

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 530840

(P2003 - 530840A)

(43)公表日 平成15年10月21日(2003.10.21)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 35/76	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/76		39/00	H 4 B 0 6 3
38/00		39/39	4 B 0 6 4
39/00		39/395	D 4 B 0 6 5
39/39			N 4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 69数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 576876(P2001 - 576876)

(86) (22)出願日 平成13年4月19日(2001.4.19)

(85)翻訳文提出日 平成14年10月21日(2002.10.21)

(86)国際出願番号 PCT/NZ01/00065

(87)国際公開番号 W001/079281

(87)国際公開日 平成13年10月25日(2001.10.25)

(31)優先権主張番号 504096

(32)優先日 平成12年4月19日(2000.4.19)

(33)優先権主張国 ニュー・ジーランド(NZ)

(71)出願人 オビタ リミテッド

O V I T A L I M I T E D

ニュージーランド国 ダニーデン モレー

ブレイス 9 エヌズィアイ ハウス レ

ベル4

(72)発明者 プフェッファー、アレクサンダー テレン

ス

ニュージーランド国 アッパー ハット

ウォード ストリート ウォレスビル ア

ニマル リサーチ センター アグリサー

チ内

(74)代理人 弁理士 恩田 博宣 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒツジ・シラミ *Bovicola ovis* アレルゲンの処理

(57)【要約】

本発明は、特に咬シラミ *Bovicola ovis* 由来のものと限らないが、シラミ・アレルゲンをコードする新規のヌクレオチド配列に関し、さらに、シラミ外寄生および関連するアレルギー疾患の診断、治療および予防における該ヌクレオチド配列およびタンパク質アレルゲンの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2のアミノ酸配列を有する実質的に精製されたポリペプチド、もしくは実質的に同等の活性を有する該ポリペプチドの断片または変異型。

【請求項2】 動物に寄生するシラミに由来し、シラミが外寄生した動物における体液性および/または細胞性免疫応答を誘発する請求項1に記載のポリペプチド、もしくはそれと実質的に同等の活性を有する該ポリペプチドの断片または変異型。

【請求項3】 変異型または断片が前記ポリペプチドのB細胞またはT細胞エピトープを組み込んでいる請求項1および2に記載のポリペプチド。

【請求項4】 前記シラミがハジラミ(Mallotophaga)亜目に属する請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項5】 前記シラミがBovicola ovisである請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項6】 動物が、ヒツジ、ウマ、ウシ、イヌ、ネコまたはニワトリを含む鳥類を含む群から選択される請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項7】 前記動物がヒツジである請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項8】 ポリペプチドがB. ovis由来のBo1と称するアレルゲンである請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項9】 請求項1～8のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする単離核酸分子。

【請求項10】 単離核酸分子であって、

- a) 配列番号1のヌクレオチド配列を含むか、または
- b) (a)の分子の機能性断片または変異型であるか、または
- c) (a)の分子とストリンジェントな条件下でハイブリッド形成することができるか、または
- d) (a)、(b)または(c)で定義した分子の相補的配列であるか、または
- e) (a)～(d)における配列のいずれかに対応するアンチセンス配列であ

る、単離核酸分子。

【請求項11】 断片または変異型がB細胞またはT細胞エピトープをコードする請求項9または10に記載の単離核酸分子。

【請求項12】 請求項9～11のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項13】 請求項12に記載のベクターを用いて形質転換した宿主細胞。

【請求項14】 請求項1～8のいずれか一項に記載のポリペプチドに結合するリガンド。

【請求項15】 リガンドが抗体であるか、もしくは結合ドメインを含む抗体の断片である請求項14に記載のリガンド。

【請求項16】 リガンドがモノクローナル抗体である請求項14に記載のリガンド。

【請求項17】 リガンドがファージディスプレイ分子である請求項14に記載のリガンド。

【請求項18】 宿主から排泄物、分泌物、組織または血液試料を採取する工程と、その試料を、ELISAまたは他の適切な検定法により、Bo1リガンド結合剤またはBo1プローブに暴露させる工程と、を含むBo1またはそのセグメントに結合するリガンドの存在について試料を検定する方法。

【請求項19】 検定される試料が最初に基質溶液の形態で調製される請求項18に記載の方法。

【請求項20】 請求項18または19に記載の検定法において用いるのに適した試験キットであって、ELISAまたは他の適切な検定法に組み込まれたBo1リガンド結合剤またはプローブを含むキット。

【請求項21】 請求項9～11のいずれか一項に記載の核酸分子とストリメンジェントな条件下でハイブリッド形成することができる単離プローブ。

【請求項22】 *Bovicola ovis*またはBo1ポリペプチドに対する動物の過敏性について診断する方法であって、

d) 請求項1～8に記載の適量のポリペプチドを、製薬学的または獣医学的に

適切な担体または希釈剤と共に皮内注射する工程と

e) その後適切な時点で、本発明のポリペプチドに対する反応の性質を検出するために注射部位を検査する工程と

f) 担体または希釈剤単独および他の対照溶液の注射での所見と比較したときのそれらの所見に基づいて、本発明のポリペプチドに対する特異的反応が明らかであったかどうかを判定する工程と、を含む方法。

【請求項23】 感受性を有する動物におけるB o 1過敏性を予防または低減するためのワクチンであって、

a) 実質的に上述のものと同じ本発明によるポリペプチド、

b) 実質的に上述のものと同じ本発明による核酸分子、

c) (a)のポリペプチドに対するDNAまたはRNAでトランスフェクトされるか、かつ/または、該DNAまたはRNAを発現する生物、

d) (a)のポリペプチドに結合するリガンドまたはプローブ、を含む群から選択された作用剤を含むワクチン。

【請求項24】 B o 1ポリペプチドに対するアレルギー性過敏症を示す動物を治療する方法、もしくは動物がB o 1ポリペプチドに対するアレルギー性過敏症を示すことを予防する方法であって、前記動物に請求項23に記載の有効量のワクチンを投与する工程を含む方法。

【請求項25】 g) 実質的に実質的に上述のものと同じ本発明による核酸分子、

h) 実質的に上述のものと同じ本発明によるポリペプチド、

i) (a)のポリペプチドに対するDNAまたはRNAでトランスフェクトされるか、かつ/または、該DNAまたはRNAを発現する生物、

j) (b)のポリペプチドに結合するリガンドまたはプローブ、を含む群から選択された有効量の作用剤と、製薬学的または獣医学的に適切な担体または希釈剤とを含む組成物。

【請求項26】 組成物が少なくとも1種のアジュバントまたはサイトカインも含む請求項25に記載の組成物。

【請求項27】 B o 1ポリペプチドに対するアレルギー性過敏症を示す動

物を治療する方法、もしくは動物がB o 1ポリペプチドに対するアレルギー性過敏症を示すことを予防する方法であって、前記動物に請求項25または26に記載の有効量の組成物を投与する工程を含む方法。

【請求項28】 前記動物が哺乳動物または鳥である請求項24または27に記載の方法。

【請求項29】 前記動物がヒツジである請求項24または27に記載の方法。

【請求項30】 外部寄生生物の外寄生を診断する方法であって、
c) 宿主から排泄物、分泌物、組織または血液試料を採取する工程と、
d) その試料を、E L I S Aまたは他の適切な検定法により、外部寄生生物の糞中に存在する同定済み抗原に対するリガンドまたはプローブに暴露する工程と、を含む方法。

【請求項31】 外部寄生生物がB . o v i sである請求項30に記載の方法。

【請求項32】 同定済み抗原がB o 1である請求項31に記載の方法。

【請求項33】 請求項30に記載の方法による外部寄生生物の外寄生を診断するための試験キットであって、E L I S Aまたは他の適切な検定法に組み込まれた外部寄生生物の糞中に存在する同定済み抗原に対するリガンドまたはプローブを含むキット。

【請求項34】 外部寄生生物がB . o v i sであり、試験キットがE L I S Aまたは他の適切な検定法に組み込まれたB o 1に対するリガンドを含む請求項33に記載の試験キット。

【請求項35】 実質的に精製されたポリペプチドであって、本明細書の任意の実施例および/または図面を参考して本明細書で説明したのと実質的に同じポリペプチド。

【請求項36】 本明細書の任意の実施例および/または図面を参考して本明細書で説明したのと実質的に同じ単離核酸分子。

【請求項37】 本発明の単離核酸分子を組み込んだベクターであって、本明細書の任意の実施例および/または図面を参考して本明細書で説明したのと実

質的に同じベクター。

【請求項38】 本発明の単離核酸分子を組み込んだベクターで形質転換された宿主細胞であって、本明細書の任意の実施例および/または図面を参考して本明細書で説明したのと実質的に同じ宿主細胞。

【請求項39】 本発明のポリペプチドに結合するリガンドであって、本明細書の任意の実施例および/または図面を参考して本明細書で説明したのと実質的に同じリガンド。

【請求項40】 本明細書の任意の実施例および/または図面を参考して本明細書で説明したのと実質的に同じの、B o 1またはそのセグメントに結合するリガンドの存在について試料を検定する方法。

【請求項41】 本明細書の任意の実施例および/または図面を参考して本明細書で説明したのと実質的に同じの、B . o v i sまたはB o 1ポリペプチドに対する動物過敏性について診断する方法。

【請求項42】 本明細書の任意の実施例および/または図面を参考して本明細書で説明したのと実質的に同じワクチン。

【請求項43】 本明細書の任意の実施例および/または図面を参考して本明細書で説明したのと実質的に同じ組成物。

【請求項44】 本明細書の任意の実施例および/または図面を参考して本明細書で説明したのと実質的に同じの、外部寄生生物の外寄生を診断する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、特に咬シラミ *Bovicola ovis* 由来のものだけとは限らないが、シラミ・アレルゲンをコードする新規のヌクレオチド配列に関し、さらに、シラミ外寄生および関連するアレルギー疾患の診断、治療および予防における該ヌクレオチド配列およびタンパク質アレルゲンの使用に関する。

【0002】

(発明の背景)

シラミは、哺乳動物および鳥類の種の一般的な外寄生生物である。家畜における最も重要なシラミは、宿主の皮膚を刺通することができる口器を有し、組織液および血液を摂取することができる吸血シラミ (*Insecta: Phthiraptera: Trichodectidae: Anoplura*) ならびに主として皮膚表面、毛髪、柔皮、羊毛または羽毛から栄養分を摂取する咬シラミ (*Insecta: Phthiraptera: Trichodectidae: Mallophaga*) である。咬シラミは、特にウシ、ヒツジ、ヤギおよびウマにおいて一般的かつ経済上重要であり、イヌ、ネコおよびニワトリを含む鳥においても認められる。

【0003】

咬シラミの1例である *Bovicola ovis* は、全世界にわたるヒツジの一般的な外部寄生虫である。この寄生虫のヒツジへの外寄生が、皮膚の刺激とその結果として生ずる羊毛のこすれと損傷の原因であると長年にわたり認められている (ジョンソン、ボレイ、プラントおよびブラント (*Jonson, Boray, Plant and Blunt*), 1993年; リプソンおよびベーコン-ホール (*Lipson and Bacon-Hall*), 1976年)。外寄生されたヒツジの羊毛には、変色、収量の減少および他の望ましくない品質が発生することがある (ケットルおよびルーキーズ (*Kettle and Lukies*), 1982年; ケットルおよびルーキーズ (*Kettle and Lukies*), 1984年; クレランド、ドブソンおよびミード (*Clel*

and、Dobson and Meade)、1989年)。さらに、本願発明者らによる最近の試験で、100年間以上にわたって認められている子羊の毛皮の重大な欠陥である(シーモア-ジョーンズ(Seymour-Jones)、1913年)皮のしわも、B. ovisのヒツジへの外寄生に関連していることが示された(ヒース、クーパー、コールおよびビショップ(Heath、Cooper、Cole and Bishop)、1995年;ヒース、コール、ビショップ、プフェッファー、クーパー、およびリスドン ピー(Heath、Cole、Bishop、Pfeffer、Cooper and Risdon P)、1995年)。発明者らはさらに、皮のしわはアレルギー反応の特徴を有する表在性血管周囲皮膚炎を特徴とすることを示した(ヒース、コール、ビショップ、プフェッファー、クーパー、およびリスドン ピー(Heath、Cole、Bishop、Pfeffer、Cooper and Risdon P)、1995年)。最近の試験は、ヒツジにおける皮のしわの発生におけるシラミ産物に対するアレルギー性免疫応答の役割を支持している(バーニー、プフェッファー、フェーガンおよびヒース(Bany、Pfeffer、Phegan and Heath)、1995年;バーニー、プフェッファーおよびフェーガン(Bany、Pfeffer and Phegan)、1995年;プフェッファー、フェーガンおよびバーニー(Pfeffer、Phegan and Bany)、1997年;プフェッファー、バーニー、フェーガンおよびオズボーン(Pfeffer、Bany、Phegan and Osborn)、1993年)。シラミに対するアレルギー反応は、外寄生されたヒツジが羊毛をこすって、損傷する原因となる皮膚刺激を助長し、さらにまた、外寄生された子羊の毛皮の価値を著しく減じる皮膚病変の原因となると予想することができる。

【0004】

ヒツジへのB. ovisの外寄生の経済上の影響の重大性は、羊毛の損傷と外寄生の予防の費用を十分に考慮すると、かなりなものである(マクレオ(McLeod)、1995年)。皮のしわに起因する子羊の毛皮の品質の低下の実質的な費用もこれに加えることができる。直接的な経済上の費用は別として、シラミ

の外寄生を抑制するための従来の処理剤（合成殺虫剤および昆虫成長調整剤）を継続的に使用する場合、残留物が環境および食物連鎖に入ることによる有害な影響があり、また、農業従事者の安全も脅かすことになる。

【0005】

シラミの外寄生の抑制に際してそのような有害な従来の処理剤の使用を低減させようとする消費者の圧力と、一部の合成殺虫剤に対するシラミの耐性の発現とから、現行の抑制戦略の改善が必要であり、また、新しい抑制方法および抑制剤が求められている。

【0006】

この要求を満たすのに何らかの方法を行うこと、あるいは、少なくとも有用な選択肢を公衆に提供することが、本発明の目的である。

本出願者らは、外寄生されたヒツジにおけるアレルギー反応を誘発するシラミ抗原（アレルゲン）を同定した。同定したアレルゲン、すなわちB o 1と称するタンパク質を精製し、アミノ酸配列を決定し、コードcDNAを取得し、細菌、すなわち大腸菌（*Escherichia coli*）において発現させた。本発明が対象とするものは、広く、これらのアレルゲン、ならびにシラミ外寄生および関連するアレルギー疾患の診断、予防および治療におけるそれらの使用である。

【0007】

（発明の概要）

本発明は、咬シラミ由来の新規のタンパク質アレルゲンであって、該タンパク質の少なくとも1つのB細胞またはT細胞エピトープを含む前記タンパク質の一部を有するタンパク質アレルゲンの同定、精製、配列決定および組換えまたは合成の形での生産に関する。

【0008】

したがって、一態様において、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列を有する実質的に精製されたポリペプチド、もしくは実質的に同等の活性を有するその断片または変異型からなると広く言うことができる。

【0009】

さらなる態様によれば、動物に寄生するシラミに由来するポリペプチドが、シラミが外寄生した動物における体液性および/または細胞性免疫応答を誘発する実質的に上述のポリペプチド、もしくはそれと実質的に同等の活性を有するその断片または変異型を提供する。

【0010】

変異型または断片がポリペプチドのB細胞またはT細胞エピトープを組み込んでいることがより好ましい。

したがって、動物へのシラミの外寄生と関連するアレルギー疾患を抑制するのに用いることができる本発明によるポリペプチドの変異型または断片も、本発明に含まれることが理解されよう。

【0011】

一般的に、咬シラミが外寄生する可能性のある動物としては、ヒツジ、ウマ、ウシ、イヌ、ネコまたはニワトリを含む鳥などが挙げられる。

本発明は、以下を含むが、それだけに限定されないペプチド類似体も含むことを明確に理解しなければならない。

【0012】

1. 1つまたは複数のアミノ酸がその対応するD-アミノ酸によって置換されている化合物。当業者であれば、逆-反転(*retro-inverso*)アミノ酸配列を標準法により合成できることがわかる。例えば、コレフおよびグッドマン(*Chorev and Goodman*)、1993年を参照のこと。

2. ペプチド結合が代謝分解耐性の高い構造によって置換されている擬似ペプチド化合物。例えば、オルソンら(*Olson et al*)、1993年を参照のこと。および

3. 個々のアミノ酸が、類似構造、例えば、ジェムジアミノアルキル基またはアルキルマロニル基によって置換されていて、電荷を改変するための修飾末端もしくはアルキル、アシルまたはアミン置換基を伴うか、または伴わない化合物。

【0013】

そのような代替構造を使用した場合、それらは生理的条件下で分解耐性がより高いため、体内での有意に長い半減期を得ることができる。

ペプチド類似体のコンビナトリアル合成ならびにペプチドおよびペプチド類似体のスクリーニングの方法は、当該技術分野でよく知られている（例えば、ギャロップら（Gallop et al）、1994年；ホーガン（Hogan）、1997年を参照）。

