせたイヌでの実施例8の皮膚試験に正確に一致した。

【0355】

【表 2 0】

表18.

フラクション	抗原の容量			
	0.5 μ l	0.25 μ l	0.125 μ l	0.063 μ l
A	0.007	0.008	0.012	0.018
B	0.016	0.010	0.013	0.052
C1	0.035	0.008	0.035	0.020
C2	0.022	0.009	0.002	0.005
D1	0.013	0.025	0.004	0.005
D2	0.059	0.018	0.017	0.012
E	0.214	0.263	0.206	0.092
F	0.276	0.393	0.217	0.114
G	0.288	0.217	-0.010	-0.010
H	0.503	0.336	0.203	0.062
I	1.076	0.997	0.917	0.637
J	0.955	0.816	0.673	0.456
K	1.095	0.898	0.815	0.690
L	0.991	0.721	0.485	0.162
M1	1.251	1.190	0.840	0.454
M2	1.561	1.105	0.902	0.558
N	1.989	1.887	1.819	1.435
FS-1	1.367	1.246	0.982	0.604
なし	0.002	0.005	0.008	0.121

10

20

30

B. 第二の研究において、人工的にノミ刺傷に感受性にされたイヌから集められた血清は、この血清に存在している非 I g E 免疫グロブリンの少なくともいくつかを除くために、タンパク質 G に接触させて前処理された。前処理された血清の FS - 1 ノミ唾液抽出物への反応性は、実施例 15 A に記載のようにして決定された。また、イヌ糸状虫に感染させたイヌから集められ、プールされ、タンパク質 G に接触させて前処理された血清の、FS - 1 ノミ唾液抽出物への反応性が試験された。表 19 並びに図 11 A 及び 11 B に示された結果は、FAD + イヌからの I g E の反応性は用量依存性であるが、イヌ糸状虫に感染させたイヌからの I g E は、FS - 1 ノミ唾液抽出物に対して反応性を持たないことを示している。

40

【0356】

【表 2 1】

表19.

希釈血清								
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	なし
イヌ 2082128								
2 µg	1.67	1.20	0.85	0.57	0.34	0.19	0.11	0.01
1 µg	1.43	1.16	0.80	0.49	0.30	0.17	0.10	0.00
0.5 µg	1.32	1.02	0.71	0.46	0.28	0.14	0.08	0.00
0.25 µg	1.18	0.92	0.59	0.38	0.22	0.12	0.06	0.00
0.13 µg	0.95	0.80	0.52	0.30	0.19	0.11	0.06	0.00
なし	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
イヌ糸状虫集団								
2 µg	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1 µg	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5 µg	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25 µg	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.13 µg	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
なし	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00

10

20

【実施例 16】

【0357】

この実施例は、ノミ唾液抽出物 FS-1、E. coli 産生 fspH、E. coli 産生 fspN3 又は昆虫細胞 S. frugiperda 産生 fspN3 を含む処方物を含む、本発明の処方物の、ノミアレルギー皮膚炎に感受性動物を同定する能力（すなわち、ノミアレルギー皮膚炎感受性動物へ、ノミアレルギー皮膚炎を誘導すること）を記載している。

30

【0358】

処方物は、以下のようにして製造された。FS-1 は、実施例 2 に記載されたようにして製造された。E. coli 産生 fspH は、発現ベクター $P_R / T^2 ori / S10 HIS - RSET - A9$ に作動可能に連結されている fspH をコードする核酸分子で形質転換された E. coli 細胞により産生され、その産生は、PCT/US95/02941 の実施例 7 に記載されている；得られた PHIS-fspH 融合タンパク質は、実施例 13 に記載のように精製された。E. coli 産生 fspN3 及び S. frugiperda 産生 fspN3 は、それぞれ実施例 13 及び 14 に記載のようにして産生され；E. coli 産生 fspN3 は実施例 11A に記載のように精製され；S. frugiperda 産生 fspN3 は、アニオン/カチオン交換クロマトグラフィーにより精製された。

40

【0359】

この処方物は、実施例 8 に記載したように、人工的に感受性にされたイヌ 2080109、2082101、2082128、BFQ2、CPO2、CQQ2 で試験された。注射試料は、以下のものであった：(a) 食塩水陰性対照；(b) ヒスタミン陽性対照；(c) 2 µg FS-1；(d) 0.1 µg E. coli 産生 fspH；(e) 1.0 µg E. coli 産生 fspH；(f) 0.2 µg E. coli 産生 fspN3；(g) 2.0 µg E. coli 産生 fspN3；(h) 0.2 µg S. frugiperda 産生 fspN3；(i) 2.0 µg S. frugiperda 産生 fspN3。この即時過敏性の

50

結果は、表 20 に示されており、遅延過敏結果は、表 21 に示されている。評価は、実施例 8 に記載されたようであった；NA は、悪い注射を示している。

【0360】

【表 22】

表 20.

a) 即時 (15分) 主観的評価 (1-4+) (NAは悪い注射)

