

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 14/435

C07H 21/04 C12N 15/12

G01N 33/535 A61K 39/35

A61K 48/00 A61P 33/14



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01809957.2

[43] 公开日 2003 年 7 月 16 日

[11] 公开号 CN 1430626A

[22] 申请日 2001.4.19 [21] 申请号 01809957.2

[30] 优先权

[32] 2000. 4. 19 [33] NZ [31] 504096

[86] 国际申请 PCT/NZ01/00065 2001. 4. 19

[87] 国际公布 WO01/79281 英 2001. 10. 25

[85] 进入国家阶段日期 2002. 12. 2

[71] 申请人 奥维塔有限公司

地址 新西兰达尼丁

[72] 发明人 亚历山大·T·普费弗

查尔斯·B·休梅克

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 4 页 说明书 30 页 序列表 2 页  
附图 8 页

[54] 发明名称 绵羊虱 *Bovicola ovis* 变应原的处理

[57] 摘要

本发明涉及编码虱变应原，但并不是仅来自咀嚼虱 *Bovicola ovis* 的变应原的新的核苷酸序列，和所述核苷酸序列和蛋白质变应原在诊断、治疗和预防虱侵染和相关的变应原性疾病中的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1.一种具有 SEQ ID NO.2 的氨基酸序列的基本上纯化的多肽,或者具有基本上相同活性的其片段或变体。
- 5        2.从动物身上寄生的虱子衍生的权利要求 1 要求的多肽,其对虱子侵染的动物诱导体液和/或细胞免疫应答,或者具有基本上相同活性的其片段或变体。
- 3.权利要求 1 和 2 要求的多肽,其中所述变体或片段插入所述多肽的 B 细胞或 T 细胞表位。
- 10       4.权利要求 1 要求的多肽,其中所述虱子属于食毛目亚目。
- 5.权利要求 1 要求的多肽,其中所述虱子是 *Bovicola ovis*。
- 6.权利要求 1 要求的多肽,其中所述动物选自绵羊,马,牛,狗,猫或者鸟包括鸡。
- 7.权利要求 1 要求的多肽,其中所述动物是绵羊。
- 15       8.权利要求 1 要求的多肽,其中所述多肽是指定为 Bo1 且来自 *B. Ovis* 的变应原。
- 9.编码权利要求 1-8 任一项的多肽的分离的核酸分子。
- 10.一种分离的核酸分子,其中所述分子:
- 20       a)包含 SEQ ID NO.1 的核苷酸序列;或者
- b)是(a)中分子的功能片段或变体;或者
- c)在严谨条件下能与(a)中分子杂交;或者
- d)是(a), (b)或(c)中定义的分子的互补体;或者
- e)是对应于(a)-(d)中任一序列的反义序列。
- 11.权利要求 9 或 10 要求的分离的核酸分子,其中所述片段或变体编码
- 25    B 细胞或 T 细胞表位。
- 12.包含权利要求 9-11 任一项的核酸分子的载体。
- 13.转化有权利要求 12 要求的载体的宿主细胞。
- 14.与权利要求 1-8 任一项的多肽结合的配体。
- 15.权利要求 14 要求的配体,其中所述配体是抗体或者包含结合结构域
- 30    的抗体的片段。
- 16.权利要求 14 要求的配体,其中所述配体是单克隆抗体。

17.权利要求 14 要求的配体,其中所述配体是噬菌体展示分子。

18.检测样品是否存在结合 Bo1 的配体或者其片段的方法,包括从宿主获得排泄物,分泌物,组织或血样,并且通过 ELISA 或者其它合适的测试使样品接触 Bo1 配体结合试剂或者 Bo1 探针步骤。

5 19.根据权利要求 18 的方法,其中所述要检测的样品首先制备成底物溶液形式。

20.适合在权利要求 18 或 19 中要求的测试中使用的检测试剂盒,其中所述试剂盒包括组成 ELISA 或者其它合适的测试的 Bo1 配体结合试剂或者探针。

10 21.在严谨条件下能与权利要求 9-11 任一项的核酸分子杂交的分离的探针。

22.诊断动物对 *Bovicola ovis* 或者 Bo1 多肽的超敏反应的方法,包括步骤:

15 a)真皮内注射适量的权利要求 1-8 要求的多肽和药学或兽医学上合适的载体或稀释剂;

b)在此之后合适的时间检查注射部位,以检测对本发明多肽的反应的性质;

c)在这些观察的基础上,与只注射载体或稀释剂和其它对照溶液的那些部位相比,确定对本发明多肽的特异性反应是否明显。

20 23.防止或减小易感动物体内 Bo1 超敏反应的疫苗,其中所述疫苗包括选自下面的物质:

a)基本上如上所述的根据本发明的多肽;

b)根据本发明的核酸分子;基本上如上所述;

c)转染有和/或表达根据(a)的多肽的 DNA 或 RNA 的生物体;

25 d)结合根据(a)的多肽的配体或探针。

24.治疗动物或者预防动物对 Bo1 多肽表现出变应原性超敏反应的方法,包括对所述动物施用有效量的权利要求 23 要求的疫苗的步骤。

25.含有有效量的选自下面物质的组合物:

g)基本上如上所述的根据本发明的核酸分子;

30 h)基本上如上所述的根据本发明的多肽;

i)转染有和/或表达根据(a)的多肽的 DNA 或 RNA 的生物体;或者

- j)结合根据(b)的多肽的配体或探针;  
和药学或者兽医学上合适的载体或稀释剂。
- 26.权利要求 25 要求的组合物,其中所述组合物还含有至少一种佐剂或细胞因子。
- 5       27.治疗动物或者预防动物对 Bo1 多肽表现出变应原性超敏反应的方法,包括对所述动物施用有效量的权利要求 25 或 26 要求的组合物的步骤。
- 28.权利要求 24 或 27 要求的方法,其中所述动物是哺乳动物或鸟。
- 29.权利要求 24 或 27 要求的方法,其中所述动物是绵羊。
- 30.一种诊断外寄生虫侵染的方法,包括步骤:
- 10       a)从宿主获得排泄物,分泌物,组织或血样;和  
       b)通过 ELISA 或者其它合适的测试使样品接触鉴定的外寄生虫粪便中存在的抗原的配体或者探针。
- 31.权利要求 30 要求的方法,其中所述外寄生虫是 B.ovis。
- 32.权利要求 31 要求的方法,其中所述鉴定的抗原是 Bo1。
- 15       33.通过权利要求 30 的方法诊断外寄生虫侵染的检测试剂盒,其中所述试剂盒包括构成 ELISA 或者其它合适测试的外寄生虫粪便中存在的鉴定的抗原的配体或者探针。
- 34.权利要求 33 要求的检测试剂盒,其中所述外寄生虫是 B.ovis,并且检测试剂盒包括构成 ELISA 或者其它合适测试的 Bo1 的配体。
- 20       35.基本上参照本发明任一实施例和/或附图所述的基本上纯化的多肽。
- 36.基本上参照本发明任一实施例和/或附图所述的分离的核酸分子。
- 37.基本上参照本发明任一实施例和/或附图所述的插入本发明分离的核酸分子的载体。
- 38.基本上参照本发明任一实施例和/或附图所述的由插入本发明分离的核酸分子的载体转化的宿主细胞。
- 25       39.基本上参照本发明任一实施例和/或附图所述的与本发明的多肽结合的配体。
- 40.基本上参照本发明任一实施例和/或附图所述的分析样品是否存在与 Bo1 或者其片段结合的配体的方法。
- 30       41.基本上参照本发明任一实施例和/或附图所述的诊断动物体内对 B.ovis 或 Bo1 多肽超敏反应的方法。

- 
- 42.基本上参照本发明任一实施例和/或附图所述的疫苗。
  - 43.基本上参照本发明任一实施例和/或附图所述的组合物。
  - 44.基本上参照本发明任一实施例和/或附图所述的诊断外寄生虫侵染的方法。