【0014】

本明細書の目的に沿って、「ペプチドおよびペプチド類似体」という用語は、1, 2、1, 3、1, 4またはそれより大きい置換パターンで隔てられたアミノおよびカルボキシ末端を有するユニットから構成されている化合物を含む。該化合物は、20種の天然に存在する、すなわち「通常の」、LまたはD立体配置の - アミノ酸；4 - ヒドロキシプロリン、5 - ヒドロキシリシン、シトルリンおよびオルニチンのように、通常タンパク質中に認められず、生合成により得られるか、すなわち「異常な」アミノ酸； - メチルアラニン、ノルロイシン、ノルバリン、C - およびN - アルキル化アミノ酸、ホモシステインおよびホモセリンのような合成により得られる - アミノ酸；ならびに当該技術分野で知られている他の多くのものを含む。

【0015】

該化合物はまた、 - アラニン、 - アミノ酪酸、フライジנגーラクタム（フライジנגーら（Freidinger et al）、1982年）、二環式ジペプチド（BTD）（フライジングーら（Freidinger et al）、1982年；ナガイおよびサトウ（Nagai and Sato）、1985年）、アミノ - メチル安息香酸（スミゼおよびフォン イツスタイン（Smythe and von Itzstein）、1994年）および当該技術分野でよく知られている他の化合物のような1, 3またはそれより大きい置換パターンで隔てられたアミンおよびカルボキシル官能基を有する化合物も含む。スタチン様等配電子体、ヒドロキシエチレン等配電子体、還元アミド結合等配電子体、チオアミド等配電子体、尿素等配電子体、カルバマート等配電子体、チオエーテル等配電子体、ビニル等配電子体および当該技術分野で知られている他のアミド結合等配電子体も、本発明の目的のために有用である。

【0016】

「通常の」アミノ酸は、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、システイン、メチオニン、アルギニン、リシン、プロリン、セリン、トレオニンおよびヒスチジンからなる群から選択されたL-アミノ酸である。本明細書ではこれらを、その通常の3文字または1文字の略語により表わす。

【0017】

「異常な」アミノ酸には、D-アミノ酸、ホモアミノ酸、N-アルキルアミノ酸、デヒドロアミノ酸、芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン以外)、オルト、メタまたはパラアミノ安息香酸、オルニチン、シトルリン、ノルロイシン、 γ -グルタミン酸、アミノ酪酸(Abu)および β -二置換アミノ酸からなる群から選択されたアミノ酸が含まれるが、これだけに限定されない。

【0018】

ポリペプチドの起源であるシラミは、ハジラミ(Malliphaga)亜目に属し、好ましくは、ヒツジの咬シラミ寄生虫であるBovicola oviss種である。

【0019】

最も好ましくは、ポリペプチドは、B. oviss由来のBo1と称されるアレルゲンを含む。

都合のよいことに、本発明によるアレルゲンポリペプチドは、したがって、宿主細胞または生物におけるDNA配列コーディングの発現によって得られるか、あるいは化学的に合成することもできる。

【0020】

さらなる態様において、本発明は、上述のように実質的にポリペプチドをコードする単離核酸分子を提供する。

さらなる態様において、本発明は、本発明によるシラミ・アレルゲンポリペプチドをコードする単離核酸分子を提供する。好ましくは、単離核酸分子は、

a) 配列番号1のヌクレオチド配列を含むか、または

- b) a) の分子の機能性断片または変異型であるか、または
- c) ストリンジェントな条件下で a) の分子とハイブリッド形成することができるか、または
- d) (a)、(b) または (c) で定義された分子の相補的配列であるか、または
- e) (a) ~ (d) における配列のいずれかに対応するアンチセンス配列である。この核酸分子は、DNA、cDNA または RNA を含んでよい。

【0021】

好ましくは、上述の核酸分子の断片または変異型は、B細胞またはT細胞エピトープを含むものである。

また本発明は、本発明によるDNA分子を含む組換え発現ベクター、および本発明によるポリペプチドを発現することができる本発明によるベクターにより形質転換された宿主も提供する。

【0022】

本発明の別の一態様は、本発明のポリペプチドに結合するリガンドを提供する。通常、リガンドは、抗体または結合ドメインを含む抗体の断片である。最も好ましくは、リガンドは、本発明のポリペプチドもしくはその機能性断片または変異型に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体である。他のいくつかの実施形態において、リガンドは、ファージディスプレイ分子である。

【0023】

さらなる態様において、本発明は、Bo1またはそのセグメントに結合するリガンドの存在について試料を検定する方法であって、宿主から排泄物、分泌物、組織または血液試料を採取する工程と、ELISAまたは他の適切な検定法により試料をBo1リガンド結合剤またはBo1プローブに暴露する工程とを含む方法を提供する。リガンドが抗体である場合、そのような検定法により、宿主動物における外部寄生生物による以前または現在の外寄生の有無がわかる。リガンドがIgEアイソタイプの抗体である場合、そのような検定法は、外部寄生生物に対する過敏症の診断に有用である。

【0024】

本発明はまた、B o 1 またはそのセグメントに結合するリガンドの検定に使用するのに適した試験キットであって、E L I S A または他の適切な検定法に組み込まれたB o 1 リガンド結合剤またはプローブを含むキットを提供する。

【0025】

本発明はまた、皮内皮膚試験による宿主におけるシラミに対する過敏性（故にシラミによる宿主への以前または現在の外寄生）を診断する別法を提供する。この方法では、宿主に皮内注射された本発明のポリペプチドもしくはその断片または変異型は、非感作宿主においてはほとんどまたは全く反応がないことと対照的に、過敏性宿主の皮膚における特有の反応を誘発する。この方法の *in vitro* 相関は、上記に定義した本発明によるポリペプチドに宿主の単離組織または単離細胞を暴露することと、組織または細胞の免疫学的に媒介された刺激、例えば、血中好塩基球からのヒスタミンの放出もしくはリンパ球の増殖または形質転換を測定することを含む。本明細書で定義した本発明のポリペプチドを使用することにより、外部寄生生物が宿主のそのような免疫学的感作を誘発することに関するそのような方法の特異性は、粗抗原調製試料を使用する公表された方法（プフェッファー、フェーガンおよびバーニー（P f e f f e r、P h e g a n、a n d B a n y）、1997年；バーニー、プフェッファーおよびフェーガン（B a n y、P f e f f e r a n d P h e g a n）、1995年；バーニー、プフェッファー、フェーガンおよびヒース（B a n y、P f e f f e r、P h e g a n a n d H e a t h）、1995年）と比較して増加するであろう。

【0026】

本発明はまた、感受性を有する動物におけるB o 1 過敏性を予防または低減するためのワクチンであって、

- a) 実質的に上述のものと同じ本発明によるポリペプチド、
- b) 実質的に上述のものと同じ本発明による核酸分子、
- c) (a) のポリペプチドに対するDNAまたはRNAでトランスフェクトされるか、かつ/または、該DNAまたはRNAを発現する生物、
- d) (a) のポリペプチドに結合するリガンドまたはプローブ、を含む群から選択された作用剤を含むワクチンを提供する。

【0027】

本発明はさらに、

- a) 実質的に上述のものと同じ本発明による核酸分子、
 - b) 実質的に上述のものと同じ本発明によるポリペプチド、
 - c) (b)のポリペプチドに対するDNAまたはRNAでトランスフェクトされるか、かつ/または、該DNAまたはRNAを発現する生物、
 - d) (b)のポリペプチドに結合するリガンドまたはプローブ、
- を含む群から選択された有効量の作用剤と、製薬学的または獣医学的に適切な担体または希釈剤とを含む組成物を提供する。

【0028】

本発明のさらなる一態様によれば、外部寄生生物の外寄生を診断する方法であって、

- a) 宿主から排泄物、分泌物、組織または血液試料を採取する工程と、
 - b) その試料を、ELISAまたは他の適切な検定法により、外部寄生生物の糞中に存在する同定済み抗原に対するリガンドまたはプローブに暴露する工程と、
- を含む方法を提供する。

【0029】

本発明は、外部寄生生物を診断するための試験キットを提供する。一態様において、この試験キットは、ELISAまたは他の適切な検定法に組み込まれた体外寄生生物の糞中に存在する同定済み抗原に対するリガンドまたはプローブを含んでよい。

【0030】

好ましい実施形態において、外部寄生生物は*B. ovis*であり、同定済みアレルゲンはBo1である。それらは好ましい実施形態であるが、広範囲の外部寄生生物に対して用いることができる本発明のこの態様の適用範囲を限定するとみなすべきではない。

【0031】

本発明はまた、Bo1ポリペプチドに対するアレルギー性過敏症を示す動物を

治療する方法、もしくは動物がアレルギー性過敏症を示すことを予防する方法であって、実質的に上述のものと同じ有効量のワクチンまたは組成物を投与する工程を含む方法を含む。

【0032】

本発明のさらなる一態様によれば、Bovicola ovisまたはBo1ポリペプチドに対する動物の過敏性について診断する方法であって、

a) 請求項1～8に記載の適量のポリペプチドを、製薬学的または獣医学的に適切な担体または希釈剤と共に皮内注射する工程と、

b) その後適切な時点で、本発明によるポリペプチドに対する反応の性質を検出するために注射部位を検査する工程と、

c) 担体または希釈剤単独および他の対照溶液の注射での所見と比較したときのそれらの所見に基づいて、本発明によるポリペプチドに対する特異的反応が明らかであったかどうかを判定する工程と、を含む方法を提供する。

【0033】

本発明は以上に定義したように広いが、当業者には、本発明がそれに限定されず、また、実施例を示す以下の記述の実施形態も含むことが理解できるであろう。

【0034】

医薬組成物の調製に用いられる方法および薬剤担体は、レミントン(Remington)著のPharmaceutical Sciences、第19版、マック・パブリッシング社(Mack Publishing Company)[米国ペンシルヴェニア州イーストン(Easton)所在]のような教科書に述べられているように、当該技術分野でよく知られている。

【0035】

本発明による化合物、ワクチンおよび組成物は、適切な経路により投与することができるものであり、当業者であれば治療する症状に最も適した経路と用量を容易に決定することができるであろう。用量は、主治医または獣医の自由裁量とし、また、治療する症状の性質および状態、治療対象の年齢および一般健康状態、投与経路ならびに投与された以前の治療薬に依って決まるだろう。

【0036】

担体または希釈剤および他の賦形剤は、投与経路によって決まるものであり、これについても、当業者であれば個別の事例ごとに最も適切な製剤を容易に決定することができるであろう。

【0037】

本明細書の目的に沿って、「含む（有する）」という語は「含むが、それだけに限定されない」ことを意味し、その活用形も同じ意味をもっていることが明確に理解されるであろう。

特に、本発明の好ましい態様を、添付図面に関して記述することとする。

【0038】

（配列の簡単な説明）

配列番号1は、完全なB o 1タンパク質のコーディングDNAのヌクレオチド配列である。

配列番号2は、完全なB o 1タンパク質のアミノ酸配列である。

【0039】

（発明の詳細な説明）

本出願者は、*Bovicola ovis*が外寄生したヒツジが外寄生性シラミに対して免疫応答を示すことを初めて示した。その応答の証拠は、シラミ全体およびシラミ糞調製試料から単離した本発明による可溶性アレルゲンの粗調製試料を用いて確認された。

本発明は、配列番号2のアミノ酸配列を有する実質的に精製されたシラミポリペプチドアレルゲン、もしくはそれと実質的に同等の活性を有するその断片または変異型を提供する。好ましくは、該ポリペプチドは、シラミが外寄生した動物における体液性および/または細胞性免疫応答を誘発するか、あるいは、それと実質的に同等の活性を有するその断片または変異型である。

【0040】

「実質的に精製された」という用語は、ポリペプチドが、天然に存在する細胞または生物における汚染タンパク質またはペプチドもしくは他の物質から実質的に単離または分離されたことを意味し、標準精製技術により精製されたポリペプ

チド、ならびに組換え技術により調製されたポリペプチドおよび化学合成されたポリペプチドを含む。ポリペプチドは、シラミ全体（丸ごと）またはシラミ糞調製試料から精製されることが好ましい。

【0041】

本明細書で用いる「変異型」という用語は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列が、GAPまたはBESTFIT（ヌクレオチドおよびペプチド）またはBLASTP（ペプチド）またはBLASTX（ヌクレオチド）により評価して、図面のヌクレオチドまたはアミノ酸配列と実質的に60%またはそれ以上の相同性を、また、本発明による配列と好ましくは75%の相同性を、最も好ましくは90~95%の相同性を示すヌクレオチドおよびポリペプチドを指す。変異型は、1つまたは複数のヌクレオチドまたはアミノ酸の挿入、置換または欠失のような修飾による天然ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の修飾の結果として生ずるか、あるいは天然に存在する変異型であってよい。「変異型」という用語はまた、2×SSC、65 と定義される標準ハイブリッド形成条件下、または好ましくは6×SSC、55 と定義されるストリンジェントな条件下で、本発明による配列とハイブリッド形成する相同配列も含む。そのような変異型が望ましい場合、天然DNAのヌクレオチド配列は適宜改変される。この改変は、DNAの合成によって、あるいは例えば、部位特異的突然変異誘発やカセット突然変異誘発による天然DNAの修飾によって行うことができる。好ましくは、cDNAまたはゲノムDNAの一部について配列の修飾を必要とする場合、当該技術分野における標準的技術により、部位特異的プライマーを用いた突然変異誘発を行う。

【0042】

「リガンド」という用語は、ポリペプチドまたはペプチドのような他の分子と結合することができる分子を指し、抗体またはファージディスプレイ分子を含むが、それだけに限定されないと解釈すべきである。

【0043】

「組織」という用語は、特殊化した細胞の凝集性集合を指し、皮膚、毛皮、毛髪、羊毛および羽毛を含むが、それだけに限定されないと解釈すべきである。

読者は、本発明によるポリペプチドと実質的に同じ機能を有する本発明による

ポリペプチドの擬似体 (m i m e t i c s) も本発明の適用範囲内に含まれることを認識するであろう。そのような擬似体の生産は、当業者の能力の範囲内にある。

【0044】

本発明によるポリペプチドは、様々な方法により調製することができる。例えば、それらは、天然供給源からの単離により、または適切な既知の技術 (メリーフィールド (M e r r y f i e l d) (1 9 6 3 年) 、 J . A m e r . C h e m . S o c . 第 8 5 巻 2 1 4 9 ~ 2 1 5 9 頁 によつて記載された段階的固相合成など) を用いた合成により、あるいは好ましくはDNA技術を用いて、生産することができる。

【0045】

これらのポリペプチドの変異型は、当該技術分野で知られているいずれかの技術により同様に調製することができる。例えば、変異型は、アデルマンら (A d e l m a n e t a l .) DNA第2巻183頁 (1 9 8 3 年) に記載のように天然アミノ酸配列をコードするDNAの部位特異的突然変異誘発によつて調製することができる。

【0046】

さらに、本発明によるアミノ酸配列と実質的な同一性を有するポリペプチドも好ましい実施形態において用いることができる。ここで、「実質的な同一性」は、デフォルト・ギャップ・ウエイトを用いたプログラムGAPまたはBESTFITなどにより最適に配列させたとき、2つの配列が少なくとも60%、好ましくは75%、最も好ましくは90~95%の配列同一性を共有することを意味する。同一でない残基位置は、同類アミノ酸置換によつて異なっていることが好ましい。例えば、電荷や極性などの類似の化学的性質を有するアミノ酸の置換は、タンパク質の性質に影響を及ぼす可能性が低い。例として、アスパラギンをグルタミンに、アスパラギン酸をグルタミン酸に置換することが挙げられる。

【0047】

好ましい場合、最初の工程が望ましい産物をコードするDNAを得ることである組換え技術を用いて、本発明によるポリペプチドを生成してもよい。そのよう

なDNAは、本発明のさらなる一態様である。本発明によるDNAは、本発明による天然または修飾ポリペプチド、もしくはその活性断片または変異型をコードしてよい。

【0048】

好ましくは、そのDNAは、本発明によるシラミ・アレルギー性ポリペプチドをコードする単離核酸分子を含み、より好ましくは、核酸分子が配列番号1のヌクレオチド配列もしくはその機能断片または変異型を含む。

【0049】

「単離された」という用語は、核酸が天然に存在する細胞または生物における汚染配列から、実質的に分離または精製されたことを意味する。核酸には、標準精製技術により精製された核酸、ならびにPCR技術を含む組換え技術により調製された核酸、および化学合成された核酸が含まれる。好ましくは、核酸分子は *Bovicola ovis* 咬シラミのゲノムDNAまたはmRNAから得られる。