イヌ	食塩水	ヒスタミン	FS-1	E. coli FS-H		E. coli fspN3		S. frugiperda fspN3	
				0.1	1.0	0.2	2.0	0.2	2.0
109	0	4	4	NA	4	1	1	1	1
101	0	4	4	4	4	1	2	0	1
128	0	4	4	2	4	1	2	1	3
BFO2	0	4	3	0	3	0	0	0	2
CPO2	0	4	4	4	4	1	4	1	2
COQ2	0	4	4	4	4	0	0	0	2

10

【0361】

【表 23】

表 21.

b) 遅延 (24時間) 主観的評価 (1-4+) (NAは悪い注射)

イヌ	食塩水	ヒスタミン	FS-1	E. coli FS-H		E. coli fspN3		S. frugiperda fspN3	
				0.1	1.0	0.2	2.0	0.2	2.0
109	0	0	0	NA	0	0	0	0	0
101	0	0	3	0	2	2	3	2	3
128	0	0	3	0	2	2	2	2	3
BFO2	0	0	1	0	0	0	0	0	0
CPO2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
COQ2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

30

要約すれば、これらの結果は、E. Coli 産生 f s p H は、すべてのイヌで強い陽性の即時反応を示し、その反応は、ノミ唾液に対するイヌの反応に比例していることを示している。E. Coli 産生及び S. frugiperda 産生 f s p N 3 タンパク質は、またそれぞれ 4 頭及びすべてのイヌで陽性の即時反応を示した。FS-1 に対して強い遅延過敏応答を示した 2 頭のイヌは、組み換えで産生された f s p H 及び f s p N 3 に対して類似の遅延過敏応答を示した。

【0362】

本発明の様々な実施態様を詳細に説明したが、これらの実施態様に対する変更および適応が当業者に生じるであろうことは明白である。しかし、そのような変更及び適応は、本発明の、下記の請求の範囲に記述されたとおりの対象範囲内にあることを明白に理解しなければならない。

40

【図面の簡単な説明】

【0363】

【図 1 A】還元 16% Tris - グリシン SDS - PAGE によるノミ唾液タンパク質の分析を示す。

【図 1 B】還元 16% Tris - グリシン SDS - PAGE によるノミ唾液タンパク質、FS-1 及び FS-2 の分析を示す。

50

【図1C】還元16% Tris - グリシン SDS - PAGEによる f s p Nの分析を示す。

【図2】高速液体クロマトグラフィーを用いるノミ唾液タンパク質の分析を示す。

【図3】エンドプロテイナーゼ Asp - Nで消化した f s p Hタンパク質のタンパク分解性フラグメントの逆相HPLC分析によって得られたピークを示す。

【図4A】本発明のノミ唾液収集装置の断面を示す。

【図4B】本発明のノミ唾液収集装置の吹き出し口 (b l o w - o u t) を示す。

【図5】ノミ感受性にされたイヌへの種々のノミ唾液タンパク質処方物の注射の15分後に生成された膨疹の相対的なサイズを示す。

【図6】ノミ感受性にされたイヌへの種々のノミ唾液タンパク質処方物の注射の6時間後の膨疹の相対的硬化を示す。

【図7】ノミ感受性にされたイヌへの種々のノミ唾液タンパク質処方物の注射の6時間後の膨疹の相対的紅斑を示す。

【図8】ノミ感受性にされたイヌへの種々のノミ唾液タンパク質処方物の注射の24時間後の膨疹の相対的硬化を示す。

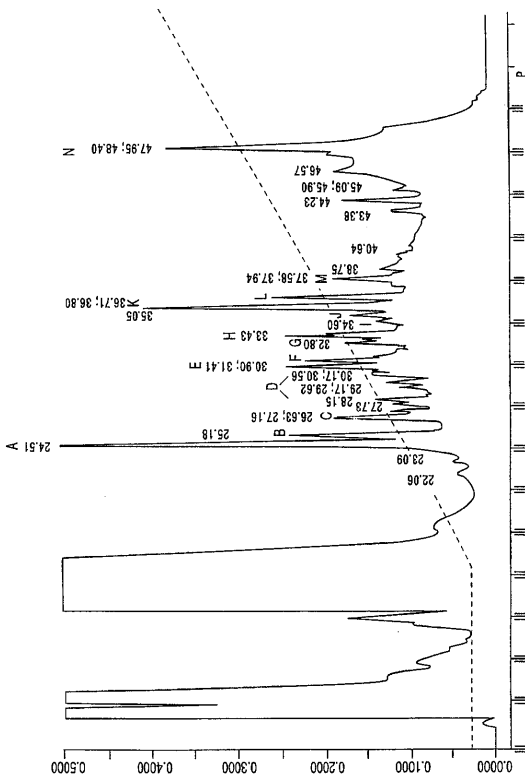
【図9】ノミ感受性にされたイヌへの種々のノミ唾液タンパク質処方物の注射の24時間後の膨疹の相対的紅斑を示す。