绵羊虱 *Bovicola ovis* 变应原的处理

## 5 技术领域

本发明涉及编码虱变应原的新的核苷酸序列,但是特别不意味着其仅来自咀嚼虱 *Bovicola ovis*,所述核苷酸序列和蛋白质变应原在诊断、治疗和预防虱侵染和相关的变应原性疾病中的用途。

## 10 背景技术

虱是哺乳动物和鸟物种常见外寄生物。驯养动物最重要的虱是吸虱(昆虫纲:虱目:啮毛虱科:虱目)(*Insecta:Phthiraptera:Trichodectidae:Anoplura*),它们具有能穿透宿主皮肤并且能摄取组织体液和血液的口器,和咀嚼虱(昆虫纲:虱目:啮毛虱科:食毛目)(*Insecta:Phthiraptera:Trichodectidae:Mallophaga*),它们主要从皮肤表面,头发,皮毛,绒毛或者羽毛摄取营养。咀嚼虱是常见的并且对于牛,绵羊,山羊和马在经济学上特别重要,并且在狗,猫和鸟包括驯养的鸡上也有发现。

*Bovicola ovis*,咀嚼虱的一个例子,是世界范围常见的绵羊外寄生虫。被这种寄生虫侵染的绵羊长期以来一直被认为引起皮肤刺激随后蹭痒而伤害到羊毛(*Johnson, Boray, Plant 和 Blunt, 1993; Lipson 和 Bacon-Hall, 1976*)。受到侵染的绵羊的羊皮会发生退色,产量降低和其它不期望的品质(*Kettle 和 Lukies, 1982; Kettle 和 Lukies, 1984; Cleland, Dobson 和 Meade, 1989*)。另外,本发明人最近的工作表明一百多年以前就认识到的羊羔皮的严重缺陷褶皱也与绵羊被 *B. ovis* 侵染有关(*Heath, Cooper, Cole 和 Bishop, 1995; Heath, Cole, Bishop, Pfeffer, Cooper, 和 Risdon P, 1995*)。本发明人还证明了褶皱特征在于有变应性反应特征的表面血管周围皮炎(*Heath, Cole, Bishop, Pfeffer, Cooper, 和 Risdon P, 1995*)。近期研究支持了变应性免疫应答对绵羊褶皱产生中寄生虫产物的作用(*Bany, Pfeffer, Phegan 和 Heath, 1995; Bany, Pfeffer 和 Phegan, 1995; Pfeffer, Phegan 和 Bany, 1997; Pfeffer, Bany, Phegan 和 Osborn, 1993*)。预计对寄生虫的变应性应答归因于皮肤刺激,皮肤刺激使得受侵染绵羊蹭痒并且损伤了它们的羊毛并且伤害它们的皮肤,严重降低了受侵染羊

羔皮的价值。

如果将对羊毛的损害和预防侵染的成本都计算在内,则绵羊受到 *B. ovis* 侵染的经济上的后果是相当大的(McLeod, 1995)。其中还要加上由于褶皱而降低羊羔皮品质带来的巨大代价。除了直接经济损失之外,连续应用常规处理来控制寄生虫侵染(合成杀虫剂和昆虫生长调节剂)有害作用,因为残留物进入环境和食物链并且也损及农民的安生。

消费者强烈要求在控制寄生虫侵染中减少使用这样的有害常规处理,而且寄生虫对一些合成杀虫剂产生耐药性迫使改进现行控制策略并且期望有新的控制方法和物质。

10 本发明的一个目的是在一定程度上实现该愿望或者至少对公众提供一种有用的选择。

本申请人鉴定了一种寄生虫抗原(变应原),其对受感染绵羊激发变应原性反应。在鉴定的变应原中,纯化了命名为 Bol 的蛋白质,对其进行了氨基酸测序,并且获得了编码 cDNA,并且在大肠杆菌中进行了表达。本发明广泛涉及这些变应原和它们在诊断,预防和处理寄生虫侵染和相关的变应原性疾病中的用途。

### 发明概述

20 本发明涉及来自咀嚼虱的新的蛋白质变应原的鉴定,纯化,测序和在重组体中产生或者合成形式,包括至少包含该蛋白质的一个 B 细胞或 T 细胞表位的所述蛋白质的部分。

因此,一方面,从广义上说,本发明包括具有 SEQ ID NO.2 的氨基酸序列的基本上纯的多肽,基本上具有相同活性的该多肽的片段或者变体。

25 根据本发明的另一方面,提供了基本上如上所述的多肽,其中衍生自动物身上的寄生虱的多肽对受到虱子侵染的动物诱导了体液和/或细胞免疫应答,或者基本上具有相同活性的其片段或者变体。

更优选地,所述变体或片段插入了所述多肽的 B 细胞或者 T 细胞表位。

因此本发明还包括可以用来控制虱子对动物的侵染和控制相关的变应原性疾病的本发明多肽的变体和片段。

30 一般来说,可以受咀嚼虱侵染的动物包括绵羊,马,牛,狗,猫或者鸟包括鸡。

本发明还包括肽类似物，包括但不限于：

1. 其中一个或多个氨基酸被其相应的 D-氨基酸置换的化合物。本领域技术人员知道通过标准方法可以合成上述氨基酸序列(vetro-inverso amino acid sequences); 参见例如 Chorev 和 Goodman, 1993;

5       2. 模拟肽化合物，其中肽键被对代谢降解更有抗性的结构置换。参见例如 Olson 等，1993; 和

3. 其中各个氨基酸被类似结构例如偕-二氨基烷基或者烷基丙二酰基置换的化合物，其具有或者没有修饰的末端或烷基，酰基或者胺取代以改变它们的电荷。

10       使用这样的替代结构能够提供明显延长的体内半寿期，因为它们在生理条件下对降解更具有抗性。

肽类似物组合合成方法和肽和肽类似物的筛选方法是本领域公知的(参见例如 Gallop 等，1994; Hogan, 1997)。

对于本说明书的目的，术语"肽和肽类似物"包括多个单元组成的化合物，  
15 这些单元具有以 1, 2, 1, 3, 1, 4 或者更大取代模式分开的氨基和羧基末端。这包括 20 种天然存在的或者"常见的"  $\alpha$ -氨基酸，或者是 L 或者是 D 构型，生物合成可获得的或者蛋白质中不经常发现的"不常见的"氨基酸，例如 4-羟脯氨酸，5-羟基赖氨酸，瓜氨酸和鸟氨酸；合成衍生的  $\alpha$ -氨基酸，例如  $\alpha$ -甲基丙氨酸，正亮氨酸，正缬氨酸，C $\alpha$ -和 N-烷基化氨基酸，高半胱氨酸，  
20 和高丝氨酸；和很多本领域公知的氨基酸。

还包括具有以 1, 3 或者更大取代模式分开的胺和羧基官能团的化合物，例如( $\beta$ -丙氨酸， $\gamma$ -氨基丁酸，Freidinger 内酰胺(Freidinger 等，1982)，双环二肽(BTD) (Freidinger 等，1982; Nagai 和 Sato, 1985)，氨基-甲基苯甲酸(Smythe 和 von Itzstein, 1994)，和本领域公知的其它氨基酸。抑制素类电子  
25 等排物，羟基亚乙基电子等排物，还原的酰胺键电子等排物，硫代酰胺电子等排物，脲电子等排物，氨基甲酸酯电子等排物，硫醚电子等排物，乙烯基电子等排物，和本领域公知的其它酰胺键电子等排物对于本发明的目的也是有用的。

"常见的"氨基酸是选自甘氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸，丙氨酸，  
30 苯丙氨酸，酪氨酸，色氨酸，天冬氨酸，天冬酰胺，谷氨酸，谷氨酰胺，半胱氨酸，甲硫氨酸，精氨酸，赖氨酸，脯氨酸，丝氨酸，苏氨酸和组氨酸的