【0050】

DNAは、適切な天然供給源から単離することができるか、あるいは通常の技術を用いてイントロンを含まないcDNAとして調製することができる。DNAはまた、調製される活性断片のサイズが許容される場合、合成オリゴヌクレオチドの形態で調製することもできる。例として、マテウシら (Matteucci et al) *J. Am. Chem. Soc.* 第103巻3185~3191頁 (1981年) のトリエステル法を用いることができる。

【0051】

望ましい場合、本発明によるDNAは、本発明によるポリペプチドと担体タンパク質を含む融合タンパク質もコードすることもできる。担体タンパク質は、制御された条件下で、ポリペプチド、その断片または変異型から一般に開裂される。一般的に用いられる担体タンパク質の例は、ガラクトシダーゼおよびグルタチオン-S-トランスフェラーゼである。

【0052】

上記したように、1つまたは複数のアミノ酸の挿入、置換または欠失だけ天然

アミノ酸配列と異なっているポリペプチドの変異型も可能である。そのような変異型が望まれる場合、天然DNAのヌクレオチド配列は適宜改変される。この改変は、DNAの選択的合成によって、あるいは例えば、部位特異的突然変異誘発またはカセット突然変異誘発による天然DNAの修飾によって、行うことができる。好ましくは、cDNAまたはゲノムDNAの一部に配列の修飾を必要とする場合、当該技術分野における標準的技術により、部位特異的プライマーを用いた突然変異誘発を行う。

【0053】

最も好ましくは、本発明は、ヒツジに外寄生する咬シラミ *Bovicola ovis* からのタンパク質アレルギーに関する。ヌクレオチド多形がコーディングDNA中に発生し、アミノ酸多形がタンパク質中に発生することがあることが当業者によって認識されるであろう。さらに、同じかまたは実質的に同様なタンパク質が他の咬シラミ (*Mallophaga* 亜目) に存在すると予想できることが当業者によって認識されるであろう。そのようなタンパク質は、有利には *B. ovis* からのタンパク質について示したような適用例に用いることができる。そのタンパク質のコーディングDNAおよびアミノ酸におけるそのような配列変異型またはその一部は、本発明の適用範囲内にある。

【0054】

さらなる一態様において、本発明は、本発明によるポリペプチドまたはペプチドの調製用として適切な複製可能な転移ベクターにある。これらのベクターは、当該技術分野でよく知られている技術に従って構築してもよく、あるいは、当該技術分野で入手可能なクローニング・ベクターから選択してもよい。

【0055】

クローニング・ベクターは、用いる宿主または宿主細胞に従って選択することができる。有用なベクターは、一般的に以下の特性を有するであろう。

(a) 自己複製する能力

(b) 特定の制限ヌクレアーゼの単一標的の保有

(c) 望ましくは、抗生物質耐性のような容易に選択可能なマーカーの遺伝子の保有

【0056】

これらの特性を有するベクターの2つの主な種類は、プラスミドおよび細菌ウイルス(バクテリオファージまたはファージ)である。現在のところ、好ましいベクターとして、バクテリオファージ Uni-ZAP(商標)XRおよび修飾プラスミドpBAD18ベクター、AY2-4などがある(図3ならびにグズマン エル、ベリン ディー、カルソン エムジェーおよびベックウイズ ジェー(Guzman, L., Belin, D., Carson, M. J, and Beckwith, J.) (1995年) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter, J. Bacteriol. 第177巻4121~4130頁を参照)。

【0057】

本発明によるDNA分子は、複製可能な発現ベクターにおける適切な制御配列との操作可能なリンケージに入れることによって発現させることができる。制御配列は、とりわけ、複製起点、プロモーター、エンハンサーおよび転写ターミネーター配列を含み得る。発現ベクターに含まれる制御配列の選択は、DNAの発現に用いることを意図した宿主または宿主細胞の種類によって決まる。

【0058】

一般的に、真核生物、酵母、昆虫または哺乳動物の細胞は有用な宿主である。プラスミドベクターも宿主という用語中に含まれる。適切な原核宿主として、大腸菌(E. coli)、バチルス(Bacillus)種およびシュードモナス(Pseudomonas)の様々な種などがある。 -ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)およびラクトース(lac)プロモーター系のような一般的に用いられているプロモーターはすべて、当該技術分野でよく知られている。選択した宿主に適合するあらゆる利用可能なプロモーター系を用いることができる。酵母に用いられるベクターも利用可能であり、よく知られている。適切な例は、2ミクロン複製起点プラスミドである。

【0059】

同様に、哺乳類細胞に用いられるベクターもよく知られている。そのようなベクターは、SV-40のよく知られている派生物、アデノウイルス、レトロウイルス由来のDNA配列、単純ヘルペスウイルスおよびプラスミドとファージDNAとの組合せから得られたベクターなどである。

【0060】

さらなる真核発現ベクターが、当該技術分野で知られている（例えば、ピージェー サザンおよびピーベルク（P. J. Southern and P. Berg）、J. Mol. Appl. Genet. 第1巻、327~341頁（1982年）；エス スブラマニら（S. Subramani et al.）、Mol. Cell. Biol. 第1巻、854~864ページ（1981年）；アールジェー カウフマンおよびピーエー シャープ（R. J. Kaufman and P. A. Sharp）、Amplification and Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reducase Complementary DNA Gene、J. Mol. Biol. 第159巻、601~621ページ（1982年）；アールジェー カウフマンおよびピーエー シャープ（R. J. Kaufmann and P. A. Sharp）、Mol. Cell. Biol. 第159巻、601~664ページ（1982年）；エスアイ シャヒルら（S. I. Scahill et al.）、Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 第80巻、4654~4659ページ（1983年）；ジー ウルラウブおよびエルエー チャシン（G. Urlaub and L. A. Chasin）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 第77巻、4216~4220ページ（1980年）。

【0061】

本発明において有用な発現ベクターは、発現すべきDNA配列または断片に機

能的に連結された少なくとも1つの発現制御配列を含んでいる。制御配列は、クローニングされたDNA配列の発現を制御し調節するためにベクターに挿入される。有用な発現制御配列の例は、lac系、trp系、tac系、trc系、ファージの主要オペレーターおよびプロモーター領域、酵母酸ホスファターゼの解糖プロモーター（例えばPho5）、酵母交配因子のプロモーター、およびポリオーマ、アデノウイルス、レトロウイルスおよびシミアンウイルス由来のプロモーター、（例えばSV40の初期および後期プロモーター）、ならびに原核および真核細胞およびそれらのウイルスまたはそれらの組合せの遺伝子の発現を制御することが知られている他の配列である。

【0062】

本明細書で用いる好ましいプロモーターは、アラビノースプロモーター（グズマン エル、ベリン ディー、カーソン エムジェーおよびベックウイズ ジェー（Guzman, L., Belin, D., Carson, M. J. and Beckwith, J.）、1995年）であるが、当該分野の研究者によって認識されていると思われるように、あらゆる適切なプロモーターが本発明の適用範囲内に含まれる。

【0063】

ベクターの構築に際して、便利かつ迅速な検定法により非修飾ベクターから外来DNAを組み込んでいるベクターを区別することも有利である。そのような検定法における有用なレポーター系として、レポーター遺伝子、測定可能な変色を生ずる他の検出可能な標識、抗生物質耐性などがある。1つの好ましいベクターでは、-ガラクトシダーゼレポーター遺伝子が用いられている。その遺伝子はX-galプレート上で青色の表現型を示すクローンによって検出可能である。これは選択を容易にする。一実施形態において、-ガラクトシダーゼ遺伝子は、ポリヘドリンをコードする遺伝子で置換してもよい。この遺伝子は、X-galで染色したとき、白色の表現型を示すクローンによって検出可能である。この青色-白色の色の選択は、組換えベクターを検出する有用なマーカーとして役立つ。

【0064】

選択されたならば、ベクターは、凍結解凍抽出とそれに続く精製のような通常の手順を用いて、培養物から単離することができる。

発現については、発現すべき本発明のDNAと制御シグナルとを含むベクターを、宿主または宿主細胞への挿入または形質変換させる。いくつかの有用な発現宿主細胞として、よく知られている原核および真核細胞がある。いくつかの適切な原核宿主は、例えば、E. coli SG-936、E. coli HB101、E. coli W3110、E. coli X1776、E. coli X2282、E. coli DHTおよびE. coli、MR01のようなE. coli、Pseudomonas、Bacillus subtilisのようなBacillusおよびStreptomycesなどである。適切な真核細胞は、酵母および他の菌類、昆虫、COS細胞およびCHO細胞のような動物細胞、組織培養中のヒト細胞および植物細胞などである。

【0065】

用いる宿主によって、そのような細胞に適切な標準技術により形質転換が実施される。本質的な細胞壁を含む原核または他の細胞の場合、カルシウム処理方法(コーエン エスエヌ(Cohen, SN)、Proc Nat Acad Sci, USA、第69巻、2110ページ(1972年))を用いることができる。そのような細胞壁を含まない哺乳動物細胞の場合、グレアムおよびヴァンデル エブ(Graeme and Van Der Eb)、Virology、第52巻、546ページ(1978年)のリン酸カルシウム沈殿法が好ましい。植物への形質転換は、Agrobacterium tumefaciens(シャウら(Shaw et al.))、Gene、第23巻、315ページ(1983年))を用いて、あるいは酵母への形質転換は、ヴァン ソリンゲンら(Van Solingen et al.)、J. Bact. 第130巻、946ページ(1977年)およびシアノら(Hsiano et al.)、Proc Nat Acad Sci, USA、第76巻、3829ページ(1979年)の方法により実施することができる。

【0066】

適切なベクターで選択宿主を形質転換し、宿主細胞を培養することによって、

コードされたポリペプチドを、多くは融合タンパク質の形態で、調製することができる。本発明のポリペプチドは、上述したように、迅速検定法により検出することができる。次いで、ポリペプチドを回収し、必要に応じて精製する。回収および精製は、当該技術分野で知られている手順のいずれかを用いて、例えば、アニオン交換樹脂への吸着と、それからの溶離により達成することができる。本発明のポリペプチドを生成するこの方法は、本発明のさらなる一態様を構成する。

【0067】

本発明のベクターによる宿主細胞の形質転換も、本発明のさらなる一態様をなしている。

さらなる一態様において、本発明は、本発明のポリペプチドと結合するリガンドを提供する。

【0068】

一実施形態において、そのリガンドは、本発明のポリペプチドに対して作製された抗体または抗体断片であってよい。そのような抗体はポリクローナルであってよいが、好ましくはモノクローナルである。

【0069】

ポリクローナル抗体は、引用により本明細書に組み込んだコエーラ (Koeille et al.)、Cell、第67巻、59~77ページ、1991年によって用いられた方法に従って調製することができる。有用な抗体生産プロトコールは、引用により本明細書に組み込まれた米国特許第5,514,578号に概説されている。モノクローナル抗体は、当該技術分野で知られている方法によって生産することができる。これらの方法として、Nature 第256巻、495~497ページ(1975年)にコーラーおよびミルスタイン (Kohler and Milstein) によって記載された免疫学的方法ならびに Science 第246巻、1275~1281ページ(1989年)にヒューズら (Huse et al.) によって記載された組換えDNA法などがある。米国特許第5,514,578号に詳述されているいずれの検定法も、本明細書で使用するために引用により本明細書に組み込まれる。

【0070】

B o 1 アレルゲン（特にリガンド結合ドメイン）とそのリガンドの三次構造およびその間の空間的相互作用の理解は、天然受容体のリガンド結合ドメインの修飾によってのみ結合され得る高度に特異的なリガンドを選択する方法を得る手がかりとなるであろう。また、この知識は、B o 1 アレルゲンとリガンドとの組合せを用いる新しい設計の方向、ならびにファージディファレンシャルディスプレイのような技術により、高い特異性を有するリガンドのペプチド疑似体を設計し、選択する方法を提供するであろう。

【0071】

他の実施形態において、リガンドは、植物、動物および昆虫を含む天然供給源から得られる本発明のポリペプチドに結合する分子を含む。B o 1 アレルゲンの疑似体を生成する昆虫抽出物は、特に興味深い。

【0072】

したがって、さらなる一態様において、本発明は、リガンドの存在について試料を検定する方法を提供する。リガンド結合剤またはプローブとしてポリペプチドを用いる検定法は、当該分野の研究者の能力の十分に範囲内にある。プローブとして用いるセグメントを選択することにより、機能的に関連した特定のセグメントを単離することができる。例えば、本発明によるポリペプチド結合ドメインのセグメントをプローブとして用いるならば、同じかまたは類似したポリペプチド結合ドメインを同定し、単離し、コーディングDNAを決定することができる。

【0073】

Bovicola ovis に対して高度に特異的なプローブを選択することにより、*Bovicola ovis* の存在を検出する迅速かつ高度に特異的な方法で試料を検定する機会が得られることも認識されるであろう。

【0074】

スクリーニングする物質を含む試料は、最初に基質溶液の形態で調製し、次いで、リガンド結合剤またはプローブに暴露させてよい。リガンド結合剤/リガンド複合体の存在は、当該技術分野においても知られている方法に従って検出することができる。そのような方法の例として、凝集法、ラジオイムノアッセイ、蛍

光法または酵素免疫検定法などがある。適切なスクリーニング試験は、E L I S A 検定法である。本発明によるこの方法では、B o 1 結合ドメインをリガンド結合剤として用いることが現在のところ好ましい。

【0075】

さらなる一態様において、本発明は、そのような検定法に用いるのに適した試験キットを提供する。そのような試験キットの例は、本発明によるリガンド結合剤を含むE L I S A 検定試験キットなどである。

【0076】

さらなる一態様において、本発明は、外寄生生物の個々の種または関連する群に対して特異的である外寄生生物の糞中に排泄された、ポリペプチドもしくはその断片または変異型あるいは他の抗原分子の存在について、試料を検定する方法を提供する。そのような方法の例として、凝集法、ラジオイムノアッセイ、蛍光法または酵素免疫検定法などがある。適切なスクリーニング試験は、外寄生生物の糞中の同定済みの抗原分子に結合するリガンド（または複数のリガンド）を含むE L I S A 検定法である。そのような検定法は、外寄生生物による宿主への外寄生の検出のための宿主から得られた複数の試料の便利かつ迅速なスクリーニングを可能にするであろう。

【0077】

本発明によるこの方法では、モノクローナル抗体を外寄生生物の外寄生を検出するためのリガンドとして用いることが現在のところ好ましい。

さらなる一態様において、本発明は、そのような検定法に用いるのに適した試験キットを提供する。そのような試験キットの例は、本発明によるリガンドを含むE L I S A 検定試験キットである。

【0078】

本発明のさらなる態様は、皮内皮膚試験により宿主におけるシラミに対する過敏症（およびしたがってシラミによる宿主への以前または現在の外寄生）を診断する方法を提供する。この方法では、本発明のポリペプチドもしくはその断片または変異型を宿主に皮内注射すると、過敏性宿主の皮膚に特徴的な特異的反応が誘発されるのに対して、非過敏性宿主ではほとんどまたは全く反応は誘発されな

い。過敏性宿主における反応は、注射部位における次の少なくとも1つの反応を含むであろう。すなわち、膨疹、発赤、硬結。アレルゲン調製物の注射と、隣接皮膚部位への陰性対照およびヒスタミンの注射とを用いた皮内皮膚試験を使用することは、当業者によく知られている。この方法の *in vitro* 相関も当業者によって認識されるであろう。そしてこれは、上で定義されているように、宿主の単離組織または単離細胞を本発明によるポリペプチドに暴露させ、該組織または細胞の免疫学的に媒介される刺激、例えば、血中好塩基細胞からのヒスタミンの放出、もしくはリンパ球の増殖または形質転換、を測定することを含む。本明細書で定義されている本発明によるポリペプチドの使用により、粗抗体調製物を使用する公表された方法（プフェッファー、フェーガンおよびバーニー（Pfeffer, Phegan and Bany）、1997年；バーニー、プフェッファーおよびフェーガン（Bany, Pfeffer and Phegan）、1995年；バーニー、プフェッファー、フェーガンおよびヒース（Bany, Pfeffer, Phegan and Heath）、1995年）と比較して、*Bovicola ovis* による宿主の免疫学的感作のそのような方法の特異性が高くなると思われる。

【0079】

タンパク質、ペプチドおよび/または特異的抗体もしくはこれらの実施形態を模擬する合成分子を用いた診断検定または試験は、本発明の一部であるとみなされ、第1に、動物における咬シラミの外寄生を特定するのに有用であり、第2に、*in vivo* または *in vitro* での外寄生された動物における過敏性を特定するのに有用であると思われる。

【0080】

さらに、主題のポリペプチド、ペプチドおよび抗体、もしくは特異的に結合するまたは主題のタンパク質、ペプチドおよび抗体を模擬する他の分子は、咬シラミによる外寄生を防除するか、もしくはそのような外寄生の結果として生ずる免疫学的過敏性を予防または抑制する新規の薬剤として用いることができ、それ自体、本発明の適用範囲に含まれることが当業者には明らかであろう。第1に、天然の形態または修飾された形態のタンパク質またはペプチド、タンパク質または