【図10】ノミ感受性にされたイヌの血清中の抗ノミ唾液 I g E 抗体を測定した E L I S A の結果を示す。

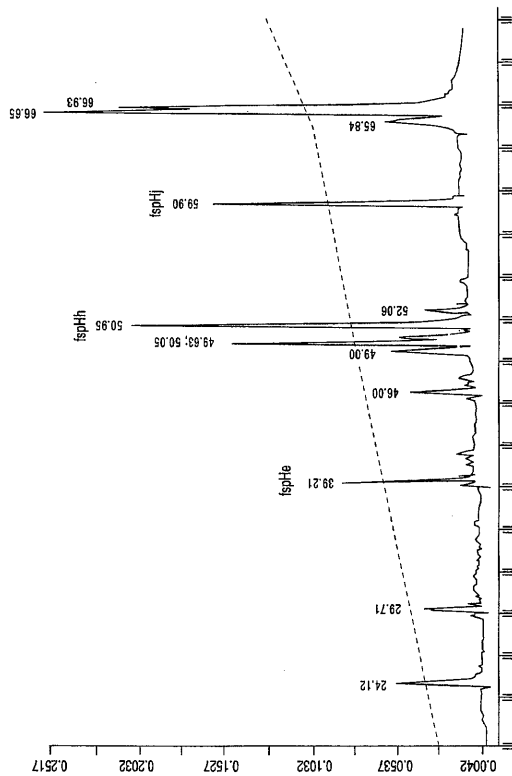
【図11A】ノミ感受性にされたイヌの血清中の抗ノミ唾液 I g E 抗体及びそれらを持たない心糸状虫が感染したイヌを測定した E L I S A の結果を示す。