L-氨基酸。这里用它们的常规的三字母或一字母缩写表示氨基酸。

"不常见的"氨基酸包括但不限于选自 D-氨基酸, 高氨基酸, N-烷基氨基酸, 去氢氨基酸, 芳香族氨基酸(除了苯丙氨酸, 酪氨酸和色氨酸), 邻-, 间-或者对-氨基苯甲酸, 鸟氨酸, 瓜氨酸, 正亮氨酸,  $\alpha$ -谷氨酸, 氨基丁酸 5 (Abu), 和  $\alpha$ - $\alpha$  双取代的氨基酸。

衍生所述多肽的寄生虫属于食毛目亚目, 并且优选选自 *Bovicola ovis* 种, 一种寄生在绵羊上的咀嚼虱。

最优选地, 所述多肽包括命名为 Bol 来自 *B. Ovis* 的变应原。

适宜地, 本发明的变应原多肽通过在宿主细胞或者生物体中表达编码该 10 多肽的 DNA 序列而获得, 或者可以通过化学合成。

另一方面, 本发明提供编码基本上如上所述的多肽的分离的核酸分子。

另一方面, 本发明提供编码本发明虱变应原多肽的分离的核酸分子。优选地, 所述分离的核酸分子: a) 包含 SEQ ID NO.1 的核苷酸序列; 或者 b) 是 (a) 中分子的功能片段或变体; 或者 c) 在严谨条件下能与 (a) 中分子杂交; 或者 15 d) 是 (a), (b) 或 (c) 中定义的分子的互补体; 或者 e) 是相应于 (a)-(d) 中任一序列的反义序列。这种核酸分子可以包括 DNA, cDNA 或 RNA。

优选地, 上述核酸分子的片段或变体编码 B 细胞或者 T 细胞表位。

本发明还提供了包含本发明 DNA 分子的重组表达载体, 转化有能表达本发明多肽的本发明载体的宿主。

20 本发明另一方面提供了结合本发明多肽的配体。最常见, 所述配体是抗体或者包含结合结构域的抗体片段。最优选地, 所述配体是结合本发明多肽的单克隆抗体或多克隆抗体或者其功能片段或变体。在一些其它实施方案中, 所述配体可以是噬菌体展示分子。

另一方面, 本发明提供通过 ELISA 或者其它合适的测试检测样品中结合 25 Bol 的配体或者其片段存在的方法, 包括从宿主获得排泄物, 分泌物, 组织或血样, 并且使样品暴露于 Bol 配体结合试剂或者 Bol 探针步骤。当配体是一种抗体时, 这样的测试指示宿主动物在此之前或现在受到寄生虫的感染。当配体是 IgE 同种型抗体时, 这样的测试在对寄生虫超敏反应的诊断中是有用的。

30 本发明还提供了适合在对结合 Bol 或者其片段的配体的测试中使用的检测试剂盒, 其中所述试剂盒包括应用于 ELISA 或者其它合适的测试的 Bol

配体结合试剂或者探针。

本发明还提供了通过真皮内皮肤测试诊断对宿主寄生虫超敏反应(虱子对宿主的在此之前或现在的侵染)的另一种方法。在该方法中,对宿主真皮内注射本发明的多肽或者其片段或者变体激发超敏反应宿主皮肤内特征性  
5 应答,相反对不敏感宿主极少或者不激发应答。该方法体外相关步骤包括使分离的宿主的组织或细胞接触如上定义的本发明的多肽,并且测定对该组织或细胞的免疫介导的刺激作用,例如,组胺从嗜碱细胞释放,或者淋巴细胞的增殖或转化。与使用天然抗原制剂的公开方法(Pfeffer, Phegan 和 Bany(1997); Bany, Pfeffer 和 Phegan (1995); Bany, Pfeffe, Phegan 和 Heath(1995)  
10 相比,使用这里定义的本发明的多肽可提高关于外寄生虫激发宿主的此种免疫致敏的该方法的特异性。

本发明还提供了防止或减小易感动物 Bo1 超敏反应的疫苗,其中所述疫苗包括选自下面的物质:

- a)基本上如上所述的根据本发明的多肽;
- 15 b)根据本发明的核酸分子;基本上如上所述;
- c)转染有和/或表达根据(a)的多肽的 DNA 或 RNA 的生物体;
- d)结合根据(a)的多肽的配体或探针。

本发明进一步提供了含有有效量选自下面的物质的组合物:

- a)基本上如上所述的根据本发明的核酸分子;
  - 20 b)基本上如上所述的根据本发明的多肽;
  - c)转染有和/或表达根据(b)的多肽的 DNA 或 RNA 的生物体;或者
  - d)结合根据(b)的多肽的配体或探针;
- 和药学或者兽医学上合适的载体或稀释剂。

根据本发明的另一方面,提供了诊断外寄生虫侵染的方法,包括步骤:

- 25 a)从宿主获得排泄物,分泌物,组织或血样,和
- b)通过 ELISA 或者其它合适的测试使样品接触外寄生虫粪中存在的鉴定的抗原的配体或者探针。

本发明提供用于诊断外寄生虫侵染的测试试剂盒。一方面,所述试剂盒包括组成 ELISA 或者其它合适的测试的外寄生虫粪中存在的鉴定的抗原的  
30 配体或者探针。

在优选的实施方案中,外寄生虫可以是 *B. ovis*, 而鉴定的变应原可以是

Bol。尽管上述是优选的实施方案，但是不应该视为限制本发明该方面的范围，本发明适用于宽范围的外寄生虫。

本发明还包括处理动物或者预防动物对 Bol 多肽表现出的变应性超敏反应的方法，包括施用有效量的基本如上所述的疫苗或组合物的步骤。

5 根据本发明的另一方面，提供了诊断动物体内对 *Bovicola ovis* 或者 Bol 多肽的超敏反应的方法，包括步骤：

a)真皮内注射合适量带有药学或兽医学合适的载体或稀释剂的权利要求 1-8 的多肽；

b)此后合适的时间检查注射部位来检测对本发明多肽的反应性质；

10 c)在这些观察的基础上，与只注射载体或稀释剂和其它对照溶液的那些相比，确定对本发明多肽的特异性反应是否明显。

虽然本发明广义上如上定义，但是本领域技术人员明白本发明不限与此，并且也包括下面描述给出的实施例中的实施方案。

15 制备药物组合物的方法和药物载体是本领域公知的，并且教科书中也有说明，例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 19 版, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, USA。

可以通过任何合适的途经施用本发明的化合物、疫苗和组合物，本领域技术人员容易确定对于要处理的状况的最合适的途经和剂量。现场医生或兽医有权决定剂量，并且取决于要处理的状况的性质和状态，接受处理者的年  
20 龄和一般健康状态，给药途经，和此前的所有处理。

载体或稀释剂，和其它赋形剂取决于给药途经，并且本领域技术人员容易确定何种特殊情况最合适的剂型。

对于本发明的目的，清楚地认识到术语"包含"意指"包括但不限于"，而术语"包括"具有相应的意义。

25

#### 附图说明

特别地，参照附图描述本发明的优选方面，其中：

30 图 1 说明银染色 12%聚丙烯酰胺凝胶的照片，说明来自 *Bovicola ovis* 虱的指定制剂中含有的蛋白质泳带。注意所述泳带在 D 泳道大约 28.5, 42 和 83 kDa；

图 2 说明与来自用可溶性 *Bovicola ovis* 粪抗原免疫的小鼠衍生的杂交

瘤的单克隆抗体反应的可溶性 *Bovicola ovis* 抗原的蛋白质印迹照片。注意主要泳带是大约 28.5kDa, 少量泳带是 83kDa(30-32 泳道, C 和 D)和大约 14kDa(27 和 28 泳道);

5 图 3 用来将成熟 Bol 蛋白质的编码序列克隆到 AY2-4 载体中的策略图  
示;

图 4 说明与 Bol 单克隆抗体反应的纯化的天然和重组 Bol 的蛋白质印迹照片。注意与天然 Bol 相比, 重组体的表观分子量更高;

图 5.说明 Bol 单克隆抗体与选择的昆虫和螨的可溶性抗原的交叉反应性的测定;