その一部の全コーディングDNA、タンパク質のすべてまたは一部を組み込んだ組換え体、タンパク質またはペプチドのコーディングDNAまたはRNAでトランスフェクトした、かつ/または該DNAまたはRNAを発現する生物、ならびにタンパク質またはペプチドをコピーまたは模擬した合成分子は、咬シラミに対する宿主における保護免疫を誘発するためのワクチンに調剤することができる。さらに、本発明によるタンパク質またはペプチドのエピトープに特異的な抗体もしくはこれらの抗体を模擬した合成分子は、宿主がシラミによる外寄生から部分的または完全に保護されるように受動的に免疫化するのに用いることができる。第2に、天然の形態または修飾された形態のタンパク質またはペプチド、タンパク質またはペプチドのコーディングDNAまたはRNAでトランスフェクトした、かつ/または該DNAまたはRNAを発現する生物、もしくは特異的モノクローナルまたはポリクローナル抗体または特異的抗体を模擬した合成分子は、咬シラミを損傷するため、もしくは咬シラミの生理学的過程を妨害するために用いることができる。第3に、天然の形態または修飾された形態のタンパク質またはペプチド、タンパク質またはその一部の全コーディングDNA、およびタンパク質またはペプチドを組み込んだ組換え体、タンパク質またはペプチドのコーディングDNAまたはRNAでトランスフェクトした、かつ/または該DNAまたはRNAを発現する生物、ならびにタンパク質、ペプチドまたは特異的抗体を模擬した合成分子は、咬シラミによる外寄生に応答して宿主動物で発現するアレルギー性過敏症を予防、改善または逆転させるための治療薬に製剤化することができる。これらの適用例をこの特許に含めることも意図されている。

【0081】

本発明によるタンパク質またはペプチドは、動物に投与したときにシラミに対する保護反応を引き起こすことができるワクチンに製剤化することができる。あるいは、本発明によるポリヌクレオチド分子は、ベクターまたはプラスミドに組み込むか、あるいは宿主に形質転換してもよく、これは動物に投与したときにシラミに対する保護反応を引き起こすことができる。また、抗体、抗体の断片、ファージディスプレイ分子、もしくはそのような分子を含むかまたは分泌する形質転換宿主を動物に全身投与し、それにより、受動的保護を提供することも可能で

ある。B o 1 タンパク質は、シラミの生活能力や生殖能力における重要な機能を担うものとして必要なものであり、したがって、本発明はこの機能を妨害し、それによりシラミによる外寄生を予防または防除するのに用いることができる。シラミにおけるタンパク質の機能を阻害するかあるいはタンパク質の産生の調節を阻害する合成または組換え分子は、本発明による配列の知識から設計し、合成し、動物に有利に投与することができる。シラミの外寄生によって引き起こされる過敏症は、本発明によるタンパク質、ペプチド、ポリヌクレオチド分子または形質転換宿主を、過敏性疾患をもたらす免疫応答の発生を防止またはダウンレギュレートする投与方法で、感受性動物に投与することによって、予防または低減することができる。そのような投与方法の例には、投与経路の変形形態や、様々なアジュバント、サイトカインまたは生物との併用投与が含まれる。本発明はまた、宿主動物で誘発された過敏症において重要なB o 1 タンパク質のBおよびT細胞エピトープを定義するのにも用いることができる。これは、オーバーラップ・ペプチドを合成し、過敏性宿主の抗体またはT細胞による個々のペプチドの認識を測定することによって行うことができる。そのような定義されたエピトープは、過敏性を予防または制御するのに使用できる。例えば、本発明によるタンパク質のエピトープを含むペプチドは、マスト細胞上の架橋I g Eとそれによるアナフィラキシーの誘発の危険を伴うことなく、動物宿主の脱感作に用いることができる。本明細書に記載する使用目的は、本発明による包含を意図したものである。

本発明を例示する非限定的な実施例を以下に与える。

上記の説明はあくまで例として提供されていること、また当業者に知られている材料および技術の変形形態が想定されることが認識されるであろう。

【0082】

プロトコール

実施例1

シラミ全体（丸ごと）およびシラミ糞から可溶性抗原を調製する。

生きている若虫および成虫*B o v i c o l a o v i s*を外寄生されたヒツジから採集し、ペトリ皿の片側を持ち上げて、シラミを低い側に移動させることに

より、羊毛および他のくずから分離してガラス製ペトリ皿に入れた。次いで、シラミをセラミック製乳鉢に入れ、液体窒素を加えて急速凍結した。乳鉢を液体窒素上に保持しながら、シラミを乳棒で破砕して微粉末とした。粉末を簡単に解凍し、1mM Pefabloc (登録商標) (Boehringer Mannheim) を含む冷リン酸緩衝生理食塩水をシラミ1グラム当たり10mlの割合で加えた。調製物を、氷上に保持したガラス製ホモジナイザーに移し、ホモジナイズした。調製物を超遠心分離(10000g、20分間、4℃)して、粒状物質を除去した。可溶性抗原を含む上清を無菌の0.2µmフィルターでろ過した。短期間の保存の場合、上清を4℃に保持した。長期間の保存の場合、上清をグリセロール(AnalaR (登録商標)、BDH)と1:1の容積比で混合し、-20℃で保存した。一般的に、グリセロールと混合した後の上清のタンパク質濃度は、5%トリクロロ酢酸で沈殿させた後にBCA Protein Assay (Pierce) を用いて測定したとき、2~3mg/mlであった。シラミ全体から調製した粗可溶性抗原の複合的な性質を図1に示す。

【0083】

シラミ糞を得るために、羊毛およびくずから分離したシラミを、ホプキンス(Hopkins)(1970年)、In vitro colonization of the sheep biting louse, *Bovicola ovis*. (Annals of the Entomological Society of America、第63巻、1196~1197ページ)の方法に従って制御した温度および相対湿度の条件下で清浄なガラス製ペトリ皿中に一夜保持した。次いで、シラミをプレート上に移し、プレートの表面に付着した死亡したシラミ、シラミの身体の部分または他の残骸を除去した。ガラスプレートに付着した糞ペレットを1mM Pefabloc (登録商標)を含む10mlのリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、氷上に保持したガラス製ホモジナイザーに移し、ホモジナイズした。次いで、この調製物を上記のように超遠心分離して、ろ過し、4℃で保存した。可溶性シラミ糞抗原調製物中のタンパク質濃度は、280nmにおける吸光度により、またはBCA Protein Assay (Pierce)により測定した。

【0084】

実施例2

ヒツジIgEの単離およびアフィニティーカラムへの結合

B. ovisを外寄生させたヒツジから採取した血清をELISAによりスクリーニングし、シラミ全体の可溶性抗原と結合するより高いレベルのIgEを含む血清を同定した。選択した血清を洗浄緩衝液(50mMリン酸緩衝液、500mM NaCl緩衝液、pH 7.0)と1:5の容積比で希釈し、0.2µmフィルターでろ過した。希釈した血清中のIgEを、ショーアールジェー、グリメット ディージェー、ドナヒー エムジェー、ゲイトハウス ティケー、シャイヤー シーエルおよびドウフ ピージェーシー(Shaw, R. J., Grimmett, D. J., Donaghy, M. J., Gatehouse, T. K., Shirer, C. L. and Douch, P. G. C.) 1996年、Production and characterisation of monoclonal antibodies recognising ovine IgE. Veterinary Immunology and Immunopathology、第51巻、235~251ページに記載されているように、ヒツジIgEに対する特異的なモノクローナル抗体をHiTrap NHS活性化カラム(Pharmacia Biotech)に結合させて作製したイムノアフィニティーカラムを用いて分離した。IgE特異アフィニティーカラムからの溶出物を洗浄緩衝液に対して透析し、非関連モノクローナル抗体またはプロテインGを結合させたアフィニティーカラム上に調製物を通してさらに精製した。得られた調製物を還元条件下でSDS PAGEにより分析したところ、IgE重鎖および軽鎖を代表するバンドが高い純度(90%以上)で得られた。製造業者の推奨により、約10mgのヒツジIgEを1mlのHiTrap NHS活性化カラム(Pharmacia Biotech)に結合させた。

【0085】

実施例3

ヒツジIgEイムノアフィニティー・クロマトグラフィーを用いたBovicola ovisからの天然アレルゲンの分離

粗可溶性 B . o v i s および B . o v i s 糞抗原調製物を、希釈を洗浄緩衝液 (5 0 m M リン酸緩衝液、5 0 0 m M N a C l 緩衝液、p H 7 . 0) を用いて行った以外は、実施 1 と同様に調製した。希釈した抗原調製物を、実施例 2 のように作製したヒツジ I g E イムノアフィニティーカラム上に載せた。次いで、カラムを洗浄緩衝液で洗浄し、天然アレルゲンを p H 3 . 0 の 1 0 0 m M グリシンで溶離させた。溶出物を、1 M トリス、1 . 5 M N a C l、p H 8 . 0 を 1 : 1 0 (v / v) の比率で加えて中性 p H に戻した。アレルゲン溶出物を限外ろ過 (M i c r o s e p T M C e n t r i f u g a l C o n c e n t r a t o r s、P a l l F i l t r o n C o r p o r a t i o n、カットオフ 3 0 0 0 k D) により濃縮し、S D S - P A G E により還元条件下で検査した。皮内皮膚試験から、シラミ全体およびシラミ糞抗原調製物からの溶出物はアレルゲンを含んでいることが確認された。

【 0 0 8 6 】

実施例 4

モノクローナル抗体の調製

B A L B / c マウスに、フロイントの完全アジュバントと 1 : 1 の比率で混合したシラミ糞抗原調合物 (総タンパク質最高 1 m g) を皮下注射し、同様の量のシラミ糞抗原をフロイントの不完全アジュバントとともに 2 回腹腔内注射して追加免疫した。マウスの血清試料をシラミ糞抗原との反応性について E L I S A で検定して、強い抗体反応を示したマウスを特定した。選択したマウスの脾臓リンパ球を標準的技術により N S - 1 ミエローマ細胞と融合させた。得られたハイブリドーマを、B A L B / c 胸腺細胞でならした選択培地を用い、5 枚の 2 4 ウェル・プレート上で 1 m l 培養で培養した。その後、ウェル中の培地を、マウス I g G 抗体認識可溶性糞抗原について E L I S A でスクリーニングした。陽性ウェルからのハイブリドーマを、9 6 ウェル培養プレートで、ウェル当たり細胞 0 . 5、1 および 2 個の平均濃度で限界希釈培養に供した。これらのハイブリドーマを、再び抗体認識粗可溶性シラミ糞抗原についてスクリーニングした。抗体と実施例 3 に記載したように調製した分離天然アレルゲンとの反応性を確認するために、糞アレルゲンに対する抗体を産生したクローンも E L I S A によりスクリー

ニングした。天然アレルゲンに対する抗体を産生すると確認された単一ハイブリドーマを限界希釈により第2回目としてクローニングした。第2クローニングからのハイブリドーマを増殖させ、低温保存した。将来の使用のために選択したモノクローナル抗体は、マウスIgG-1アイソタイプであった。モノクローナル抗体の産生のために、クローンしたハイブリドーマを標準培養法により、増殖させ、発育過多にし、上清を採集した。

【0087】

ハイブリドーマによって産生されたモノクローナル抗体は、粗シラミまたはシラミ糞抗原のウエスタン・プロットで28.5 kDa rMWの主要部分を有する免疫優性分子を認識した(図2)。これは、シラミ全体およびシラミ糞抗原調製物のIgEアフィニティー・クロマトグラフィーによって得られた推定上の天然アレルゲンのSDS PAGE上で認められた主要バンドの1つに対応していた。微量バンドも約14, 42, 83 kDa rMWに認められた。より高いrMW部分は14 kDaバンドの多重バンド、すなわち、 $2 \times 14 = 28$ (~28.5)、 $3 \times 14 = 42$ および $6 \times 14 = 84$ (~83) であると思われる。

モノクローナル抗体によって同定されたタンパク質を、Bo1と称した。

【0088】

実施例5

Bo1アレルゲンの精製

実施例4で述べたように調製したモノクローナル抗体をプロテインGアフィニティー・クロマトグラフィーで精製し、実施例2に記載したのと同様の方法でHiTap NHS活性化カラム(Pharmacia Biotech)に結合させた。このカラムは、実施例1で述べたように調製した可溶性のシラミ全体の抗原から溶出物を得るのに用いた。

【0089】

モノクローナル抗体アフィニティーカラムからの溶出物は、高純度で、SDS PAGE(図1)およびモノクローナル抗体でプローブしたウエスタン・プロットによって粗シラミ抗原中に認められたタンパク質と一致した特性を有するタンパク質を含んでいた。さらに、精製された抗原は、ウエスタン・プロットおよ

びELISAにおいて、シラミが外寄生したヒツジからのIgEによって認識された(図8)。皮内皮膚試験で、シラミが外寄生していない子羊と比較して、シラミが外寄生した子羊におけるBo1に対する特異的応答性が確認された(図7)。

【0090】

実施例6

Bo1アレルゲンのアミノ酸配列

モノクローナル抗体アフィニティーカラムを用いて精製した天然Bo1を還元条件下でSDS PAGEに供し、配列決定用のタンパク質を調製する標準的手法を用いてPVDF膜(Problott(商標)、Applied Biosystems)にエレクトロブロットングした。PVDF膜を0.1% Ponceau Sで染色したところ、28.5kDaバンドが同定され、切り出した。膜断片を0.1%トリエチルアミンを含むメチルアルコールで簡単に洗浄した後、メチルアルコールのみで2回洗浄した。自動マイクロシーケンシングを気相機器(470AR/120A/920A/610A、Applied Biosystems)で行った。得られたN末端アミノ酸配列は、

(a) SPTELDLRLLLVETARDISVILFKNLHAGYNであった。

【0091】

ゲル中トリプシン消化物のための還元条件下でのSDS PAGE後に、ゲルからBo1の28.5kDaも切り出した。ゲル中トリプシン消化物は、ロゼンフェルド ジェー、カプデビレ ジェー、グレモ ジェーシーおよびフェララピー(Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillomot, J.C. and Ferrara, P. (1992年)、In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis、Analytical Biochemistry、第203巻、173~179ページのプロトコールに従った。ゲルから溶出したペプチドを、マイクロボアHPLC

(PE Biosystems、140Aデリバリ・系および1000Sダイオード・アレイ検出器)に装着したPhenomenex Jupiter C18カラム(300オングストローム、5ミクロン、2×250mm)で分離した。選択したペプチドを、製造業者によって供給された化学薬品および方法を用いてPE Biosystems Prociseタンパク質シーケンサー(model 492)での配列決定に供した。以下の配列が得られた。

【0092】

- (b) DISVILFK
- (c) NLHAGYNEVNP K
- (d) VFTNIK
- (e) IGEQVLK
- (g) (I) NVIFK
- (g) KLF DTEVPEVVK
- (h) DISVILFK
- (i) IEILLNELAPEAK
- (j) TLIGALDQ(L)K

【0093】**実施例7****RNA単離およびcDNAライブラリー構築**

フレンケル エムジェー、サビン ケーダブリュー、ベッカー アールイーおよびワード シーダブリュー(Frenkel M.J., Savin K.W., Bakker R.E. and Ward C.W. (1989年)、Characterization of cDNA clones coding for muscle tropomyosin of the nematode *Trichostrongylus colubriformis*, Molecular and Biochemical Parasitology、第37巻、191~200ページによって記載されたのと実質的に同様に、*B. ovis*からRNAを分離した。液体窒素で急速凍結した*B. ovis* (100mg)を乳棒と乳鉢で液体窒素上で粉砕した。1mlの6Mグアニジン-HC

1、0.2 M酢酸ナトリウム (pH 5.2) および10 mM -メルカプトエタノールを加え、*B. ovis*と共に粉碎し、粉末をエッペンドルフ・チューブに入れた。200 μ lの95%エタノールを加え、混合物をドライ・アイス/エタノール上に5分間置いた。混合物を4 で5分間遠心分離し、次いで、ペレットを500 μ lの6 Mグアニジン - HCl、0.2 M酢酸ナトリウム (pH 5.2) および10 mM EDTA中に懸濁した。エタノール沈殿と遠心分離を繰り返して、ペレットを250 μ lの尿素緩衝液 (7 M尿素、100 mMトリス - HCl (pH 7.5)、0.1 mM EDTA、0.1% (w/v) SDS) に懸濁し、500 μ lの水飽和フェノール:クロロホルム (1:1) を加えた。4 で10分間遠心分離した後、水層を新しいチューブに移し、RNAをエタノールで沈殿させ、乾燥し、50 μ lの2回蒸留水に再懸濁した。

【0094】

B. ovis mRNAからZAP - cDNA (登録商標) Synthesis Kit (Stratagene) を用いてcDNAライブラリーを合成した。cDNAは、T4 DNAリガーゼでバクテリオファージ Uni - ZAP TM XRベクター・アームに結合させ、GIGAPACK (登録商標) II Packaging Extractでパッケージした。