【図11B】ノミ感受性にされたイヌの血清中の抗ノミ唾液 I g E 抗体及びそれらを持たない心糸状虫が感染したイヌを測定した E L I S A の結果を示す。

【図2】



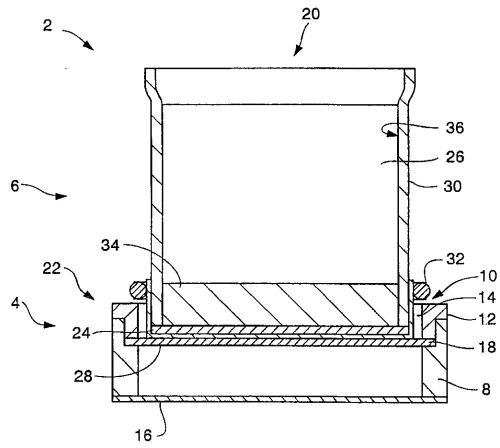
【図3】



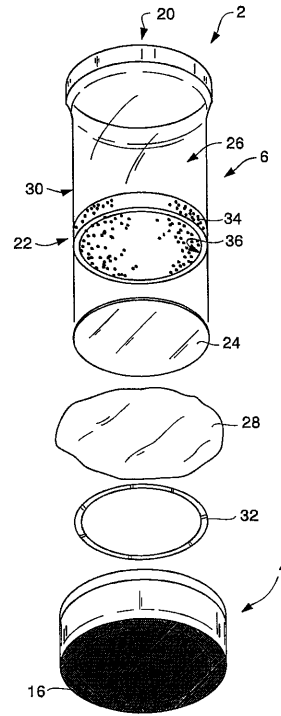
10

20

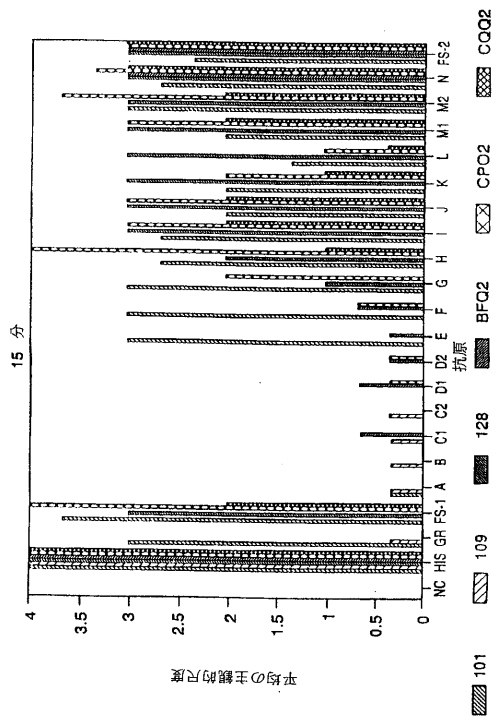
【 図 4 A 】



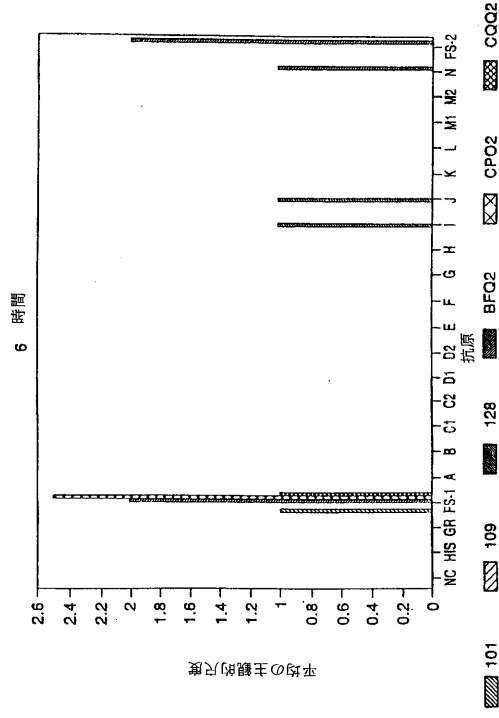
【 図 4 B 】



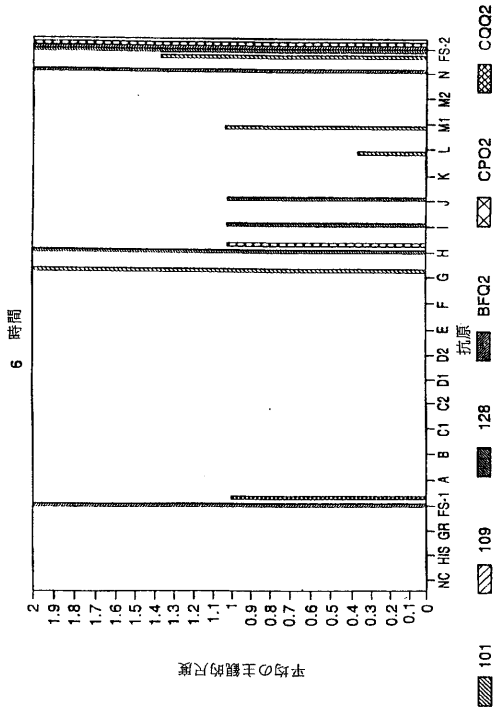
【 図 5 】



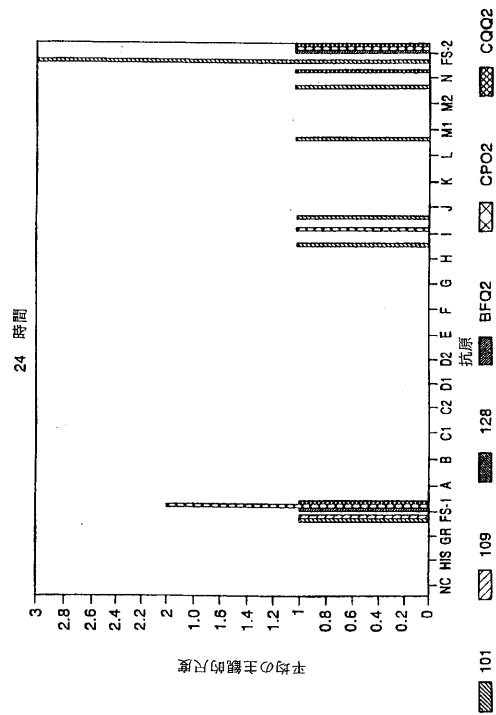
【 図 6 】



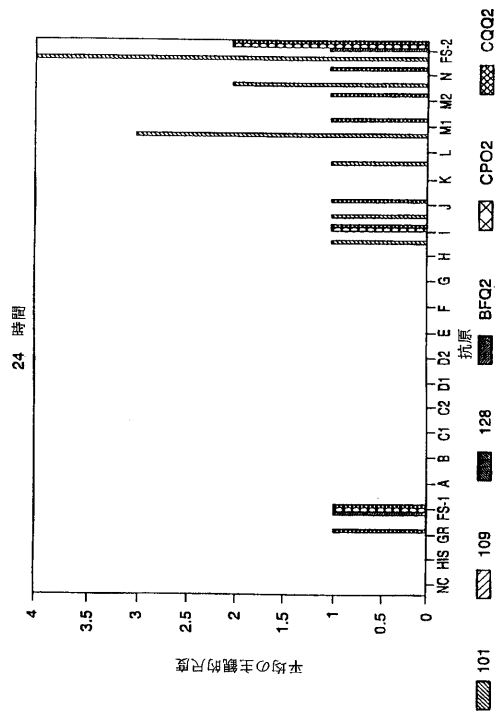
【 図 7 】



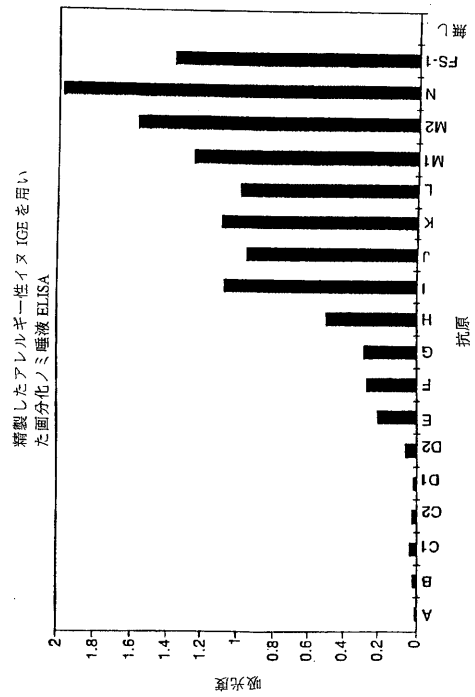
【 図 8 】



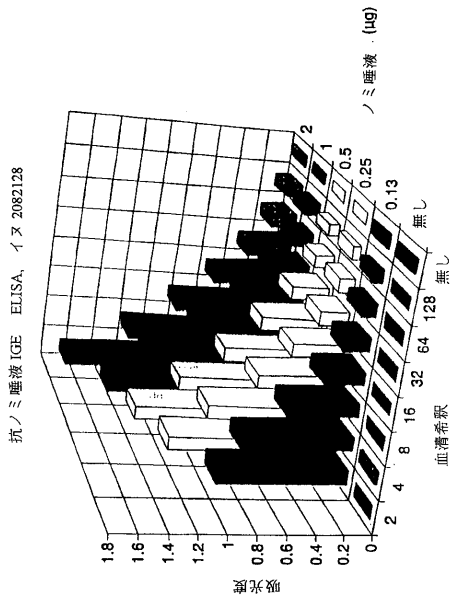
【 図 9 】



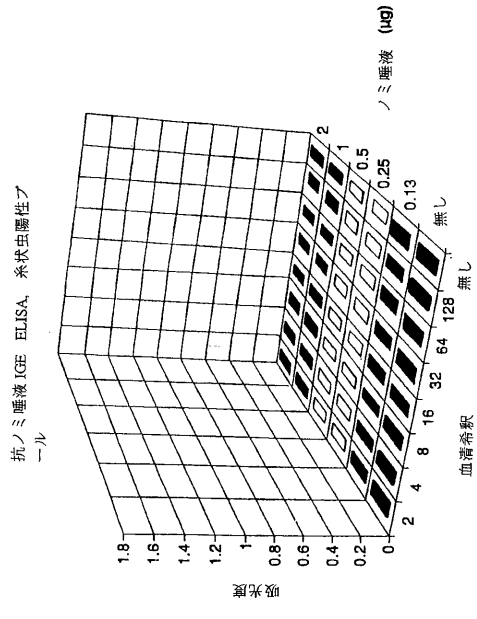
【 図 10 】



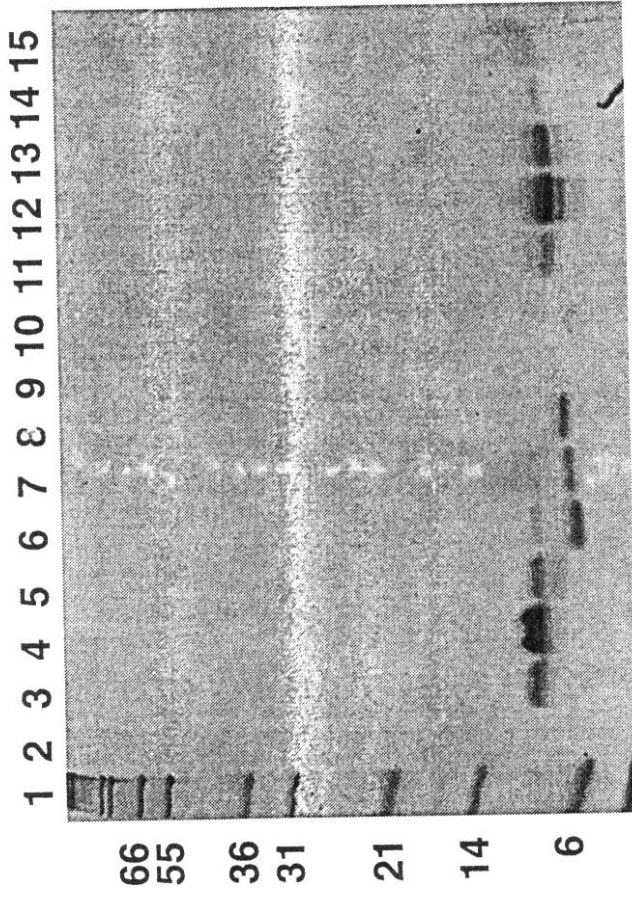
【 図 1 1 A 】



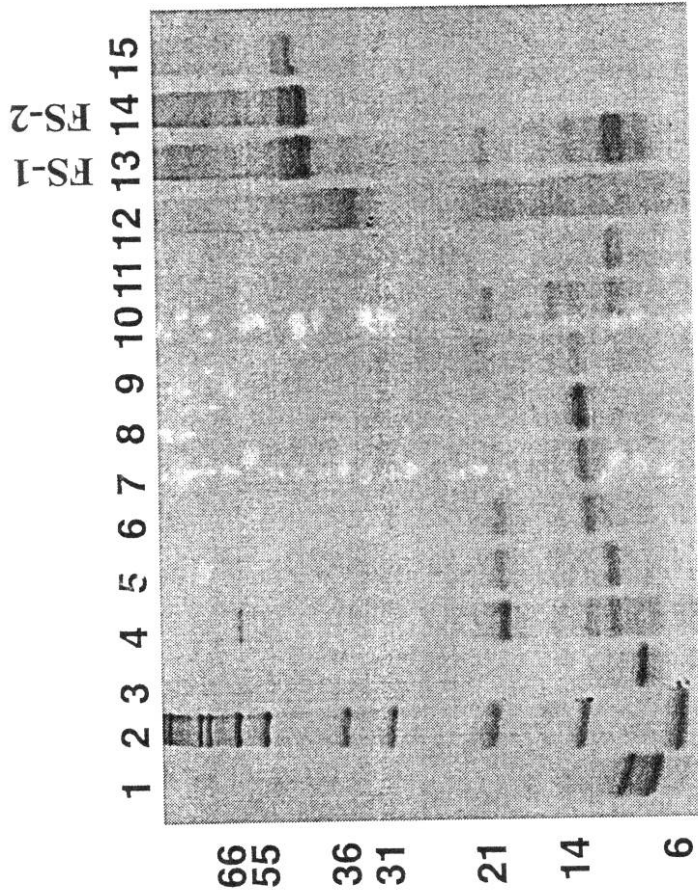
【 図 1 1 B 】



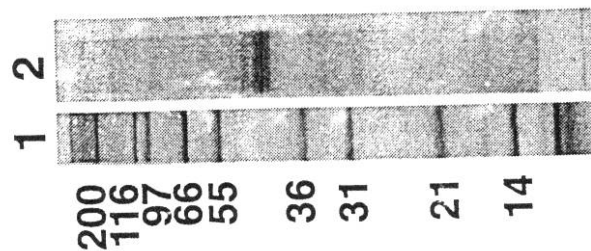
【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



【 図 1 C 】



【 配列表 】

2007181463000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成19年2月9日 (2007.2.9)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