10 图 6.说明与羊羔中寄生虫评分相比, 使用 Bol 单克隆抗体, 利用抗原捕获 ELISA 检测的羊毛样品中 Bol 抗原的水平;

图 7.说明对三只侵染了虱子的绵羊(L1, L2, L3)和三只没有侵染虱子的绵羊(LF1, LF2, LF3)真皮内注射抗原和对照溶液之后获得的皮试结果; 和

15 图 8.说明对天然 *Bovicola ovis* 抗原和纯化的 Bol 蛋白质特异性的羊 IgE 的 ELISA 检测结果。

### 序列简述

SEQ ID NO.1 是完整 Bol 蛋白质的编码 DNA 的核苷酸序列。

SEQ ID NO.2 是完整 Bol 蛋白质的氨基酸序列。

20

### 发明详述

本申请人第一次证明 *Bovicola ovis*-侵染的绵羊获得对侵染虱子的免疫反应。使用从整个虱子或者从虱子粪标本分离的本发明可溶性变应原天然制品看到这些反应的证据。

25 本发明提供了基本上纯的虱多肽变应原, 其具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列或者与其基本上具有相同活性的其片段或变体。优选地, 所述多肽对受到虱子侵染的动物诱导体液和/或细胞免疫应答, 或者所述多肽是与其基本上具有相同活性的其片段或变体。

30 术语"基本上纯的"意指基本上从天然存在所述多肽的细胞或生物体中污染蛋白或肽或者其它材料分离或者分出, 并且包括通过标准纯化技术纯化的多肽及通过重组技术制备的多肽和化学合成的多肽。优选的多肽是从整个

虱子或虱子粪制品纯化的。

这里使用的术语"变体"指核苷酸和多肽序列，其中核苷酸或氨基酸序列表现出与图中的核苷酸或氨基酸序列基本上 60%或者更大的同源性，优选与本发明的序列有 75%同源性，最优选有 90-95%同源性-根据 GAP 或  
5 BESTFIT(核苷酸和多肽)，或者 BLASTP(多肽)或者 BLAST X(核苷酸)评价。通过象插入，取代或缺失一个或多个核苷酸或氨基酸这样的对天然核苷酸或氨基酸的修饰作用可以得到变体，或者它可以是天然存在的变体。术语"变体"也包括在如 65℃下 2 x SSC 定义的标准杂交条件下或者优选地在如 55℃  
10 下 6 x SCC 定义的严谨杂交条件下与本发明的序列杂交的同源序列。期望获得这样一种变体的情况下，适当地改变天然 DNA 的核苷酸序列。这种改变可以通过 DNA 合成或者通过天然 DNA 的修饰来实现，例如通过定点或者盒诱变。优选地，在 cDNA 或者基因组 DNA 的某些部分需要序列修饰时，应用本领域公知的技术，使用定点引物诱变(site-specific primer directed mutagenesis)。

15 术语"配体"指可以与另一种分子例如多肽或肽，结合的任何分子，并且包括但不限于抗体，噬菌体展示分子。

术语"组织"指专有细胞的连续集合体，并且包括但不限于：皮肤，皮毛，头发，羊毛和皮革。

读者明白基本上与本发明的多肽具有相同功能的本发明多肽模拟物也  
20 包括在本发明范围内。本领域技术人员可以制备这样的模拟物。

本发明的多肽可以用多种方法制备。例如，可以通过从自然来源分离，通过使用任何合适的公知的技术(如通过 Merryfield (1963), J. Amer. Cherry. Soc. Vol 85:2149-2156 描述的分步固相合成)，或者优选地，通过利用 DNA 技术来制备。

25 类似地，通过本领域公知的技术可以制备所述多肽的变体。例如，通过如 Adelman 等 DNA 2:183(1983)所述的编码天然氨基酸序列的 DNA 的定点诱变可以制备变体。

另外，在优选的实施方案中也使用与本发明的氨基酸序列基本上相同的多肽。这里"基本上相同"指两个序列，当例如通过 GAP 或 BESTFIT 程序使  
30 用默认缺口权重优化排列时，或者根据计算机算法 BLASTP 测定时，共有至少 60%，优选 75%，并且最优选 90-95%序列同一性。优选地，不相同的残

基位置区别在于保守型氨基酸取代。例如，具有类似化学性质例如电荷或极性的氨基酸的取代作用不可能影响蛋白质的性质。例子包括谷酰胺取代天冬酰胺或者谷氨酸取代天冬氨酸。

5 优选情况下，可以重组技术来制备本发明的多肽，第一步骤是获得编码期望产物的 DNA。这样的 DNA 构成本发明的又一方面。本发明的 DNA 可以编码本发明的天然产物或者本发明修饰的多肽或其活性片段或变体。

优选地，所述 DNA 包括编码本发明虱变应原性多肽的核酸分子，并且更优选地，所述核酸分子包含 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列或者其功能片段或变体。

10 术语"分离的"意指基本上从天然存在所述核酸的细胞或生物体中污染的序列分离或者纯化，并且包括通过标准纯化技术纯化的核酸及通过重组技术制备，包括 PCR 技术制备的核酸和化学合成的核酸。优选地，核酸分子是从 *Bovicola ovis* 咀嚼虱的基因组 DNA 或者 mRNA 衍生的。

15 DNA 可以从任何合适的天然来源分离或者利用常规技术制备为没有内含子的 cDNA。在允许要制备的活性片段的大小的情况下也可以合成寡核苷酸的形式制备 DNA。举例来说，可以利用 Matteucci 等 J. Am. Chem. Soc. Vol 103:3185-3191(1981)的 Triester 方法。

20 如果期望，本发明的 DNA 也可以编码包含本发明的多肽和载体蛋白质的融合蛋白。在控制条件下，通常从多肽，其片段或变体裂解出该载体蛋白质。通常使用的载体蛋白的例子是 $\beta$ 半乳糖苷酶和谷胱甘肽-S-转移酶。

如上所指出的，也可能的是由于插入，取代或缺失一个或多个氨基酸，所述多肽的变体与天然氨基酸序列不同。如果期望这样一种变体，则适当地改变天然 DNA 的核苷酸序列。这种改变可以通过 DNA 的选择性合成或者通过天然 DNA 的修饰来实现，例如通过定点或者盒诱变。优选地，在 cDNA 25 或者基因组 DNA 的某些部分需要序列修饰时，应用本领域标准技术，使用定点引物诱变。

30 最优选地，本发明涉及来自绵羊身上 *Bovicola ovis*，一种咀嚼虱寄生虫的蛋白质变应原。本领域技术人员认识到编码 DNA 中可以存在核苷酸多态性，并且蛋白质中可以存在氨基酸多态性。另外，本领域技术人员明白预计其它咀嚼虱(食毛目亚目)中存在相同或者基本上相似的蛋白质。在对来自 *B. Ovis* 的蛋白质已经证明的应用中可以有利地使用这样的蛋白质。所述蛋白质

或者其部分的编码 DNA 和氨基酸中所有这样的序列变异都包括在本发明的范围内。

另一方面,本发明包括适合在制备本发明的多肽或肽中使用的可复制转移载体。这些载体可以根据本领域公知的技术构建,或者可以选自本领域可获得的克隆载体。

可以根据要使用的宿主或宿主细胞选择克隆载体。有用的载体一般具有以下特征:(a)能自我复制;(b)携带对于任何特定限制性内切酶的单一靶位;和(c)期望地,携带可容易选择的标记物例如抗生素抗性的基因。

具有这些特征的两种主要类型载体是质粒和细菌病毒(噬菌体)。目前优选的载体包括噬菌体  $\lambda$  Uni-ZAP<sup>TM</sup> XR 和修饰的质粒 pBAD18 载体, AY2-4(参见图 3 和 Guzman, L., Belin, D., Carson, M. J. 和 Beckwith, J. (1995), Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177:4121-4130)。

通过在可复制表达载体中,将合适的调控序列与本发明的 DNA 分子可操作连接,可以表达本发明的 DNA 分子。调控序列可以包括复制起点,启动子,增强子和转录中止子序列。表达载体中包括的调控序列的选择取决于要用来表达 DNA 的宿主或宿主细胞的类型。