【0095】

実施例8

Bo1の完全コーディングDNAのクローニングおよびキャラクタリゼーション

Bo1アミノ酸配列に基づいて、オリゴヌクレオチドプライマー (BoP14 - A) を、アミノ末端領域 (実施例6におけるアミノ酸配列 (a)、(b)、(c) および (h)) をコードするBo1 cDNAとハイブリッド形成するように設計し、第2のオリゴヌクレオチド (BoP14 - B) を、内部ペプチド (実施例6におけるアミノ酸配列 (g)) をコードするBo1 cDNAとハイブリッド形成するように設計した。このオリゴヌクレオチドは、*B. ovis* mRNAから誘導されたcDNAを用いるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) におけるプライマーとして用いるとき、それらが介入cDNAを増幅するようにcDNA

の対側鎖とハイブリッド形成するように設計した。

【0096】

BoP14 - A CATGCTGGATATAATGAAGT (A/T) AA
(C/T) CC

BoP14 - B TTAACAACCTTCAGGAACTTC (A/T) GT
(A/G) TC (A/G) AA

【0097】

PCR反応の条件は、プライマー0.3 μM、dNTPs 200 μMおよび鋳型20 ng、3サイクルの94 で30秒間、45 で60秒間および72 で60秒間；30サイクルの94 で30秒間、50 で60秒間および72 で60秒間；ならびに72 に10分間保持。

【0098】

PCR後に、アガロース・ゲル電気泳動により、約390 bpの増幅されたDNA断片が同定された。この断片をWizard (登録商標) PCR Prep s DNA Purification System (Promega) を用いて精製し、次いで、RTS RadPrime DNA Labelling System (Life Technologies) を用いて[-³²P] dCTPで放射性標識した。サムブルック ジェー、フリッツ イーエフおよびマニアティス ティー (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.) (1989年)、Molecular cloning: a laboratory manual、第2版、New York (Cold Spring Harbour Laboratory Press) に記載されているのと実質的に同様に、放射性標識したBo1 cDNAプローブを用いて、B. ovis cDNAライブラリーをスクリーニングし、Bo1 cDNAと相同のDNAクローンを同定した。ライブラリーからの約45000のファージ・クローンを、E. coli XL1-Blue MR Fの細胞を含む寒天プレート上にのせ、インキュベートして、ファージ・プラークを生成させた。プラークをHybond-N+ナイロン膜 (Amersham) 上に複製し、プローブとのハイブリッド形成のために処理した。陽性ハイブリ

ッド形成クローンを同定し、クローンになるまでこれらをブランク精製した。cDNAクローニング部位を包囲するDNAとハイブリッド形成したプライマーを用いてPCRにより、B. ovis cDNA挿入断片を増幅し、そのPCR産物の配列を決定した。配列から、Bo1アレルゲンの完全コーディング配列を識別することができた(配列番号1)。この配列は、アミノ末端分泌リーダー配列を有する約30kDaのタンパク質を予測する。ヌクレオチド配列から、B. ovisを認識したコドン優先配列(codon preference)ならびに実施例6で決定されたN末端および内部配列を用いて、アミノ酸配列(配列番号2)が導かれた。

【0099】

実施例9

組換えBo1タンパク質の発現

N末端アミノ酸配列(実施例6、アミノ酸配列(a))から予測された成熟Bo1タンパク質に対するコーディングcDNAを、B. ovis cDNA鋳型からPCRにより増幅した。Bo1 cDNAを増幅するためにPCR反応で用いたオリゴヌクレオチド・プライマーは、上で得られたcDNA配列(配列番号1番)から設計した。プライマーは以下の通りであった。

【0100】

Bo1 - X2 CTTGCGGCCCGCCATTTTTTGCAACACAGT
CTG

Bo1 - X3 CGCGGATCCATATGTCCCCAACAGA ACT
CGAT

【0101】

プライマーBo1 - X2は、完全な精製Bo1タンパク質のアミノ酸配列決定(実施例6におけるアミノ酸配列(a))によって同定された成熟タンパク質のアミノ末端をコードするBo1 cDNAと相同となるように設計した。プライマーBo1 - X3は、カルボキシル末端Bo1アミノコーディングDNA(配列番号1)と相同となるように設計した。プライマーはまた、増幅したDNAを発現ベクターに結合させることを可能にする制限酵素切断部位も含んでいた。Bo

1 - X 2 および B o 1 - X 3 プライマーならびに B o 1 c DNA 鋳型を用いた標準 P C R 反応 (3 5 サイクルの 9 5 で 3 0 秒間、 5 0 で 3 0 秒間および 7 2 で 1 分間) の後に、約 7 0 0 b p の生成物がアガロースゲル電気泳動により分離された。この P C R フラグメントを N d e I および N o t I エンドヌクレアーゼによって消化し、 p B A D 1 8 の派生物 (グズマン エル、ベリン ディー、カーソン エムジェーおよびベックウイズ ジェー (Guzman , L . , Belin , D . , Carson , M . J . and Beckwith , J .) (1 9 9 5 年) Tight regulation , modulation , and high - level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter . J . Bacteriol 第 1 7 7 巻、 4 1 2 1 ~ 4 1 3 0 ページ) である A Y 2 - 4 ベクター中にクローンしたところ、図 3 に示す B o 1 発現ベクターが得られた。増幅したコーディング DNA を発現ベクターと結合させたところ、完全成熟 B o 1 コーディング配列と発現ベクターの開始メチニオンコドンとの N d e 1 制限酵素切断部位における融合が得られた。 B o 1 c DNA のカルボキシルコーディング末端が、 E 標識エピトープ (Pharmacia) および終止コドンが続くノナペプチド A A A H H H H H H をコードする DNA を含むフレーム内でベクター DNA に対して N o t 1 部位において結合していた。発現ベクターはアラビノース P B A D プロモーターからのライゲートしたコーディング DNA の発現を駆動し、したがって、 E . coli X L 2 にエレクトロポレーティングするとき、増殖培地中で外因性アラビノースに应答して、組換え B o 1 が生成する (グズマン エル、ベリン ディー、カーソン エムジェーおよびベックウイズ ジェー (Guzman , L . , Belin , D . , Carson , M . J . and Beckwith , J .) (1 9 9 5 年)) 。このようにして生成した組換え B o 1 は、 E 標識エピトープおよびノナペプチド A A A H H H H H H を含むカルボキシル末端融合部を有する。

【 0 1 0 2 】

培地 (Luria - Bertani 培地、 Sigma、 1 0 0 μ g / m l のアンピシリン (Sigma) を含む) に 0 . 2 % L (+) アラビノースを加えて、

形質転換した *E. coli* を誘導して、組換え B o 1 を発現させた。発現された組換えタンパク質を細菌細胞ゾル中で生成させ、細菌の音波処理により抽出し、遠心分離して不溶性物質を除去した。次いで、組換え B o 1 (r B o 1) を、固定化ニッケルに対するカルボキシル末端におけるヘキサヒスチジン標識の親和性を用いる固定化金属アフィニティー・クロマトグラフィー (Hi T r a p T M キレートカラム、Amersham Pharmacia Biotech AB) により精製し、漸増濃度のイミダゾール培地で溶離した。r B o 1 の一部の調製物を B o 1 m A b アフィニティーカラム (実施例 5) 上でさらに精製した。組換えタンパク質はカルボキシル末端融合パートナーを有するので、還元条件下の SDS PAGE 上の天然タンパク質よりも高い r M W (約 29.5 k D a) を有する (図 4) 。

【 0 1 0 3 】

r B o 1 は、ウエスタン・ブロット (図 4) および E L I S A において B o 1 m A b によって認識された。予備的試験において、r B o 1 は、E L I S A において、シラミに外寄生されていないヒツジと比較して、シラミに外寄生されたヒツジの I g E によっても優先的に認識された。

【 0 1 0 4 】

実施例 10

B . o v i s に対する B o 1 m A b の特異性

ニュージーランドにおいてヒツジが暴露される可能性のある代表的な様々な昆虫およびダニから調製した可溶性抗原との反応性を測定することによって、B . o v i s に対する B o 1 m A b の特異性を E L I S A で検討した。抗原は、成虫チョウバエ、成虫カおよびクロバエの蛆から、ガラス・ホモジナイザーを用いて 1 m M P e f a b l o c (登録商標) (ベーリンガー マンハイム (B o e h r i n g e r M a n n h e i m)) を含む冷 P B S 中で昆虫を破碎して調製した。抗原調製物を遠心分離により清澄化した。B . o v i s 抗原は、実施例 1 で述べたように調製した。D . p t e r o n y s s i n u s 抗原は、市販品を入手した (A l l e r g e n i c E x t r a c t , S t a n d a r d i z e d M i t e D P 、 バイエル社 (B a y e r C o r p o r a t i o n)) 。適切な

希釈後に、抗原を用いてマイクロタイター・プレートのウェルにコーティングし、Bo1 mAbを第一抗体とし、ヤギ抗マウスIgG複合体を標準プロトコールを用いた第二抗体として用い、ELISAを実施した。Bo1 mAbは、Bovisから調製した抗原とのみ本質的な反応性を示した(図5)。

【0105】

実施例11

シラミ外寄生を検出するための*in vitro*診断検定におけるBovis特異抗体の使用

以下の実施例に示すように、抗原捕捉ELISAを用いて、シラミに外寄生されたヒツジと外寄生されていないヒツジの羊毛におけるBo1の存在の有無について試験した。

【0106】

牧草地で飼育されていたシラミに外寄生された29匹の子羊と外寄生されていない12匹の子羊について、あらかじめ決定しておいた身体の12部位における長さ10cmの羊毛の分けた部分に認められたシラミの総数を数えることにより、シラミ外寄生の程度を評価した。これらの子羊の肩の中央部から羊毛試料を皮膚レベルで切り取って、個別の紙袋に入れ、室温で保存した。各試料から1gの羊毛をガラス容器に入れ、20mlの緩衝液(PBSおよび0.5%トゥーン20)と室温で2時間混合した。上清を傾斜し、以下の抗原捕捉ELISAに用いた。

【0107】

Bo1に対する特異的なモノクローナル抗体(Bo1 mAb)を、ハイブリドーマ上清からプロテインGアフィニティー・クロマトグラフィーカラム(ファーマシア(Pharmacia))で精製し、30kDa Ultrafree(登録商標)-15 Centrifugal Filter Device(ミリポア(Millipore))を用いて濃縮した。精製Bo1 mAbの半分を製造業者の推奨に従って、NHS-LCビオチン(ピース(Pierce))でビオチン処理した。Maxisorp(商標)マイクロタイター・プレート(ヌンク(Nunc))を室温で2時間、PBS中非ビオチン処理Bo1 mAb

b (2 μ g/ml) でコーティングし、洗浄緩衝液 (150 mM NaCl、10 mMリン酸緩衝液中0.05% トウイーン20、pH 7.2) で3回洗浄し、プロット (0.5% トウイーン20を含む10 mMリン酸緩衝液、pH 7.2) および5% ウシ・スキムミルク粉によりブロックした。さらに6回洗浄した後、羊毛試料の未希釈抽出物、陽性対照 (シラミ全体の粗可溶性抗原を含むPBS) および陰性対照 (PBSおよび0.5% トウイーン20) をプレートに2連にして室温で加えて1時間置いた。プレートを再び6回洗浄し、ビオチン処理したBo1 mAb (2 μ g/ml) を室温で加えて1時間置いた。6回洗浄した後、ストレパビジン - 西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ複合体 (2 μ g/ml) を室温で加えて1時間置いた。テトラメチルベンジジン基質を用いて酵素反応を発生させ、1 M硫酸で反応を停止し、ウェルの吸光度を450 nmの波長で読み取った。

【0108】

シラミに外寄生されていなかった12匹の子羊のすべてがシラミ・スコアが0であり、ELISAで陰性であった (図6)。シラミに外寄生された29匹の子羊の結果は、シラミ・スコアと有意に相関していた ($r = 0.77$ 、 $P < 0.001$ 、図6)。この検定法を用いてヒツジの群におけるシラミの外寄生を検出することができ、それにより、農業家が抗シラミ処理を理にかなって使用するのを助けることができ、その結果として、ヒツジ製品および環境中の化学物質の残留が低減される。

【0109】

実施例12

精製Bo1抗原を用いる皮内皮膚試験によるBovisに対する免疫学的過敏性のin vivo診断

12カ月齢の、シラミに外寄生されていなかった3匹の子羊と外寄生された3匹の子羊を用いた。上肩甲部から被毛を短く剪毛して、子羊を皮内皮膚試験に備えさせた。抗原および対照溶液を0.1 mlの容量で皮内注射した。注射0.5、5、24および48時間後に皮膚反応の直径を測定した。Bo1は、実施例5で述べたように精製した。中和溶出緩衝液中Bo1をPBSで約6.0 μ g/ml

1 (280 nmでの吸光度により測定) に希釈した。PBSで同様に希釈した中
和溶出緩衝液をBo1に対する陰性対照溶液とした。実施例1で述べた、B.o
v.i.s全体から調製した粗可溶性抗原を100 µg/mlに希釈した。粗B.o
v.i.s抗原に対する陰性対照は、PBSとグルセロールとの1:1混合物であり
、同様に希釈した。PBS中塩酸ヒスタミン(1/250000、w/v)をヒ
スタミンに対する反応性を試験するのに用いた。

【0110】

皮膚試験の結果から、シラミに外寄生された子羊においてのみ粗B.o v i s
抗原およびBo1に対する実質的反応があったことがわかる(図7)。30分間
以内の反応は、リアギン(一般的にIgE)抗体媒介メカニズムに起因した過敏
症に特有のものであったのに対して、5時間以上に及ぶ反応は細胞性メカニズム
を示すものである。

【0111】

実施例13

B.o v i sに対する免疫学的過敏性を検出するためのin vitro検定
におけるBo1抗原の使用

B.o v i sに対する過敏性を診断するための皮内皮膚試験に代わるものとし
て、ヒツジ血清中のBo1に対して特異的なIgEを検出するのにELISAま
たは同様の検定法を用いることができる。あるいは、寄生生物への宿主の暴露の
証拠を提供するBo1に対する特異性を有する他のヒツジ免疫グロブリン・アイ
ソタイプを検出するのに同様の検定法を用いることができる。

【0112】

Bo1特異IgEを検出するために、ヒツジの個々の血清試料をSAS(飽和
硫酸アンモニウム溶液)で処理して、競合IgGのレベルを低下させた。生理食
塩水中70% SASを血清試料に1:1の比率(v/v)で定期的に混合しなが
ら加えて30分間置いた。沈殿物を遠心分離(1300g, 10分)し、上清を
0.1% トウイーン20を含む蒸留水で1:8に希釈し、最終希釈度を1/16
とした。標準ELISA法に従ったが、これを簡単に述べる。96ウェル・マイ
クロタイタープレートをアフィニティー精製Bo1(PBS中1/100)で室

温で5時間コートした。プレートを0.5%トウイーン20を含む10mMリン酸緩衝液、pH7.2および5%ウシ・スキムミルク粉により1時間ブロックし、次いで、洗浄緩衝液(150mM NaCl、10mMリン酸緩衝液中0.05%トウイーン20、pH7.2)で6回洗浄した。SAS処理血清を2連でウェルに加え、室温に1時間、次いで、4に一夜保持した。次いで、プレートを洗浄緩衝液で6回洗浄し、希釈緩衝液中抗ヒツジIgEモノクローナル抗体(5mg/ml BSA、PBS中0.1%トウイーン20)を室温で加えて4時間置いた。洗浄した後、ヤギ抗マウスIgG複合体を西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ(シグマ(Sigma)A3673、希釈緩衝液中1/1000)を37で加えて1時間置いた。プレートを再び洗浄し、0.1M酢酸緩衝液pH6.5+0.1% DMSO中テトラメチルベンジジン(0.1mg/ml、シグマ(Sigma)T8768)および0.03%過酸化水素を加えて15分間置いた。1M硫酸で反応を停止し、450nmでの吸光度を自動プレート・リーダーで読み取った。Bo1を用いたELISAの結果を、粗Bovis抗原を用いた同様なELISAと比較した(図8)。

【0113】

シラミ全体抗原と精製抗原でコーティングしたプレートとを用いたELISAにより、シラミに外寄生されていなかったヒツジよりもシラミに外寄生されたヒツジの血清IgEの有意に高い反応性が示された(それぞれP=0.0001および0.0025、図8)。シラミに外寄生されたヒツジの63%(19/30)が、シラミに外寄生されていなかったヒツジの血清を用いて得られた吸光度の平均値+2標準偏差よりも大きいBovis特異的IgE吸光度を示した(図8)。シラミに外寄生されたヒツジの50%(15/30)の血清が、同じ基準に基づいたとき、精製Bo1アレルゲンに対するIgEの高い吸光度を示した。このデータは、精製アレルゲンがBovisの主要なアレルゲンであることを示している。これらの血清のうちの13血清で、両抗原調製物に対する高いIgE反応が検出された(図8)。しかし、シラミに外寄生されたヒツジの群内では、IgE反応と両抗原調製物との間の中等度の相関のみが認められた($r=0.49$ 、 $P>0.006$)。このことは、粗シラミ抗原における他の抗原の存在か