少なくとも1つのタンパク質を含む組成物であって、前記タンパク質は、配列番号2乃至14、配列番号25乃至26、配列番号28乃至31、配列番号33、配列番号35、配列番号51及び配列番号53乃至54からなる群より選択される配列と少なくとも85%の相同性を有するアミノ酸配列からなる組成物。

【 請求項 2 】

前記タンパク質は配列番号6、配列番号25、配列番号26及び配列番号35からなる群より選択される配列と少なくとも85%の相同性を有するアミノ酸配列からなる、請求項

1 に記載の組成物。

【請求項 3】

非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有しているかをテストするための検定キットであって、前記キットは：

(a) 配列番号 2 乃至 1 4、配列番号 2 5 乃至 2 6、配列番号 2 8 乃至 3 1、配列番号 3 3、配列番号 3 5、配列番号 5 1 及び配列番号 5 3 乃至 5 4 からなる群より選択される配列と少なくとも 8 5 % の相同性を有するアミノ酸配列からなる少なくとも一つのタンパク質と、

(b) 前記非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有しているかを決定するための手段と、

を備える検定キット。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の組成物を生成する方法であって、前記組成物は混入物質を含んでおらず、前記方法は、以下の工程：

(a) 外部寄生生物を含む唾液収集装置内の収集手段上の外部寄生生物唾液産生物を収集する工程と、

(b) 前記唾液産生物を前記収集手段から抽出して前記組成物を作製する工程と、
を含み、

前記装置は (i) チャンバーに操作可能に連結されたハウジングと、(i i) 前記ハウジングと前記チャンバーとの間のインターフェースと、を備え、