一般情况下,真核细胞,酵母,昆虫或者哺乳动物细胞是有用的宿主。质粒载体也包括在该术语宿主中。合适的原核细胞宿主包括大肠杆菌,芽孢杆菌种和假单胞菌的各个种。通常使用的启动子例如( $\beta$ -内酰胺酶(青霉素酶)和乳糖(lac)启动子系统是本领域公知的。可以使用与选择的宿主相容的任何可获得的启动子系统。在酵母中使用的载体也可获得并且是公知的。合适的例子是 2 微米复制质粒起点。

类似地,在哺乳动物细胞中使用的载体也是公知的。这样的载体包括 SV-40,腺病毒,逆转录病毒衍生的 DNA 序列,单纯疱疹病毒的公知的衍生物,和质粒和噬菌体 DNA 结合衍生的载体。

此外,真核细胞表达载体是本领域公知的(例如 P. J. Southern 和 P. Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 327-341 (1982); S. Subramani 等, *Mol. Cell. Biol.* 1, 854-864 (1981); R J. Kaufmann 和 P. A. Sharp, "Amplification and Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reducase Complementary DNA Gene, *J.Mol. Biol.* 159, 601-621 (1982); R J. Kaufmann 和

P. A. Sharp, Mol. Cell. Biol. 159, 601- 664 (1982); S. I. Scahill 等, "Expressions And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells, "Proc. Natl.Acad. Sci. USA. 80, 4654-4659 (1983); G. Urlaub 和 L. A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 77, 5 4216-4220, (1980).

用于本发明的表达载体包含至少一个与要表达的 DNA 序列或片段操作连接的表达调控序列。为了控制和调节克隆的 DNA 序列的表达, 在载体中插入调控序列。有用的表达调控序列的例子是 lac 系统, trp 系统, tac 系统, trc 系统,  $\lambda$  噬菌体的主要操纵子和启动子区, 酵母酸性磷酸酶的糖酵解启动子, 例如 Pho5, 酵母  $\alpha$ -交配因子的启动子, 和从多形瘤, 腺病毒, 逆转录病毒和猴病毒衍生的启动子, 例如早期和晚期 SV40 启动子, 和已知控制原核和真核细胞和它们的病毒或者其组合的基因表达的其它序列。

这里使用的优选的启动子是阿拉伯糖启动子(Guzman, L., Belin, D., Carson, M. J.和 Beckwith, J., 1995.), 但是, 本领域技术人员明白所有合适的启动子包括在本发明范围之内。

在载体的构建中, 通过方便快捷的测试能区别插入外来 DNA 的载体和未修饰的载体也是有利的。用于这样的测试中的报道基因系统包括报道基因, 和产生可检测的颜色变化, 抗生素抗性等的其它可检测标记。在一个优选的载体中, 使用  $\beta$ -半乳糖苷酶报道基因, 通过在 X-gal 平板上表现出蓝色表型的克隆可检测该基因。这有利于筛选。在一个实施方案中, 多角体蛋白-编码基因可以置换  $\beta$ -半乳糖苷酶基因; 当用 X-gal 染色时, 通过表现出白色表型的克隆可检测该基因。这种蓝-白色筛选可以用作检测重组载体的有用标记物。

一经筛选, 利用常规方法例如冷冻-解冻提取之后纯化可以从培养物中分离载体。

对于表达, 向宿主或宿主细胞中插入或转化包含要表达的本发明 DNA 和控制信号的载体。一些有用的表达宿主细胞包括公知的原核细胞和真核细胞。一些合适的原核宿主包括例如大肠杆菌, 如大肠杆菌 S G-936, 大肠杆菌 HB 101, 大肠杆菌 W3110, 大肠杆菌 X1776, 大肠杆菌 X2282, 大肠杆菌 DHT, 和大肠杆菌 MRO1, 假单胞菌, 芽孢杆菌, 如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis), 和链霉菌。合适的真核细胞包括酵母和其它真菌, 昆虫, 动物细胞,

如 COS 细胞和 CHO 细胞, 组织培养物中的人细胞和植物细胞。

根据使用的宿主, 根据适合这样的细胞的标准技术进行转化。对于包含大量细胞壁的原核细胞或其它细胞, 可以使用钙处理方法(Cohen, S N Proc Nat Acad Sci, USA 69 2110 (1972))。对于没有这样的细胞壁的哺乳动物细胞, 5 优选 Graeme 和 Van Der Eb, Virology 52:546 (1978)的磷酸钙沉淀方法。利用根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)可以进行对植物的转化作用(Shaw 等, Gene 23:315 (1983), 或者根据 Van Solingen 等, J. Bact. 130:946(1977)和 Hsiao 等, Proc Nat Acad Sci, USA 76:3829 (1979)的方法转化到酵母中。

10 使用合适的载体对所选的宿主进行转化, 通过培养宿主细胞, 可以产生编码的多肽, 该多肽经常是融合蛋白形式。

如上所述通过快速测试可以检测本发明的多肽。然后根据需要回收和纯化所述多肽。利用本领域公知的方法可以实现回收和纯化, 例如通过吸附到阴离子交换树脂上并且从中洗脱。制备本发明多肽的该方法构成本发明的又一方面。

15 转化有本发明载体的宿主细胞也构成本发明的又一方面。

另一方面, 本发明提供结合本发明多肽的配体。

在一个优选的实施方案中, 所述配体可以是抗本发明多肽的抗体或者抗体片段。这样的抗体可以是多克隆抗体, 但是优选单克隆抗体。

20 根据 Koelle 等; Cell 67:59-77, 1991 使用的方法可以制备多克隆抗体, 该文献在此引作参考。在美国专利 5,514,578 中概述了有用的抗体制备方法, 该文献在此引作参考。通过本领域公知的方法可以制备单克隆抗体。这些方法包括 Kohler 和 Milstein 在 Nature 256:495-497(1975)中描述的免疫方法, 以及通过 Huse 等 Science 246:1275-1281(1989)描述的重组 DNA 方法。作为参考, 美国专利 5,514,578 中详述的所有测试方法也适合在此使用。

25 对于三级结构和 Bol 变应原(特别是配体结合域)和它的配体之间的空间相互作用的理解为选择高特异性配体提供了途径, 所述配体只有通过天然受体配体-结合结构域的修饰作用才可以被结合。还有, 这样的知识将为使用 Bol 变应原与配体的结合的新设计提供方向, 并且通过例如噬菌体差别展示技术为设计和筛选具有高特异性的配体的肽模拟物提供方法。

30 在另一个实施方案中, 所述配体可以包括从天然来源包括植物, 动物和昆虫来源衍生的结合本发明多肽的分子。产生 Bol 变应原模拟物的昆虫提取

物是特别令人感兴趣的。

因此，另一方面，本发明提供测试样品中存在配体的方法。使用多肽作为配体结合制剂或探针的测试方法是本领域技术人员具有的能力。对用作探针的片段的筛选使得功能上特别相关的片段分离。例如，如果使用本发明的  
5 多肽结合域的片段作为探针，可以鉴定分离相同或相似多肽结合域，并且确定编码 DNA。

还认识到对 *Bovicola ovis* 高特异性探针的筛选为以快速而高特异性方式检测样品中存在 *Bovicola ovis* 提供了机会。

要筛选的材料样品可以制备成底物溶液形式，然后暴露于配体结合制剂  
10 或探针。根据本领域公知的方法可以检测配体结合制剂/探针复合体的存在。这样的方法的例子包括凝集作用，放射免疫测试，荧光或者酶学免疫测试技术。合适的筛选试验是 ELISA 测试。在本发明的该方法中优选的是 Bol 结合域被用作配体结合制剂。