つ/または精製 B o 1 アレルゲンを用いたとき非特異的反応性がより低いことを示唆している。

【0114】

考察

本出願者らは、シラミ B . o v i s の抗原に対して特異的な血清抗体反応 (I g G および I g E を含む) と、シラミ B . o v i s 抗原による攻撃に应答しての、皮膚を排液するリンパ節から得られたリンパ球の特異的増殖とを、初めて i n v i t r o で示した。さらに、皮内皮膚試験によりシラミに対する免疫応答が示され、この場合、1時間以内の反応は主としてレアギン抗体 (I g E および他の同種細胞親和性抗体) の存在を反映しており、24時間以上に及ぶ反応の持続は主として細胞性細胞性メカニズムを反映している。これらの種々の免疫応答の特異性は、同じ条件下に維持したシラミに外寄生されたヒツジにおける応答をシラミに外寄生されていないヒツジにおける応答と比較して判定した。シラミに対する免疫応答の性質ならびに、シラミに外寄生されたヒツジにおける毛皮の欠陥をもたらす表在性皮膚炎であるしわ (C o c k l e) という概念を支持する組織学によって判定されたしわ病変の特性は、シラミに対するアレルギー性 (または過敏性) 免疫応答の結果である。本発明による新規のアレルゲンと、それに結合するリガンドは、B . o v i s 感染と関連するアレルギー疾患の診断、予防および治療に用いることができ、羊毛および毛皮の質の改善、合成殺虫剤の使用量の低減、ならびに農業家の経済上の利得の改善につながる。

【0115】

「含む」(またはその文法上の変形形態)という語を用いる場合には、この語は、限定することを意図するものでなく、また、本発明における他の特徴または要素の存在を除外するものでないことを本明細書を通じて認識すべきである。したがって、「含む」という語は「包含する」という語と同等である。

【0116】

本発明の態様はあくまで例として説明されており、それに対しては特許請求の範囲に定義されている適用範囲から逸脱することなく修正および追加を行えることを認識すべきである。

【0117】

【表1】

配列表

(1) 一般的情報：

(iii) 配列の数：2

(2) 配列1の情報

(i) 配列の特徴

(A) 配列の長さ：xxx 塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：cDNA

(ix) 特徴：

(A) 名称／記号：

(B) 位置：

(xi) 配列の記述: 配列番号1:

ATCAAACAACCAATGCAGGATTAABATTAATTTTCGTGCGCTTTTGGCAGTTTTCGCTGTGGGTGTGAGGGAATACCTTGGTCAAATCC
M Q G L K L I F V A F L A V P A V G C E G N T L V K S

CCACAGAACTCGATCTTCGTCTTCTGTGAAACCGCTCGAGATATCTCTGTCATCTTGTTTAAAAACTTACATGCTGGATATTAATGAAGTT
P T E L D L R L L V E P A R D I S V I L F K N L H A G Y N E V

AACCCCAAAATCGAAATACTGTTGAACGAATTGGCCCCGAGCTAABAGAAGGACTCCAAAAATTAATAAAGAAATAGAGATTTGGTCAAT
N P K I E I L L N E L A P E A K E G L Q K I I K E I R D L V N

GAAGAAGAACCGAATTAATGTCATCTTCAAACTCTTATTTGGTCTTTGGACCACTGAAACCAATTAAGGCACCATGCGCCGACCCCGTT
E E T R I N V I F K T L I G A L D Q L K P I K A P C A D P V

TCTAAAGAAGCTAAAAATGGCCACGATGTTGAAAGGGAATCGTCAAATTCATTAATATTTAGAACAAAATACGAAAAGGTAATTAACA
S K E A K K L A N D V E R E I V K F I K Y L E Q K Y E K V F T

AACATCAGAAATGGAGTTACCAAAGTAATCACCAGAGCCAGGAATTTGTTGACACTGAAGTTCCCGAAGTCGTGAATGTTTGACCCCCAAA
N I K N G V T K V I T R A R K L P D T E V P E V V K C L T P K

AACAAGAGCCCACTAATGCATCAATACACACATCGACAAAATTTCTGGTGAAGTTGCCAAATCGGTGCCGACATTTGGACTCTTTGTAATC
N K E A T K C I N F H I D K I L G E V A Q I G A D I G L L V I

TCTTCTGAAGAAGCTCTTAATCCCGTTATTAAGGAAGTTGTGCGCAAAATAGGTGACACAGTGTGGAAGTTTGGGTGAGGTAGGCCCAT
S S E E A L N P V I K E V V A K I G E Q V L K V L G E G R P I

ATCAAACAATCTCAGACTGTGTTGCAAAAATGTAAGAAATAAAAAGAAATAAGTNBATAAATTAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTT
I N K I S D C V A K H

CTTTAATGCCCAACAAAAAATTAATAATTTTAAATTAATTTAAAAATTAABAAAAA

(2) 配列番号2の情報

(i) 配列の特徴

- (A) 配列の長さ: 275アミノ酸
- (B) 配列の型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: タンパク質

(ix) 特徴:

- (A) 名称/記号:
- (B) 位置:

(xi) 配列の記述: 配列番号2:

Met Gln Gly Leu Lys Leu Ile Phe Val Ala Phe Leu Ala Val Phe Ala Val Gly Cys Gln	
10	
Gly Asn Thr Leu Val Lys Ser Pro Thr Glu Leu Asp Leu Arg Leu Leu Val Glu Thr Ala	20
30	
Arg Asp Ile Ser Val Ile Leu Phe Lys Asn Leu His Ala Gly Tyr Asn Glu Val Asn Pro	40
50	
Lys Ile Glu Ile Leu Leu Asn Glu Leu Ala Pro Glu Ala Lys Glu Gly Leu Gln Lys Ile	60
70	
Ile Lys Glu Ile Arg Asp Leu Val Asn Glu Glu Glu Thr Arg Ile Asn Val Ile Phe Lys	80
90	
Thr Leu Ile Gly Ala Leu Asp Gln Leu Lys Pro Ile Lys Ala Pro Cys Ala Asp Pro Val	100
110	
Ser Lys Glu Ala Lys Lys Leu Ala Asn Asp Val Glu Arg Glu Ile Val Lys Phe Ile Lys	120
130	
Tyr Leu Glu Gln Lys Tyr Glu Lys Val Phe Thr Asn Ile Lys Asn Gly Val Thr Lys Val	140
150	
Ile Thr Arg Ala Arg Lys Leu Phe Asp Thr Glu Val Pro Glu Val Val Lys Cys Leu Thr	160
170	
Pro Lys Asn Lys Glu Ala Thr Lys Cys Ile Asn Thr His Ile Asp Lys Ile Leu Gly Gln	180
190	
Val Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Gly Leu Leu Val Ile Ser Ser Glu Glu Ala Leu Asn	200
210	
Pro Val Ile Lys Glu Val Val Ala Lys Ile Gly Glu Gln Val Leu Lys Val Leu Gly Glu	220
240	
Gly Arg Pro Ile Ile Asn Lys Ile Ser Asp Cys Val Ala Lys Met .	260
270	

【0118】

【表2】

REFERENCES

- Bany J, Pfeffer A and Phegan M (1995). Comparison of local and systemic responsiveness of lymphocytes in vitro to *Bovicola ovis* antigen and Concanavalin A in *B. ovis*-infested and naïve lambs. *International Journal for Parasitology* 25:1499-1504.
- Bany J, Pfeffer A, Phegan M and Heath ACG (1995). Proliferative responses of lymphocytes in *Bovicola ovis*-infested lambs. *International Journal for Parasitology*. 25:765-768.
- Cleland PC, Dobson KJ and Meade RJ (1989). Rate of spread of sheep lice (*Damalinia ovis*) and their effects on wool quality. *Australian Veterinary Journal*. 66: 298-299.
- Heath ACG, Cole DJW, Bishop DM, Pfeffer AT, Cooper SM, and Risdon P (1995). Preliminary investigations into the aetiology and treatment of Cackle, a sheep pelt defect. *Veterinary Parasitology*. 56:239-254.
- Heath ACG, Cooper SM, Cole DJW and Bishop DM (1995). Evidence for the role of the sheep biting-louse *Bovicola ovis* in producing cackle, a sheep pelt defect. *Veterinary Parasitology*. 59:53-58.
- Johnson PW, Boray JC, Plant JW and Blunt SC (1993). Prevalence of the causes of fleece derangement among sheep flocks in New South Wales. *Australian Veterinary Journal* 70:220-224.
- Kettle PR and Lukies JM (1982). Effects of sheep lice (*Damalinia ovis*) on wool colour. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*. 10:15-17.
- Kettle PR and Lukies JM (1984). Recovery of sheep lice (*Damalinia ovis*) from baled wool: a technique enabling nation-wide surveillance of louse ridden flocks. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 12:39-42.

Lipson M and Bacon-Hall RE (1976). Some effects of various parasite populations in sheep on the processing performance of wool. *Wool Technology and Sheep Breeding*. pp18-20.

McLeod RS (1995). 'Costs of major parasites to the Australian livestock industries'. *Proceedings of the Australian Society for Parasitology Annual Meeting, 1994*. In the *International Journal for Parasitology* 25:1363-1367.

Pfeffer AT, Bany J, Phegan MD and Osborn PJ (1993). 'Hypersensitivity skin testing of lambs infested with the biting louse (*Bovicola ovis*)'. *Proceedings of the 23rd Conference of the NZ Society for Veterinary and Comparative Pathology, November 1993*. In *New Zealand Veterinary Journal* 42:76.

Pfeffer A, Phegan MD and Bany J (1997). Detection of homocytotropic antibody in lambs infested with the louse, *Bovicola ovis*, using a basophil histamine-release assay. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 57:315-325.

Seymour-Jones A (1913) "'Cockle" in Sheepskins'. In *The sheep and It's Skin*, Seymour-Jones A. *Leather Trades Review*, London. Chapter VII, pp 204-221.

【図面の簡単な説明】

【図1】 シラミ *Bovicola ovis* から得られ、示した調製試料に含まれているタンパク質バンドを示す、銀染色した12%ポリアクリルアミドゲルの写真を示す図である。レーンDの約28.5、42、および83kDaにおけるバンドに注目すること。

【図2】 可溶性 *Bovicola ovis* 糞抗原で免疫感作したマウス由来のハイブリドーマからのモノクローナル抗体と反応させた可溶性 *Bovicola ovis* 抗原のウエスタン・ブロットの写真を示す図である。約28.5kDaにおける主バンドならびに約83kDa (レーン30~32、CおよびD) および約14kDa (レーン27および28) における小バンドに注目すること。

【図3】 成熟B₀₁タンパク質のコード配列をAY2-4ベクター中でクローニングするのに用いた戦略を表した図である。

【図4】 B o 1モノクローナル抗体と反応させた精製天然および組換え B o 1のウエスタン・プロットの写真を示す図である。天然 B o 1と比べて、組換え B o 1の分子量が明らかに高いことに注目すること。

【図5】 B o 1モノクローナル抗体と選択した昆虫およびダニの可溶性抗原との交差反応性の測定を示す図である。

【図6】 B o 1モノクローナル抗体を用いた抗原捕捉 E L I S Aを用いて羊毛試料中で検出された B o 1抗原のレベルを、子羊におけるシラミ・スコアと比較した図である。

【図7】 3匹のシラミ外寄生 (L 1 , L 2 , L 3) および3匹のシラミ非外寄生 (L F 1 , L F 2 , L F 3) ヒツジにおける抗原および対照溶液の皮内注射後に得られた皮膚試験結果を示す図である。

【図8】 粗 B o v i c o l a o v i s 抗原および精製 B o 1タンパク質に特異的なヒツジ I g Eを検出するための E L I S Aの結果を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> AgResearch Limited
 Pfeffer, Alexander
 Shoemaker, Charles

<120> Novel Allergen

<130> 30924X143

<150> NZ 504096
 <151> 1999-04-19

<160> 2

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
 <211> 911
 <212> DNA
 <213> bovicola ovis

<220>
 <221> Unsure
 <222> (800), (875)
 <223> unknown bases

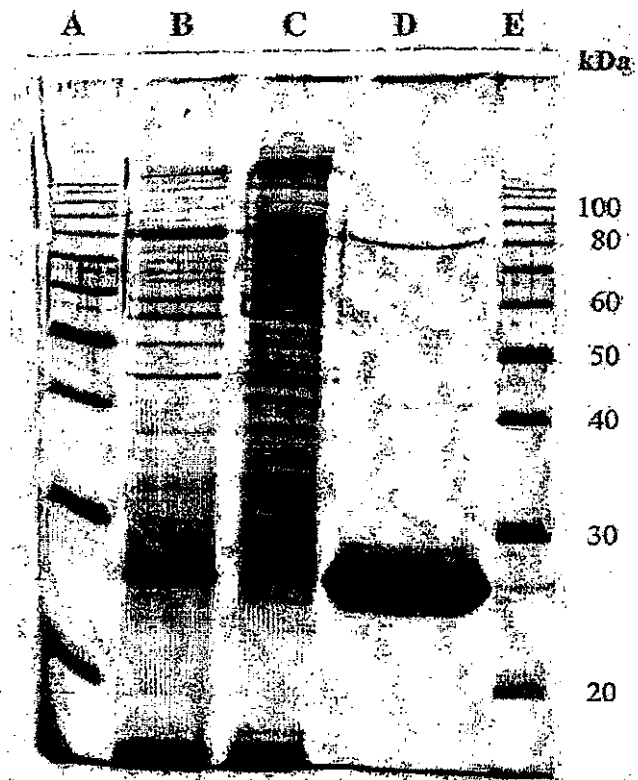
<400> 1
 atcaaaacaa caatgcaagg attaaaatta attttcgctg cttttttggc agttttcgtc 60
 gttgggtgtg agggaaatac tttggtcaaa tccccaacag aactcgatct tcgtcttctt 120
 gttgaaaccg ctcgagatat ctctgtcatc ttgtttaaaa acttacatgc tggatataat 180
 gaagttaacc ccaaaatcga aatactgttg aacgaattgg cccccgaagc taaagaagga 240
 ctccaaaaaa ttataaaaga aattagagat ttggtcaatg aagaagaaac cagaattaat 300
 gtcattctca aaactcttat tgggtccttg gaccaactga aaccaattaa ggcaccatgc 360
 gccgaccccg tttctaaaga agctaaaaaa ttggccaacg atggtgaaag ggaaatcgtc 420
 aaattcatta aatatttaga acaaaaatac gaaaagggtat ttacaaacat caagaatgga 480
 gttaccaaaag taatcaccag agccaggaaa ttgtttgaca ctgaagttcc cgaagtcgtg 540
 aaatgtttga cccccaaaaa caaagaggcc actaaatgca tcaatacaca catcgacaaa 600
 attcttggtg aagttgcccc aatcgggtgc gacattggac tccttgtaat ctctctgaa 660
 gaagctctta atcccgttat taaggaagtt gtcgccaaaa taggtgaaca agtgttgaag 720
 gttttgggtg aaggtaggcc cattatcaac aaaatctcag actgtggtgc aaaaatgtaa 780
 gaaataaaaa gaaataagtn aataaattaa ttttaatttt tttttaattt ttttttctt 840
 taatgccaaa caaaaaaatt aaaaattttt aatnaattt taaaaattaa aaaaaaaaaa 900
 aaaaaadaaa a 911