前記チャンバーは、前記ハウジングよりも暖かい周囲温度を有し、それにより前記ハウジングと前記チャンバーとの間に温度の差異が形成され、かつ前記ハウジングにより前記外部寄生生物が保持され、

前記インターフェースは、(1) 前記装置内に保持された外部寄生生物によって沈積された唾液産生物の少なくとも一部を収集し得る手段であって、ポリフッ化ビニリデン膜からなる手段と、(2) 混入物質が前記収集手段に接触するのを妨げることができる障壁手段と、を含み、

かつ

前記温度の差異が前記ハウジング内に保持された外部寄生生物を引きつけ、前記障壁手段及び収集手段によって給餌し、それにより唾液産生物が前記収集手段上に沈積される、方法。

【請求項 5】

非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有しているかを同定するための方法であって、前記方法は：

(a) 前記非ヒト動物上のある部位に 配列番号 2 乃至 1 4、配列番号 2 5 乃至 2 6、配列番号 2 8 乃至 3 1、配列番号 3 3、配列番号 3 5、配列番号 5 1 及び配列番号 5 3 乃至 5 4 からなる群より選択される配列と少なくとも 8 5 % の相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質からなる組成物を投与し、かつ前記非ヒト動物上の別の部位に、陽性対照溶液及び陰性対照溶液からなる群から選択されるコントロール溶液を投与する工程と、

(b) 前記組成物の投与に起因する反応を前記コントロール溶液の投与に起因する反応と比較する工程と、

を含み、

前記非ヒト動物は、前記組成物に対する反応が少なくとも前記陽性対照溶液に対する反応と同じくらい大きい場合にアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有していると決定され、かつ前記非ヒト動物は、前記組成物に対する反応が前記陰性対照溶液に対する反応と同じくらいのサイズである場合にアレルギー性皮膚炎に対して感受性でないか若しくはそれを有していないと決定される、方法。