本发明的另一方面提供了适合在这样的测试中使用的测试试剂盒。这样的  
15 测试试剂盒的例子是包括本发明的配体结合制剂的 ELISA 测试试验试剂盒。

另一方面，本发明提供了测试样品是否存在多肽或者其片段或变体或者  
20 外寄生虫的粪中排泄的其它抗原分子的方法，所述外寄生虫是各物种特异性的或是其相关族。这样的方法的例子包括凝集作用，放射免疫测试，荧光或者酶学免疫测试技术。合适的筛选试验是 ELISA 测试，包括与外寄生虫的粪中鉴定的抗原分子结合的配体。这样的测试能方便和快速地从宿主筛选多个样品，用来检测外寄生虫对宿主的侵染。

在本发明的该方法中，优选将单克隆抗体用作检测外寄生虫侵染的配体。

25 本发明的另一方面提供了适合在这样的测试中使用的测试试剂盒。这样的测试试剂盒的例子是包括本发明的配体的 ELISA 测试试剂盒。

本发明的另一方面提供了通过真皮内皮试诊断宿主对寄生虫超敏反应的方法(寄生虫对宿主的之前或现在的侵染)。在该方法中，对宿主真皮内注射本发明的多肽或者其片段或变体将诱导超敏反应宿主皮肤中特征性特异  
30 反应，相反在没有致敏的宿主中极少或没有反应。超敏反应宿主的反应包括在注射位点至少一种下面的反应：风块，潮红，硬结。利用变应原制剂和负

对照制剂注射和紧邻皮肤位点组胺注射的真皮内皮试是本领域技术人员公知的。该方法的体外矫正也是本领域技术人员公知的并且包括使分离的宿主组织或细胞接触如上定义的本发明的多肽，并且测定免疫学介导的对组织或细胞的刺激作用，例如，组胺自嗜碱细胞释放或者淋巴细胞的增殖或转化。

- 5 使用如上定义的本发明的多肽，与使用天然抗原制剂的公开的方法相比，提高了 *Bovicola ovis* 对宿主的免疫致敏作用的该方法的特异性(Pfeffer, Phegan 和 Bany (1997)); Bany, Pfeffer 和 Phegan (1995); Bany, Pfeffer, Phegan 和 Heath(1995)。

10 使用模拟这些实施方案的蛋白质，肽和/或特异性抗体或合成分子的诊断测试或试验认为是本发明的部分，并且首先用于对动物鉴定咀嚼虱的侵染，其次鉴定侵染的动物体内或体外超敏反应。

对本领域技术人员显而易见的是，特异性结合或模拟受试蛋白质和肽和抗体的受试多肽，肽和抗体或者其它分子可以用作新制剂，用以控制咀嚼虱侵染或者防止或抑制作为这样的侵染的结果产生的免疫超敏反应，因此包括  
15 在本发明的范围之内。首先，可以将天然或修饰形式的蛋白质或肽，该蛋白质的总编码 DNA 或者其部分，插入该蛋白质全部或部分的重组体，转染和/或表达所述蛋白质或肽的编码 DNA 或 RNA 的生物体，和拷贝或模拟所述蛋白质或肽的合成分子配制成诱导宿主对咀嚼虱的保护性免疫的疫苗。

此外，可以使用对本发明的蛋白质或肽的表位特异性的抗体，或者模拟  
20 这些抗体的合成分子使宿主被动免疫，使得部分或者完全保护宿主不受虱子的侵染。其次，可以使用天然或修饰形式的蛋白质或肽，转染和/或表达所述蛋白质或肽的编码 DNA 或 RNA 的生物体，或者模拟特异性抗体的特异性单克隆抗体或多克隆抗体或合成分子来破坏咀嚼虱或者干扰咀嚼虱的生理过程。第三，天然或修饰形式的蛋白质或肽，该蛋白质的总编码 DNA 或者其  
25 部分，插入该蛋白质全部或肽的重组体，转染和/或表达所述蛋白质或肽的编码 DNA 或 RNA 的生物体，和模拟所述蛋白质，肽或特异性抗体的合成分子可以配制成处理物质来预防，减轻或逆转宿主动物响应咀嚼虱侵染而产生的变应性超敏反应。本专利也包括这些应用。

可以将本发明的蛋白质或肽配制成疫苗，当对动物施用时可以诱发抗寄  
30 生虫的保护性反应。或者，可以将本发明的多核苷酸分子插入载体或质粒或转化到宿主中，当对动物施用时也可以诱发抗寄生虫的保护性反应。也可以

对动物全身施用抗体，抗体片段，噬菌体展示分子，或者含有或者分泌这样的分子的转化宿主，从而提供被动保护。对于虱子的生存力或生殖力重要的功能可能需要 Bol 蛋白质，因此本发明可以用来干扰该功能，从而防止或控制虱子的侵染。可以从本发明序列的知识设计阻断蛋白质的这种功能或者破坏寄生虫中该蛋白质产生的调节的合成或重组分子，合成并且有利地施用于动物。在防止导致超敏反应的免疫应答的发生或者下调该免疫应答的方案中，通过对易感动物施用本发明的蛋白质，肽，多核苷酸分子或转化的宿主可以防止或降低寄生虫侵染诱导的超敏反应。这样的方案的例子可以包括施用途经的变化，或者和各种佐剂，细胞因子或生物体一起施用。本发明还可以用来确定在宿主动物中诱导的超敏反应中重要的 Bol 蛋白质的 B 和 T 细胞表位。这可以通过合成重叠肽并且测定来自超敏反应宿主的抗体或者 T 细胞对各种肽的识别来实现。这样确定的表位可以用于防止或控制超敏反应。例如，在肥大细胞上没有交联 IgE 危险的动物宿主的脱敏方案中，可以使用包含本发明蛋白质表位的肽，从而诱发过敏反应。本发明包括本文所描述的这些应用。

现在将提供详细说明本发明的非限制性实施例。

应该明白只是通过举例提供对上文的说明，本发明包括本领域技术人员公知的使用的材料和技术两方面的变化。

## 20 实施方案

### 实施例 1

从整个虱子和虱子粪中制备可溶性抗原

从受侵染的绵羊收集活体若虫和成虫 *Bovicola ovis*，并且通过抬高培养皿的一边使虱子迁移到较低的一边而从玻璃培养皿中与羊毛和任何其他碎屑分开。然后将虱子放在陶瓷研钵中并且通过加入液氮迅速冷冻。在保持随液氮研磨的同时，用小槌将虱子磨成细粉。然后使粉末简短地解冻并且以 10 毫升/克虱子的比率加入含有 1 mM Pefabloc® (Boehringer Mannheim) 的冷磷酸盐缓冲盐水。将该制备物转移到玻璃匀浆器中并且保持在冰上并且匀化。将该制备物超离心(10,000g, 20 分钟, 4°C)去除颗粒物质。含有可溶性抗原的上清液通过无菌 0.2 微米过滤器过滤。对于短期贮存，上清液保持在 4°C。对于长期贮存，上清液以 1:1 体积比与甘油(AnalaR®, BDH)混合并且在 -20

℃贮存。典型地，用5%三氯乙酸沉淀之后利用BCA Protein Assay (Pierce)测定时，与甘油混合之后上清液的蛋白质浓度是每毫升2-3毫克。图1给出从整个虱子制备的天然可溶性抗原的复杂性质。

5 为了获得虱子粪，根据Hopkins, 1970, *In vitro* colonization of the sheep biting louse, *Bovicola ovis*. (*Annals of the Entomological Society of America*. 63:1196-1197)的方法，在控制的温度和相对湿度条件下，在干净的玻璃培养皿中将从羊毛和碎屑分离的虱子保持过夜。然后将虱子从皿中倒出，并且去除沾在平皿表面的所有的死虱，虱子的部分或其他碎屑。将与玻璃皿粘着的粪沉积物悬浮于含有1mM Pefabloc®的10ml磷酸盐缓冲盐水中，并且转移  
10 到保持在冰上的玻璃匀浆器并且匀化。然后如上所述将该制备物超离心并且过滤并且在4℃贮存。通过280nm处的吸光度或者通过BCA Protein Assay (Pierce)测定可溶性虱子粪抗原制备物中的蛋白质水平。