<210> 2
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> bovicola ovis

<400> 2

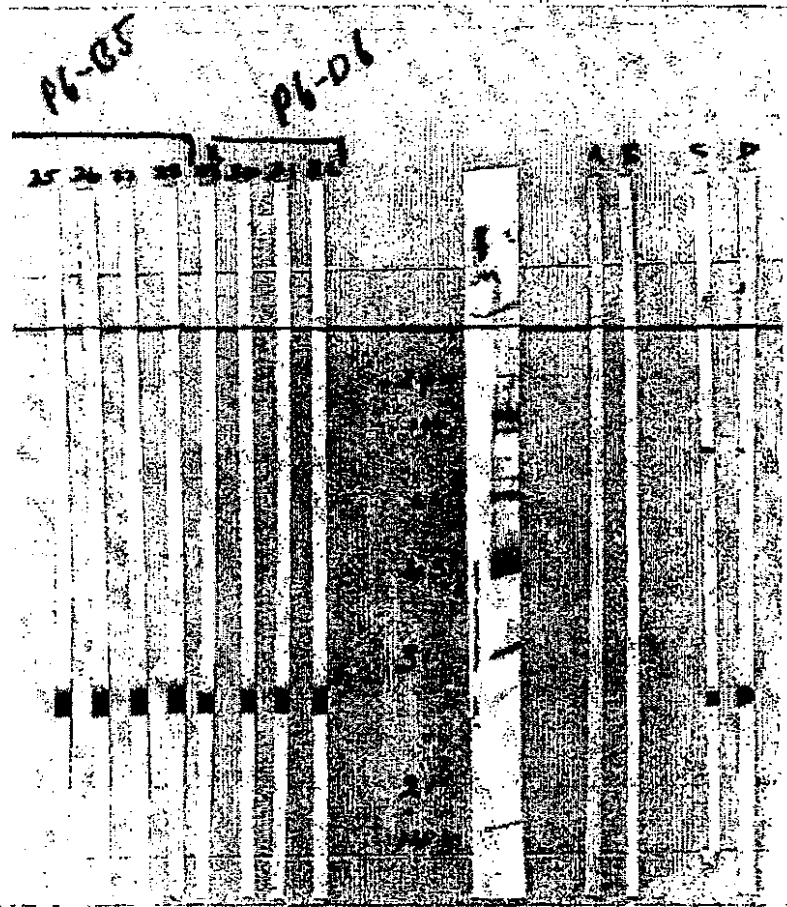
Met Gln Gly Leu Lys Leu Ile Phe Val Ala Phe Leu Ala Val Phe Ala
 1 5 10 15
 Val Gly Cys Glu Gly Asn Thr Leu Val Lys Ser Pro Thr Glu Leu Asp
 20 25 30
 Leu Arg Leu Leu Val Glu Thr Ala Arg Asp Ile Ser Val Ile Leu Phe
 35 40 45
 Lys Asn Leu His Ala Gly Tyr Asn Glu Val Asn Pro Lys Ile Glu Ile
 50 55 60
 Leu Leu Asn Glu Leu Ala Pro Glu Ala Lys Glu Gly Leu Gln Lys Ile
 65 70 75 80
 Ile Lys Glu Ile Arg Asp Leu Val Asn Glu Glu Glu Thr Arg Ile Asn
 85 90 95
 Val Ile Phe Lys Thr Leu Ile Gly Ala Leu Asp Gln Leu Lys Pro Ile
 100 105 110
 Lys Ala Pro Cys Ala Asp Pro Val Ser Lys Glu Ala Lys Lys Leu Ala
 115 120 125
 Asn Asp Val Glu Arg Glu Ile Val Lys Phe Ile Lys Tyr Leu Glu Gln
 130 135 140
 Lys Tyr Glu Lys Val Phe Thr Asn Ile Lys Asn Gly Val Thr Lys Val
 145 150 155 160
 Ile Thr Arg Ala Arg Lys Leu Phe Asp Thr Glu Val Pro Glu Val Val
 165 170 175
 Lys Cys Leu Thr Pro Lys Asn Lys Glu Ala Thr Lys Cys Ile Asn Thr
 180 185 190
 His Ile Asp Lys Ile Leu Gly Glu Val Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile
 195 200 205
 Gly Leu Leu Val Ile Ser Ser Glu Glu Ala Leu Asn Pro Val Ile Lys
 210 215 220
 Glu Val Val Ala Lys Ile Gly Glu Gln Val Leu Lys Val Leu Gly Glu
 225 230 235 240
 Gly Arg Pro Ile Ile Asn Lys Ile Ser Asp Cys Val Ala Lys Met
 245 250 255

【図1】



- A. 分子量マーカー
- B. *Bovicola ovis*全体からの粗可溶性抗原
- C. イムノアフィニティー・クロマトグラフィーによるBo1の除去後の
*Bovicola ovis*全体からの粗可溶性抗原
- D. イムノアフィニティー・クロマトグラフィーによって精製したBo1
- E. 分子量マーカー

【図2】



以下と反応させた可溶性*Bovicola ovis*抗原のウエスタン・ブロット

レーン25~28 一次クローンP6-B5の二次ハイブリドーマ・クローンからのモノクローナル抗体

レーン29~32 一次クローンP6-D6の二次ハイブリドーマ・クローンからのモノクローナル抗体

分子量マーカー(kDa)

レーンA 正常マウス血清、陰性対照

レーンB ハイブリドーマ培地、陰性対照

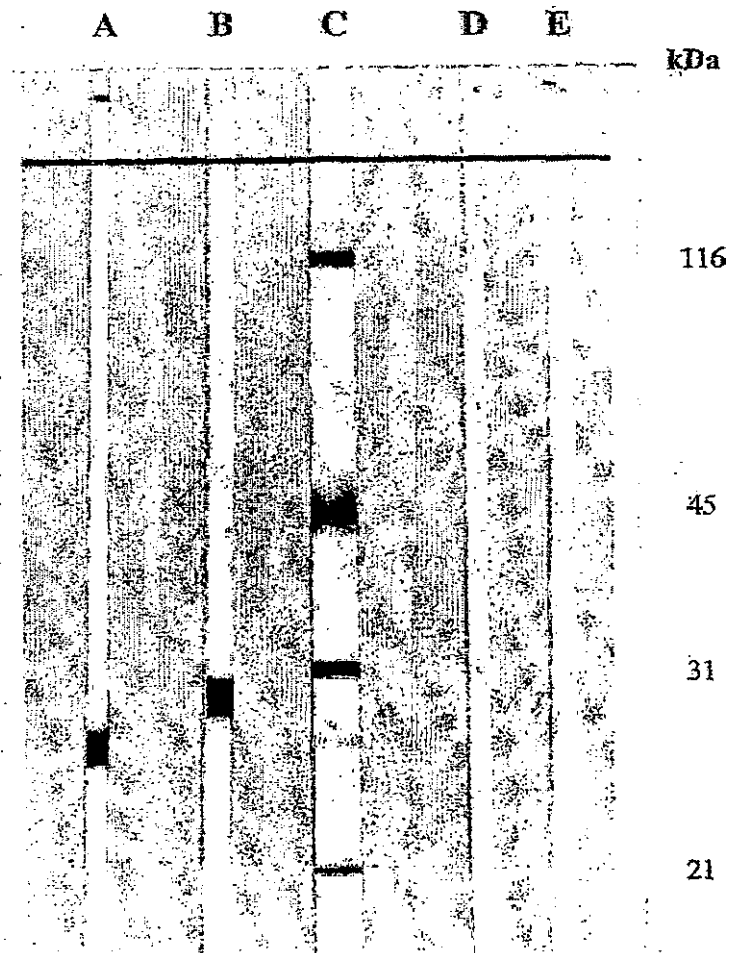
レーンC 可溶性*Bovicola ovis*糞抗原で免疫化したマウスの血清、陽性対照

レーンD 既知の陽性ハイブリドーマ培養上清、陽性対照

【図3】

PRAD18 ベクター -----> ctttgctatgccatagcattttatccataagattagcggatcctacctgacgc
 アラビノースプロモーター
 ttttatcgcaactctctactggttctccataccggttttttgggctagaataattttggttactttaagaaggagatatacatATGTC
Nde
M S
 CCAACAGAACTCGATCTTCGTCTTCTTGTGAAACCGCTCGAGATATCTCTGTCATCTTGTTTAAAAACTTACATGCTGGATATAATGAAGTT
 P F E L D L R L L V E T A R D I S V I L P K N L H A G Y N E V
 AACCCCAAAATCGAATACTCTTGAACGAAATGGCCCCGAAGCTAAGAGAGGACTCCAAAAATTATAAAGAATTAGAGATTTEGTCRAAT
 N P K I E I L L N E L A F E A K E G L Q K I I K E I R D L V N
 GAAGACAAACCAGAATTAAATGTCATCTTCAAAACTCTTATTGGTCTTTGGACCAACTCAAACCAATTAAGGCACCATCGCCCGACCCCGTT
 E E E T R I N V I F K T L I G A L D Q L K P I X A P C A D P V
 TCTAAGAGCTAAAAAATGGCCCAACGATGTTGAAAGGSAATCGTCAAAATTCATTAAATATTAGAACAAAAATACGAAABGGTATTTACA
 S K E A K K L A N D V E R E I V K F I K Y L E Q K Y E K V F T
 AACATCAAGAAATGGAGTTACCAACTAATCAACGAGCCAGAAATGTTTCACTGAAGTTCCCGAAGTCTGAAATGTTTGAACCCCAAA
 N I K M G V T K V I T R A R K L F D T E V P E V V K C L T P K
 AACAAAGAGCCCACTAAATGCATCAATACACATCGACAAAATTCCTGGTGAAGTGCACCAATCGGTGCCGACATGGACTCCTTGTAAATC
 N K E A T K C I N T N I D K I L S E V A Q I S A D I G L L V I
 TCTCTGAGAGCTCTTAATCCCTTATTAGGAAGTTCTGCCAAAATAGTGAACAGTGTTCAGGTTTGGGTGAAGGTAGGCCCAT
 S S E A L N P V I K E V V A K I G E Q V L K V L G E G R P I
Not 1 -----Etag-----
 ATCAACAAAATCTCAGACTGTGTTCAAAAATGgcggccgcaggtgcggcggtccggtatccggtatccggtggaaccgctgcccggcggccat
 I N K I S D C V A K M a a a g a p v p y p d p l a p r a a a h
 catcatcatcattagaattaattcgatctcggtaaccggggatcctctagatcgacctgcaggcatgcaagctt-----> PRAD18
 h h h h h

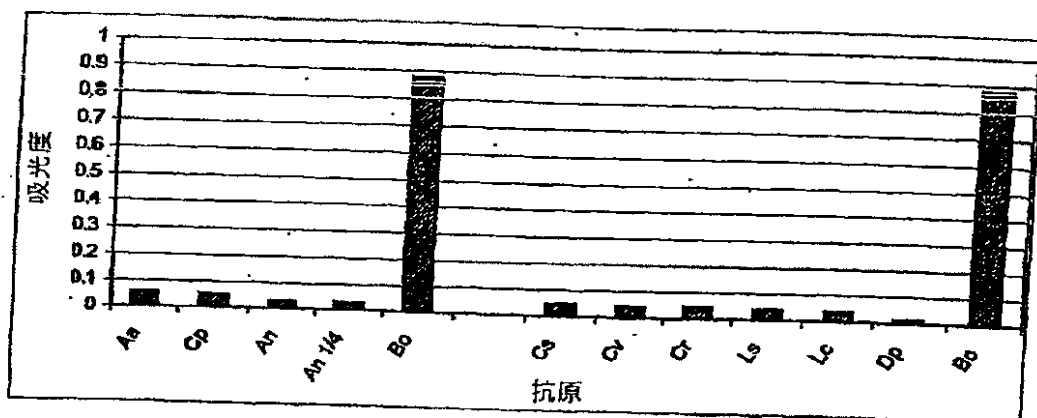
【図4】



以下のウエスタン・ブロット

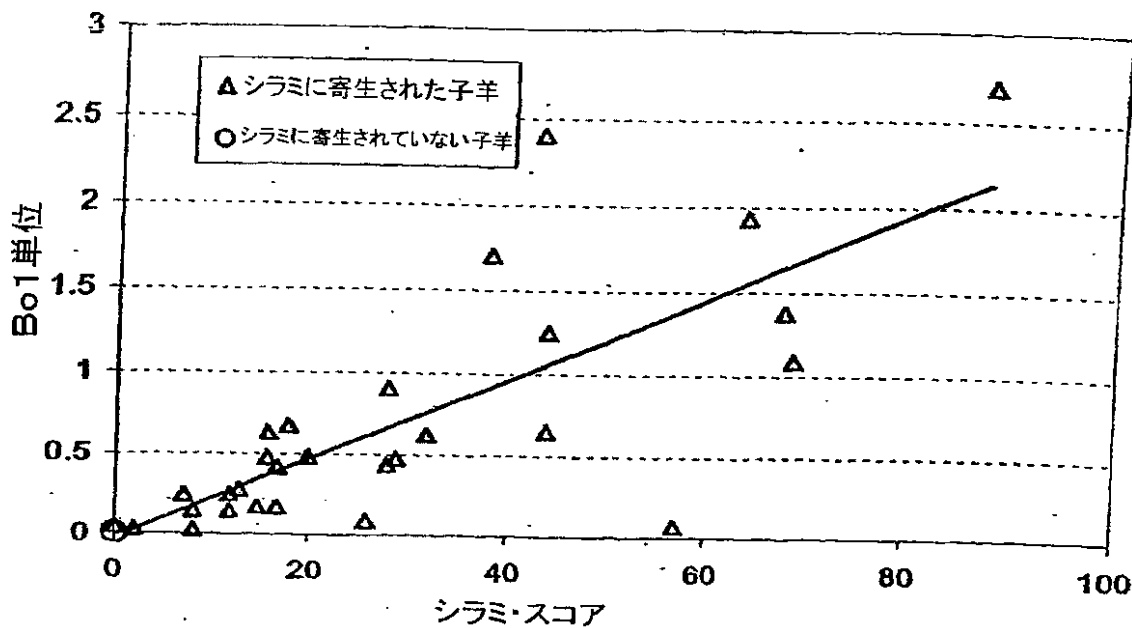
- A. B_o1モノクローナル抗体と反応させた精製B_o1
- B. B_o1モノクローナル抗体と反応させた精製組換えB_o1
- C. 分子量マーカー
- D. PBSと反応させた精製B_o1、陰性対照
- E. PBSと反応させた精製組換えB_o1、陰性対照

【図5】

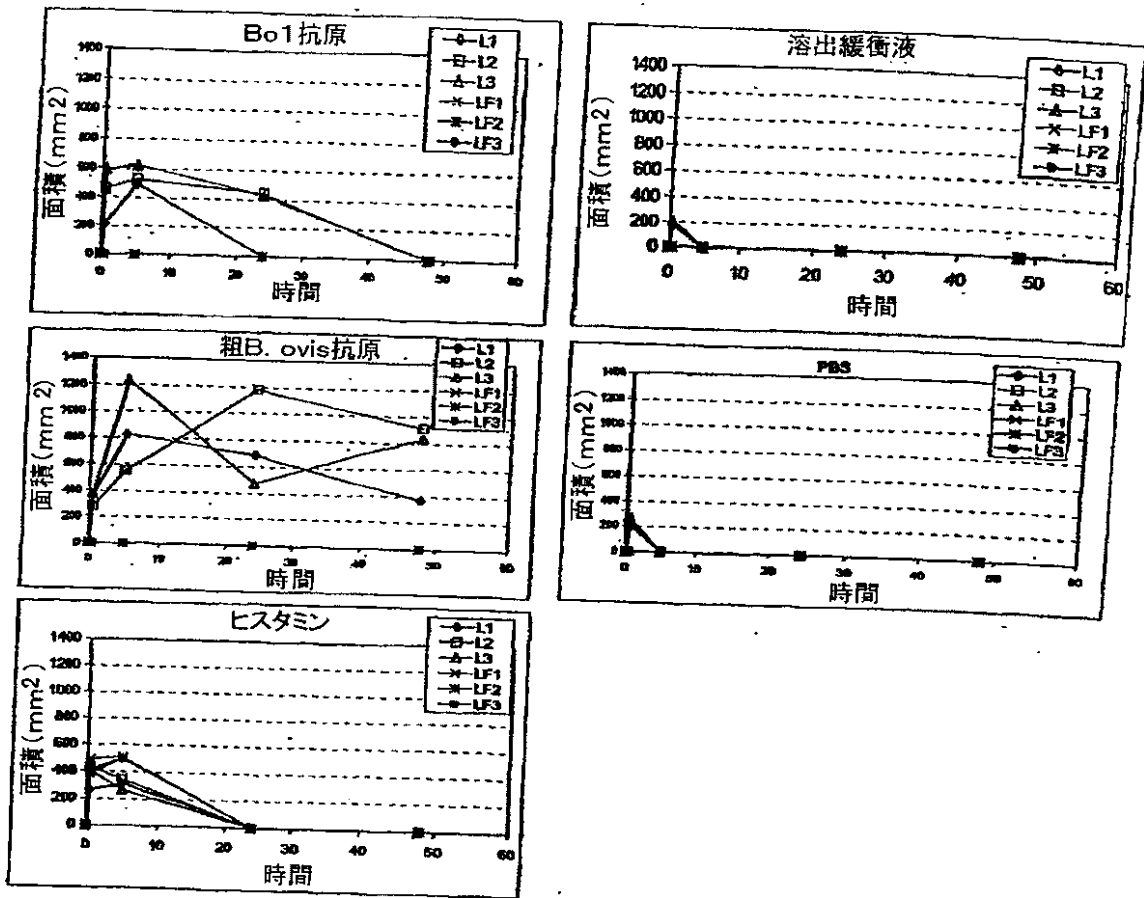


記号 : Aa - *Austrosimulium (Austrosimulium) australense*, Cp - *Culex pervigilans*;
An - *Aedes notoscriptus*; Bo - *Bovicola ovis*; Cs - *Calliphora stygia*; Cv - *Calliphora vicina*;
Cr - *Chryomya rufifacies*; Ls - *Lucilia sericata*; Lc - *Lucilia cuprina*;
Dp - *Dermatophagoides pteronyssinus*.