【請求項 6】

非ヒト動物におけるアレルギー性皮膚炎の指標となる抗体の存在を測定することにより、

前記非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有していることを同定するための方法であって、前記方法は、

(a) 配列番号 2 乃至 14、配列番号 25 乃至 26、配列番号 28 乃至 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 51 及び配列番号 53 乃至 54 からなる群より選択される配列と少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質と前記非ヒト動物由来の体液とを、前記タンパク質と前記体液中に存在する前記抗体との免疫複合体の形成に十分な条件下で、接触させる工程と、

(b) 前記免疫複合体の存在を検出する工程と、
を含み、

前記免疫複合体の存在は前記非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有していることの指標となる、方法。

【請求項 7】

前記抗体が IgE 抗体を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

配列番号 2 乃至 14、配列番号 25 乃至 26、配列番号 28 乃至 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 51 及び配列番号 53 乃至 54 からなる群より選択される配列と少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする単離された核酸分子。

【請求項 9】

前記タンパク質は配列番号 6、配列番号 25、配列番号 26 及び配列番号 35 からなる群より選択される配列と少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列からなる、請求項 8 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 10】

前記核酸分子は配列番号 24 又は配列番号 34 からなる、請求項 9 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 11】

前記タンパク質は配列番号 6、配列番号 25、配列番号 26 及び配列番号 35 からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記タンパク質は配列番号 6、配列番号 25、配列番号 26 及び配列番号 35 からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 8 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 13】

配列番号 2 乃至 14、配列番号 25 乃至 26、配列番号 28 乃至 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 51 及び配列番号 53 乃至 54 からなる群より選択される配列と少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列から構成される単離されたタンパク質。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の単離されたタンパク質のフラグメントであって、前記フラグメントが少なくとも 6 個のアミノ酸長である、フラグメント。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

上述の目的を解決するために、請求項 1 に記載の発明は、少なくとも 1 つのタンパク質を含む組成物であって、ここで同タンパク質は、配列番号 2 乃至 14、配列番号 25 乃至 26、配列番号 28 乃至 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 51 及び配列番号 53 乃至 54 からなる群より選択される配列と少なくとも 85% の同一性を有するアミノ酸配列からなる組成物を提供する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

請求項2に記載の発明は、請求項1に記載の組成物において、同タンパク質は配列番号6、配列番号25、配列番号26及び配列番号35からなる群より選択される配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列からなることをその要旨とする。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

請求項3に記載の発明は、非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有しているかをテストするための検定キットであって、同キットは：(a)配列番号2乃至14、配列番号25乃至26、配列番号28乃至31、配列番号33、配列番号35、配列番号51及び配列番号53乃至54からなる群より選択される配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列からなる少なくとも一つのタンパク質と、(b)同非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか、若しくはそれを有しているかを決定するための手段と、を備える検定キットを提供する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

請求項4に記載の発明は、請求項1に記載の組成物を生成する方法であって、同組成物は混入物質を含んでおらず、同方法は、以下の工程：(a)外部寄生生物を含む唾液収集装置内の収集手段上の外部寄生生物唾液産生物を収集する工程と、(b)同唾液産生物を同収集手段から抽出して同組成物を作製する工程と、を含み、同装置は(i)チャンバーに操作可能に連結されたハウジングと、(ii)同ハウジングと同チャンバーとの間のインターフェースと、を備え、同チャンバーは、同ハウジングよりも暖かい周囲温度を有し、それにより同ハウジングと同チャンバーとの間に温度の差異が形成され、かつ同ハウジングにより同外部寄生生物が保持され、同インターフェースは、(1)同装置内に保持された外部寄生生物によって沈積された唾液産生物の少なくとも一部を収集し得る手段であって、ポリフッ化ビニリデン膜からなる手段と、(2)混入物質が同収集手段に接触するのを妨げることができる障壁手段と、を含み、かつ同温度の差異が同ハウジング内に保持された外部寄生生物を引きつけ、同障壁手段及び収集手段によって給餌し、それにより唾液産生物が同収集手段上に沈積される、方法を提供する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

請求項5に記載の発明は、非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有しているかを同定するための方法であって、同方法は：(a)同非ヒト動物上のある部位に配列番号2乃至14、配列番号25乃至26、配列番号28乃至31、配列番号33、配列番号35、配列番号51及び配列番号53乃至54からなる群より選

択される配列と少なくとも85%の相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質からなる組成物を投与し、かつ同非ヒト動物上の別の部位に、陽性対照溶液及び陰性対照溶液からなる群から選択されるコントロール溶液を投与する工程と、(b)同組成物の投与に起因する反応を同コントロール溶液の投与に起因する反応と比較する工程と、を含み、同非ヒト動物は、同組成物に対する反応が少なくとも同陽性対照溶液に対する反応と同じくらい大きい場合にアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有していると決定され、かつ同非ヒト動物は、同組成物に対する反応が同陰性対照溶液に対する反応と同じくらいのサイズである場合にアレルギー性皮膚炎に対して感受性でないか若しくはそれを有していないと決定される方法を提供する。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