## 实施例2

### 15 羊IgE的分离和与亲和柱的偶联

从受*B. ovis* 侵染的绵羊收集血清，通过ELISA筛选鉴定具有与全虱可溶性抗原结合的较高IgE水平的那些血清。然后用洗涤缓冲液(50mM磷酸盐缓冲剂，500mM NaCl缓冲剂，pH 7.0)将选择的血清稀释1-5体积，并且通过0.2微米过滤器过滤。使用通过使对羊IgE特异的单克隆抗体与HiTrap  
20 NHS-活化柱(Pharmacia Biotech)偶联而制成的免疫亲和柱分离稀释的血清中的IgE，如Shaw, R. J., Grimmett, D. J., Donaghy, M. J., Gatehouse, T. K., Shirer, C.L.和Douch, P. G. C. 1996, *Production and characterisation of monoclonal antibodies recognising ovine IgE. Veterinary Immunology and Immunopathology*. 51:235-251所述。来自IgE特异性亲和柱的洗脱物对冲洗缓冲液透析，并且  
25 使该制备物流经偶联无关单克隆抗体或者蛋白质G的亲和柱而进一步纯化。通过还原条件下SDS PAGE对得到的制备物的分析表明高纯度水平(>90%)的IgE重链和轻链典型泳带。根据厂商说明，大约10mg的羊IgE偶联于1ml的HiTrap NHS-活化柱(Pharmacia Biotech)。

### 30 实施例3

利用羊-IgE免疫亲和层析从*Bovicola ovis*分离天然变应原

根据实施例 1 制备天然可溶性 *B. ovis* 和 *B. ovis* 粪抗原制剂,除了稀释剂是洗涤缓冲液(50mM 磷酸盐缓冲剂, 500mM NaCl 缓冲剂, pH7.0)。稀释的抗原制剂加载到根据实施例 2 制成的羊 IgE 免疫亲和柱上。然后用冲洗缓冲剂冲洗柱子, 并且用 pH3.0 的 100mM 甘氨酸洗脱天然变应原。通过以 1:10(v/v)的比例加入 1M Tris, 1.5M NaCl, pH8.0 将洗脱物调至中性 pH。通过超滤浓缩变应原洗脱物(Microsep™ Centrifugal Concentrators, Pall Filtron Corporation, 截留值 3000 kD)并且通过还原条件下的 SDS-PAGE 检测。真皮内皮证实来自整个虱子和虱子粪抗原制剂的洗脱物含有变应原。

#### 10 实施例 4

##### 单克隆抗体的制备

用以 1:1 与弗氏完全佐剂混合的虱子粪抗原制剂(最多 1 毫克总蛋白)对 BALB/c 小鼠皮下注射, 并且两次用弗氏完全佐剂中相同量的虱子粪抗原膜内加强。通过与虱子粪抗原反应性的 ELISA 分析来自小鼠的血清样品鉴定表现出强抗体应答的小鼠。通过标准技术融合来自选择的小鼠的脾淋巴细胞和 NS-1 骨髓瘤细胞。在 5, 24 孔平板上在含 BALB/c 胸腺细胞的条件选择培养基中在 1 毫升培养物中平板培养得到的杂交瘤。接着, 通过 ELISA 对孔中的培养基筛选识别可溶性粪抗原的小鼠 IgG 抗体。以每孔 0.5, 1 和 2 个细胞的平均浓度在 96 孔培养平板上限制性稀释来自阳性孔的杂交瘤。对这些杂交瘤再一次筛选识别天然可溶性虱子粪抗原的抗体。还通过 ELISA 筛选产生抗粪抗原的抗体的克隆, 测定该抗体与根据实施例 3 描述制备的分离的天然变应原的反应性。通过限制性稀释第二次克隆被鉴定为产生抗天然变应原的抗体的单一杂交瘤。扩增来自第二次克隆的杂交瘤并且深低温保藏。对于进一步使用所选的单克隆抗体是小鼠 IgG-1 同种型。对于单克隆抗体的制备, 通过标准培养技术扩增克隆的杂交瘤, 使长满并且收集上清液。

该杂交瘤分泌的单克隆抗体识别在天然虱子或虱子粪抗原的蛋白质印迹上具有 28.5 kDa rMW 主要部分的免疫显性分子(图 2)。这对应于整个虱子和虱子粪抗原制剂的通过 IgE 亲和层析获得的推定的天然抗原的 SDS PAGE 上观察到的主要泳带之一。在大约 14, 42, 和 83 kDa rMW 也观察到次要泳带。较高 rMW 部分显示代表多个 14kDa 泳带, 即,  $2 \times 14 = 28$  (~28.5),  $3 \times 14 = 42$  和  $6 \times 14 = 84$  (~83)。

由上述单克隆抗体鉴定的蛋白质指定为 Bol。

#### 实施例 5

##### Bol 变应原的纯化

- 5 根据实施例 4 所述制备的单克隆抗体经蛋白质 G 亲和层析柱纯化并且以实施例 2 所述相似的方法偶联于 HiTrap NHS-活化柱(Pharmacia Biotech)。使用该柱子从根据实施例 1 所述制备的可溶性整个虱子抗原获得洗脱物。

来自单克隆抗体亲和柱的洗脱物含有高纯度蛋白质,该蛋白所具有的特征与通过 SDS PAGE(图 1)和该单克隆抗体探测的蛋白质印迹(图 2)在天然虱子抗原中观察到的蛋白质相吻合。另外,在蛋白质印迹和 ELISA(图 8)中来自虱子侵染的绵羊的 IgE 识别该纯化的变应原。真皮内皮试证明与没有虱子的羊羔相比受虱子侵染的羊羔体内存在对 Bol 的特异性应答(图 7)。

#### 实施例 6

- 15 Bol 变应原的氨基酸测序

使利用单克隆抗体亲和柱纯化的天然 Bol 进行还原条件下的 SDS PAGE, 并且利用制备蛋白质的标准技术对 PVDF 膜电印迹(Problott™, Applied Biosystems)用于测序。用 0.1% Ponceau S 将 PVDF 膜染色并且鉴定 28.5kDa 泳带并且将其剪下。用含有 0.1%三乙胺的甲醇简短地洗涤膜条之后

20 单独用甲醇洗涤两次。在气相仪器(470AR/120A/920A/610A, Applied Biosystems)中进行自动微量测序。获得的 N-末端氨基酸序列是

(a) SPTELDLRLLVETARDISVILFKNLHAGYN

还原条件下 SDS PAGE 之后从凝胶上切下 Bol 28.5 kDa 泳带用于凝胶内胰蛋白酶消化。根据 Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C.和 Ferrara, P.

25 (1992) In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one-or two-dimensional gel electrophoresis, Analytical Biochemistry 203:173-179 的方案进行凝胶内胰蛋白酶消化。然后在与微内径 HPLC (PE Biosystems, 140A delivery system and 1000S Diode array detector)相连的 Phenomenex Jupiter C18 柱(300 angstrom, 5 micron, 2 x 250mm)上分离从凝胶洗脱的肽。在 PE

30 Biosystems Procise 蛋白质测序仪(model 492)上使用厂商提供的化学品和方法对选择的肽测序。获得下面的序列

- (b) DISVILFK  
 (c) NLHAGYNEVNPVK  
 (d) VFTNIK  
 (e) IGEQVLK  
 5 (f) (I) NVIFK  
 (g) KLFDTEVPEVVK  
 (h) DISVILFK  
 (i) IEILLNELAPEAK  
 (j) TLIGALDQ (L) K