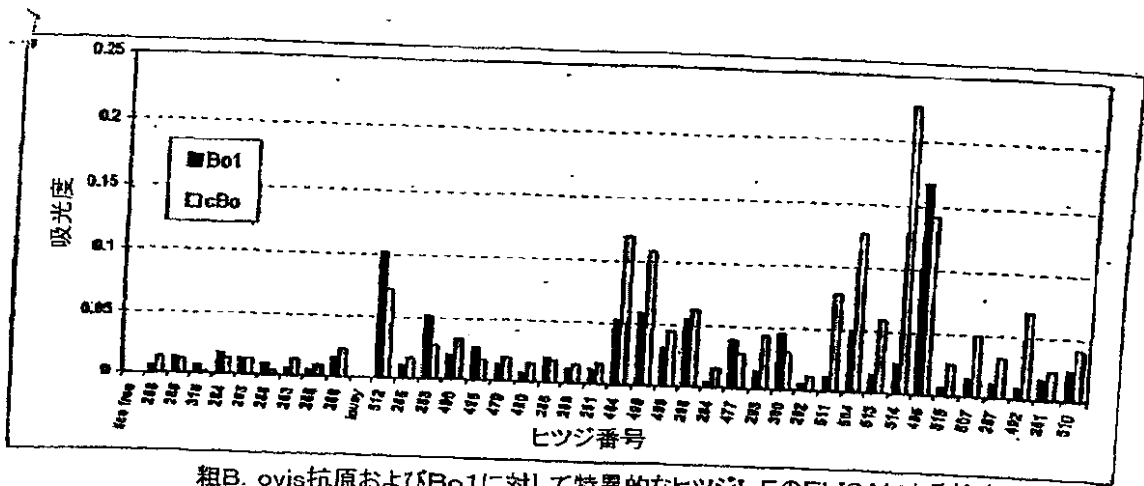
【図6】



【図7】



【図8】



粗B. ovis抗原およびBo1に対して特異的なヒツジIgEのELISAによる検出

【手続補正書】

【提出日】平成14年12月2日(2002.12.2)

【手続補正1】

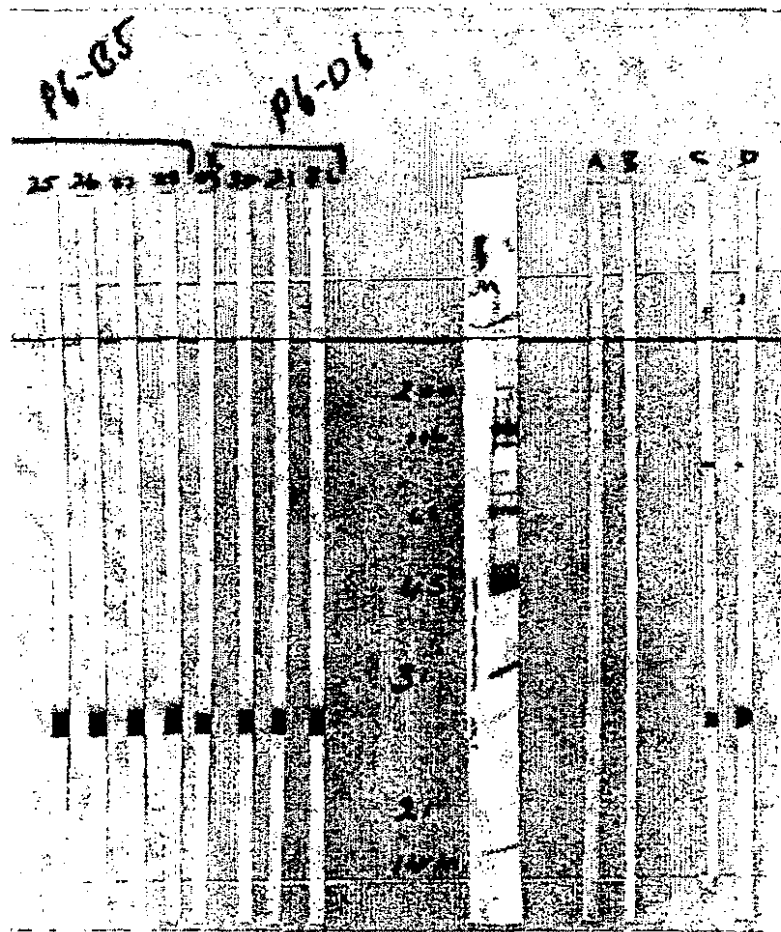
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2】



以下と反応させた可溶性*Bovicola ovis*抗原のウエスタン・ブロット

- レーン25～28 一次クローンP6-B5の二次ハイブリドーマ・クローンからの
 モノクローナル抗体
 レーン29～32 一次クローンP6-D6の二次ハイブリドーマ・クローンからの
 モノクローナル抗体
 分子量マーカー(kDa)
 レーンA 正常マウス血清、陰性対照
 レーンB ハイブリドーマ培地、陰性対照
 レーンC 可溶性*Bovicola ovis*糞抗原で免疫化したマウスの血清、陽性対照
 レーンD 既知の陽性ハイブリドーマ培養上清、陽性対照

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

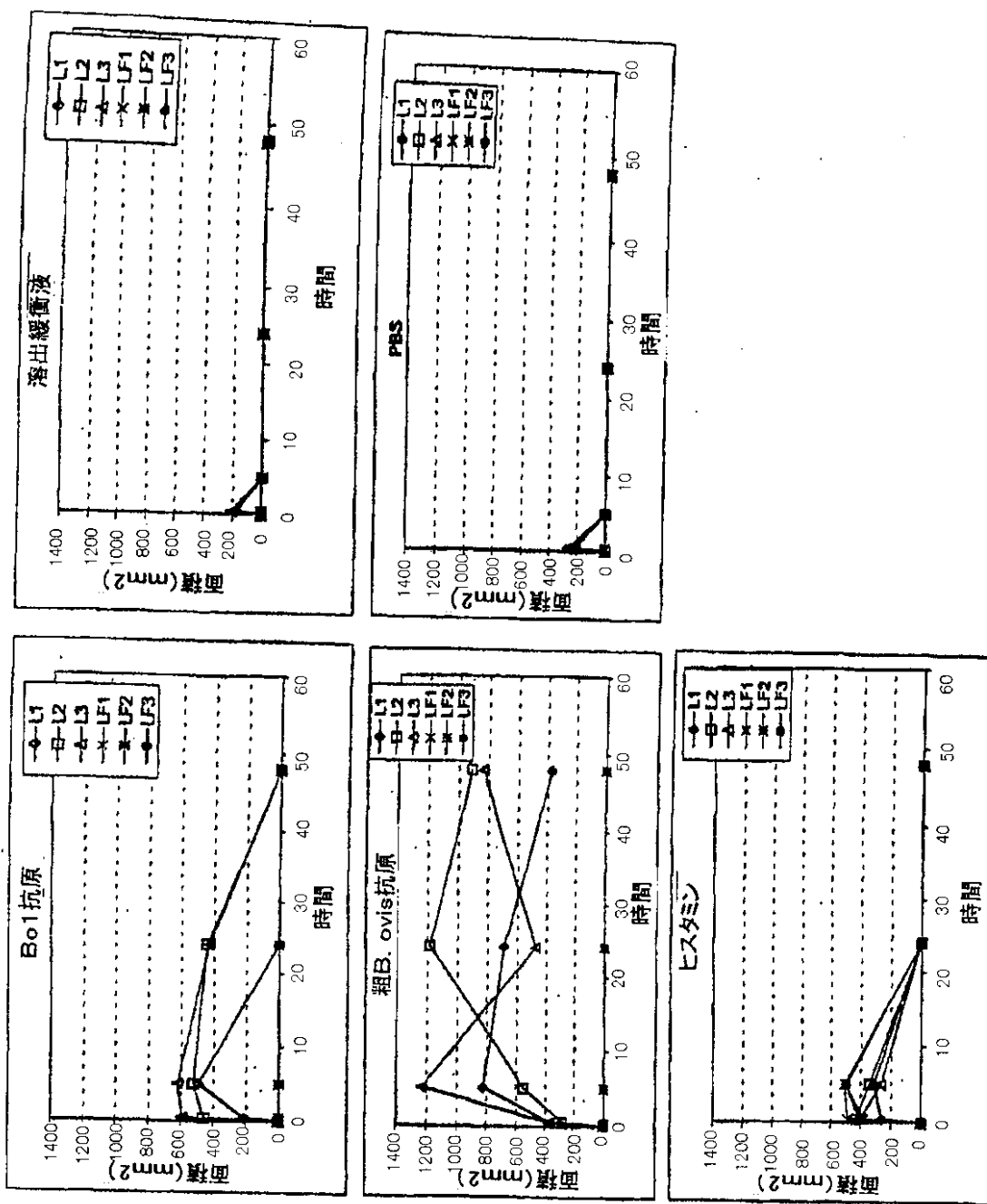
【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【補正の内容】

【図7】



【手続補正4】

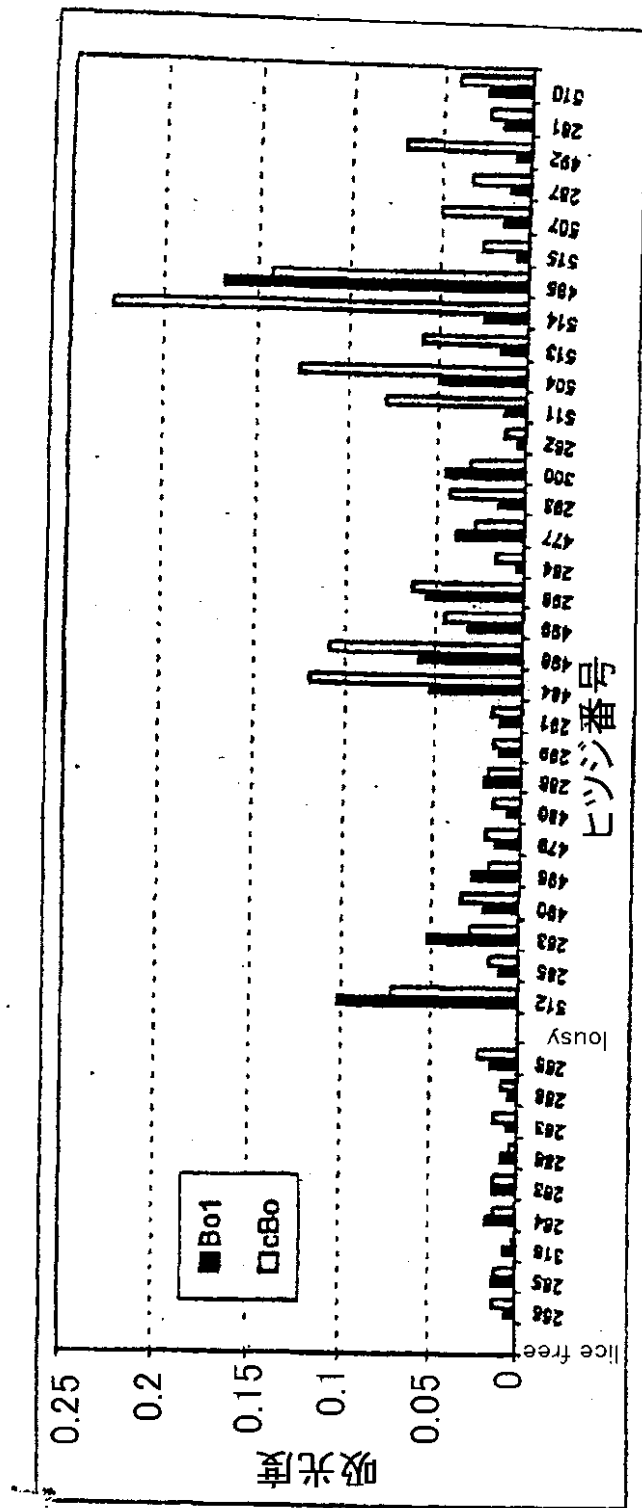
【補正対象書類名】 図面

【補正対象項目名】 図8

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【図8】



粗B. ovis抗原およびBo1に対して特異的なヒツジIgEのELISAによる検出

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/NZ01/00065																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER																				
Int. Cl. ⁷ : C07K 14/435; C07H 21/04; C12N 15/12; G01N 33/535; A61K 39/35, 48/00; A61P 33/14																				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED																				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)																				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) ANGIS: SEQ. ID. NO. 2 searched.																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input type="checkbox"/> See patent family annex																				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 30%;">"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td style="width: 10%;">"T"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y"</td> <td>inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td>combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	inventive step when the document is taken alone	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art			document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																		
"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an																		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	inventive step when the document is taken alone																		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is																		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																		
		document member of the same patent family																		
Date of the actual completion of the international search 19 July 2001	Date of mailing of the international search report 24 July 2001																			
Name and mailing address of the ISA/UAU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. (02) 6283 3929	Authorized officer GAVIN THOMPSON Telephone No: (02) 6283 2240																			

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
	48/00	A 6 1 P 37/08	4 C 0 8 7
A 6 1 P	37/08	C 0 7 K 14/435	4 H 0 4 5
C 0 7 K	14/435	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N	1/15		
	1/19		
	1/21	C 1 2 Q 1/68	A
	5/10	G 0 1 N 33/53	Q
C 1 2 Q	1/68		Z
G 0 1 N	33/53	C 1 2 P 21/08	
	33/564	C 1 2 N 15/00	Z N A A
// C 1 2 P	21/08		A
		A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

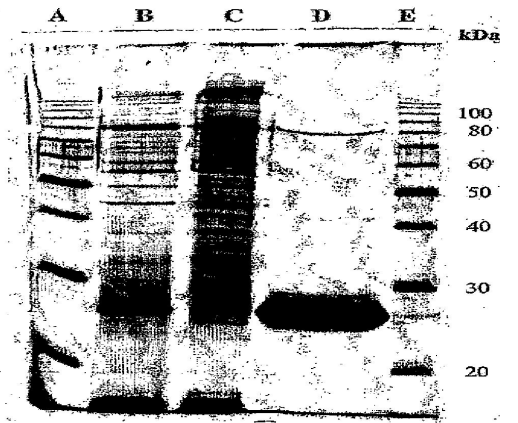
(72)発明者 シューメーカー、チャールズ ビックス
 ニューージーランド国 アッパー ハット
 ウォード ストリート ウォレスビル ア
 ニマル リサーチ センター アグリサー
 チ内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA53 CA04
CA09 CA11 DA06 EA04 GA11
HA12 HA17
4B063 QA01 QQ03 QQ41 QQ62 QR32
QR55 QS34
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA26X AA90Y AA92X AB01
AB05 AC14 BA03 BA08 CA24
CA25 CA44 CA45
4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08
BA22 BA23 BA35 CA49 DA01
MA02 MA05 MA66 NA05 NA14
ZB132
4C085 AA03 AA13 AA14 BA01 BA31
BB03 BB11 BB12 CC02 CC05
CC21 CC23 EE03 EE06 FF24
GG01
4C087 AA01 AA02 BC83 CA04 CA12
MA02 MA05 MA66 NA05 NA14
ZB13
4H045 AA10 AA11 BA10 CA51 DA76
DA86 EA05 FA72 FA73 FA74

专利名称(译)	绵羊·虱子治疗Bovicolaovis过敏原		
公开(公告)号	JP2003530840A	公开(公告)日	2003-10-21
申请号	JP2001576876	申请日	2001-04-19
[标]申请(专利权)人(译)	奥维塔有限公司		
申请(专利权)人(译)	Obita有限公司		
[标]发明人	プフェッファアアレクサンダーテレンス シューメーカーチャールズビックス		
发明人	プフェッファア、アレクサンダー テレンス シューメーカー、チャールズ ビックス		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/39 A61K39/395 A61K48/00 A61P33/14 A61P37/08 C07K14/435 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/564		
CPC分类号	C07K14/43563 A61K39/00		
FI分类号	A61K35/76 A61K39/00.H A61K39/39 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P37/08 C07K14/435 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/53.Q G01N33/564.Z C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ41 4B063/QQ62 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90Y 4B065/AA92X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA03 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA45 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA35 4C084/CA49 4C084/DA01 4C084/MA02 4C084/MA05 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB132 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA01 4C085/BA31 4C085/BB03 4C085/BB11 4C085/BB12 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF24 4C085/GG01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA04 4C087/CA12 4C087/MA02 4C087/MA05 4C087/MA66 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZB13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA51 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA05 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74		
优先权	504096 2000-04-19 NZ		
其他公开文献	JP2003530840A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及编码虱子变应原的新型核苷酸序列，包括但不限于来源于咬食虱子的牛卵孢杆菌 (*Bovicola ovis*) 的那些，并且进一步用于虱子侵染和相关变应性疾病的诊断，治疗和预防。 它涉及蛋白质过敏原的用途。



分子量マーカー
Mycobacterium avium 全体からの粗可溶性抗原
 ムノアフィニティー・クロマトグラフィーによるB₀1の除去後の
Mycobacterium avium 全体からの粗可溶性抗原