請求項6に記載の発明は、非ヒト動物におけるアレルギー性皮膚炎の指標となる抗体の存在を測定することにより、同非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有していることを同定するための方法であって、同方法は、(a)配列番号2乃至14、配列番号25乃至26、配列番号28乃至31、配列番号33、配列番号35、配列番号51及び配列番号53乃至54からなる群より選択される配列と少なくとも85%の相同性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質と同非ヒト動物由来の体液とを、同タンパク質と同体液中に存在する同抗体との免疫複合体の形成に十分な条件下で、接触させる工程と、(b)同免疫複合体の存在を検出する工程と、を含み、同免疫複合体の存在は同非ヒト動物がアレルギー性皮膚炎に対して感受性であるか若しくはそれを有していることの指標となる方法を提供する。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

請求項7に記載の発明は、請求項6に記載の方法において、同抗体がIgE抗体を含むことをその要旨とする。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

請求項8に記載の発明は、配列番号2乃至14、配列番号25乃至26、配列番号28乃至31、配列番号33、配列番号35、配列番号51及び配列番号53乃至54からなる群より選択される配列と少なくとも85%の相同性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする単離された核酸分子を提供する。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

請求項9に記載の発明は、請求項8に記載の単離された核酸分子において、同タンパク

質は配列番号 6、配列番号 2 5、配列番号 2 6 及び配列番号 3 5 からなる群より選択される配列と少なくとも 8 5 % の相同性を有するアミノ酸配列からなることをその要旨とする

。

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 0】

請求項 1 0 に記載の発明は、請求項 9 に記載の単離された核酸分子において、同核酸分子は配列番号 2 4 又は配列番号 3 4 からなることをその要旨とする。

請求項 1 1 に記載の発明は、請求項 1 に記載の組成物において、同タンパク質は配列番号 6、配列番号 2 5、配列番号 2 6 及び配列番号 3 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列からなることをその要旨とする。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 1】

請求項 1 2 に記載の発明は、請求項 8 に記載の単離された核酸分子において、同タンパク質は配列番号 6、配列番号 2 5、配列番号 2 6 及び配列番号 3 5 からなる群より選択されるアミノ酸配列からなることをその要旨とする。

請求項 1 3 に記載の発明は、配列番号 2 乃至 1 4、配列番号 2 5 乃至 2 6、配列番号 2 8 乃至 3 1、配列番号 3 3、配列番号 3 5、配列番号 5 1 及び配列番号 5 3 乃至 5 4 からなる群より選択される配列と少なくとも 8 5 % の相同性を有するアミノ酸配列から構成される単離されたタンパク質を提供する。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 2】

請求項 1 4 に記載の発明は、請求項 1 3 に記載の単離されたタンパク質のフラグメントであって、同フラグメントが少なくとも 6 個のアミノ酸長であることをその要旨とする。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 3

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 1 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 4

【補正方法】削除

【補正の内容】

フロントページの続き

(72)発明者 ハンター、シャーリー ウ
アメリカ合衆国 8 0 5 2 5 コロラド州 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 ウォレンフェルス、リンダ
アメリカ合衆国 8 0 5 2 1 コロラド州 フォート コリンズ ウェスト マルベリー ストリ
ート 1 2 2 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA04 CA05 DA02 DA06 EA02 EA03
4B064 AG31 CA19 CC24 DA01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA51 DA86 EA22 EA54 FA74

专利名称(译)	新型外寄生虫唾液蛋白和用于收集这些蛋白质的装置		
公开(公告)号	JP2007181463A	公开(公告)日	2007-07-19
申请号	JP2007002304	申请日	2007-01-10
[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	フランクグレンアール ハンターシャーリーウ ウォレンフェルスリンダ		
发明人	フランク、グレンアール. ハンター、シャーリーウ ウォレンフェルス、リンダ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/435 G01N33/53 C12P21/02 A61K35/64 A61K38/00 A61K39/00 A61K49/00 A61P17/00 A61P29/00 C07K16/18 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/12 C12R1/19 C12R1/91 G01N1/02 G01N1/24		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P17/00 A61P29/00 C07K14/4359 C07K16/18 G01N1/24		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/435 G01N33/53.Q C12P21/02.C C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024 /EA02 4B024/EA03 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA51 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA54 4H045/FA74		
代理人(译)	昂达诚		
优先权	08/319590 1994-10-07 US 08/487001 1995-06-07 US 08/487608 1995-06-07 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种用于分离外寄生虫唾液蛋白的新产品和方法，以及一种用于检测和/或治疗动物过敏性皮炎的新产品和方法。能够收集基本上不含污染物的外寄生虫唾液蛋白的唾液蛋白收集装置。还包括外寄生虫唾液蛋白，具有编码该蛋白的序列的核酸分子以及针对该蛋白的抗体。还包括获得此类蛋白质并使用该蛋白质鉴定易感或患有过敏性皮炎的动物的方法。它还包括含有此类蛋白质的治疗组合物，以及用于治疗易感或患有过敏性皮炎的动物的用途。 [选择图]图2