10

### 实施例 7

#### RNA 分离和 cDNA 文库构建

基本上如 Frenkel M. J., Savin K. W., Bakker R. E., 和 Ward C. W. (1989),  
 Characterization of clones coding for muscle tropomyosin of the nematode  
 15 *Trichostrongylus colubriformis*, *Molecular and Biochemical Parasitology*.  
 37:191-200 所述从 *B. ovis* 分离 RNA。用小槌和研钵在液氮上研磨在液氮中  
 快速冷冻的 *B. ovis* (100mg)。加入 1 毫升的 6M 盐酸胍, 0.2M 乙酸钠(pH5.2)  
 加 10mM  $\beta$ -巯基乙醇, 与 *B. Ovis* 研磨并且将粉末转移到微量离心管。加  
 入 200 微升的 95%乙醇, 并且将该混合物放置在干冰/乙醇上 5 分钟。将混  
 20 合物在 4°C 下离心 5 分钟, 然后将沉淀重新悬浮于 500 微升的 6M 盐酸胍,  
 0.2M 乙酸钠(pH5.2)加 10mM EDTA 中。重复乙醇沉淀和离心, 并且将沉淀  
 重新悬浮于 250 微升胍缓冲剂(7M 胍, 100mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1mM  
 EDTA, 0.1%(w/v) SDS, 然后加入 500 微升水饱和的苯酚:氯仿(1:1)。4°C 下离  
 心 10 分钟之后, 将水层转移到新试管中并且用乙醇沉淀 RNA, 干燥并且重  
 25 新悬浮于 50 微升的二次蒸馏水中。

使用 ZAP-cDNA®合成试剂盒(Stratagene)从 *B. ovis* mRNA 合成 cDNA  
 文库。用 T4 DNA 连接酶使 cDNA 连接噬菌体  $\lambda$  Uni-ZAP™ XR 载体臂并且  
 用 GIGAPACK® II Packaging Extract 包装。

30

### 实施例 8

#### Bol 的全编码 DNA 的克隆和表征

以 Bol 氨基酸序列为基础, 设计寡核苷酸引物(BoP14-A)与编码氨基末端区(实施例 6 中的氨基酸序列(a), (b), (c)和(h))的 Bol cDNA 杂交, 并且设计第二个寡核苷酸引物(BoP14-B)与编码内肽(实施例 6 中的氨基酸序列(g))的 Bol cDNA 杂交。设计寡核苷酸与 cDNA 的互补链杂交使得当用作与衍生自 B. ovis mRNA 的 cDNA 进行的聚合酶链式反应(PCR)中的引物时它们能扩增插入的 cDNA。

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

PCR 反应的条件是: 引物 0.3  $\mu$ M, dNTPs 200  $\mu$ M 和 20ng 模板, 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 45 $^{\circ}$ C 60 秒和 72 $^{\circ}$ C 60 秒, 3 次循环; 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 50 $^{\circ}$ C 60 秒和 72 $^{\circ}$ C 60 秒, 30 次循环, 然后在 72 $^{\circ}$ C 保持 10 分钟。

PCR 之后, 通过琼脂糖凝胶电泳鉴定大约 390 bp 的扩增的 DNA 片段。使用 Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA 纯化系统(Promega)纯化该片段, 然后使用 RTS RadPrime DNA 标记系统(Life Technologies)用[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP 进行放射性标记。使用放射性标记的 Bol cDNA 探针筛选 B. ovis cDNA 文库来鉴定与 Bol cDNA 同源的 DNA 克隆, 基本上如 Sambrook, J., Fritsch, E. F.和 Maniatis T. (1989). Molecular cloning:a laboratory manual, 第二版, 纽约(冷泉港实验出版社)所述。将来自该文库的大约 45000 个噬菌体菌落与大肠杆菌 XLI-Blue MRF'细胞在琼脂平板上铺板并且温育, 产生噬菌斑。将噬菌斑复制到 Hybond-N+尼龙膜(Amersham)上并且处理以备用探针杂交。鉴定阳性杂交菌落并且在它们被克隆之前这些是纯化的噬菌斑。使用与 cDNA 克隆位点周围的 DNA 杂交的引物通过 PCR 扩增 B. ovis cDNA 插入片段并且对 PCR 产物测序。从这些序列可以辨别 Bol 变应原的全编码序列(SEQ. ID No.1)。该序列预示具有氨基末端分泌型前导序列的大约 30kDa 的蛋白质。使用识别 B. Ovis 的优先密码子从核苷酸序列推导出氨基酸序列(SEQ. ID No.2), 并且在实施例 6 中测定 N-末端和内部序列。

### 实施例 9

#### 重组 Bol 蛋白质的表达

通过 PCR 从 B. ovis cDNA 模板扩增根据 N-末端氨基酸序列(实施例 6, 氨基酸序列(a))推测的编码成熟 Bol 蛋白质的 cDNA。从上面获得的 cDNA

序列(SEQ. ID. No.1)设计扩增 Bol DNA 的在 PCR 反应中使用的寡核苷酸引物。引物是

Bol-X2 CTTGCGGCCGCCATTTTTGCAACACAGTCTG

Bol-X3 CGCGGATCCATATGTCCCCAACAGAACTCGAT

- 5 设计引物 Bol-X2 使其与编码完整纯化的 Bol 蛋白质(实施例 6 中的氨基酸序列(a))的氨基酸测序鉴定的成熟蛋白的氨基末端的 Bol cDNA 同源。设计引物 Bol-X3 使其与羧基末端 Bol 氨基编码 DNA(SEQ. ID.No.1)同源。所述引物还包含限制性酶切位点以允许扩增的 DNA 连接到表达载体中。使用 Bol-X2 和 Bol-X3 引物和 Bol cDNA 模板进行标准 PCR 反应(95°C 30 秒, 50
- 10 °C 30 秒, 和 72°C 1 分钟 35 次循环)之后, 通过琼脂糖凝胶电泳确定大约 700bp 的产物。该 PCR 片段用 NdeI 和 NotI 核酸内切酶消化并且亚克隆到 AY2-4 载体中, AY2-4 载体是 pBAD18 的衍生物(Guzman, L., Belin, D., Carson, M. J. 和 Beckwith, J. (1995), Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.*
- 15 177:4121-4130.), 产生图 3 所示的 Bol 表达载体。扩增的编码 DNA 与表达载体连接, 导致完整成熟 Bol 编码序列与表达载体的起始甲硫氨酸密码子在 NdeI 限制性酶切位点处融合。Bol cDNA 的羧基编码末端在读框内与携带编码 E-标记表位(Pharmacia)和九肽 AAAHHHHHH 的随后是终止密码子的 DNA 的载体 DNA 在 NotI 位点连接。该表达载体驱动连接的编码 DNA 从阿
- 20 拉伯糖 PBAD 启动子表达, 因此当电穿孔到大肠杆菌 XL2 中时, 对外源阿拉伯糖的反应是在培养基中产生重组 Bol (Guzman, L., Belin, D., Carson, M. J. 和 Beckwith, J. (1995)。该方法产生的重组 Bol 具有包括 E-标记表位和九肽 AAAHHHHHH 的羧基末端融合体。

- 25 通过向生长培养基(Luria-Bertani 培养基, Sigma, 有氨苄青霉素, Sigma, 100 微克/ml)加入 0.2% L (+)阿拉伯糖诱导转化的大肠杆菌表达重组 Bol。在细菌胞质溶胶中产生表达的重组蛋白质并且通过对细菌超声处理来提取, 通过离心去除不溶性物质。然后利用羧基末端的六组氨酸标记对固定化镍 (HiTrap<sup>TM</sup> 螯合柱, Amersham Pharmacia Biotech AB)的亲合性通过固定化金属亲和层析纯化重组 Bol (rBol), 并且用递增浓度的咪唑介质洗脱。一些 rBol
- 30 制备物经 Bol mAb 亲和柱(实施例 5)进一步纯化。因为重组蛋白质具有羧基末端融合体部分, 所以在还原条件下的 SDS PAGE 上, 该重组蛋白具有比天

然蛋白质高的 rMW(大约 29.5 kDa) (图 4)。

在蛋白质印迹(图 4)和 ELISA 中用 Bol mAb 识别 rBol。在初步试验中,与没有虱子侵染的绵羊相比,在 ELISA 中来自虱子侵染的绵羊的 IgE 也优先识别 rBol。

5

#### 实施例 10

##### Bol mAb 对 B. Ovis 的特异性

在 ELISA 中通过测定 Bol mAb 与由新西兰的可能侵染绵羊的各种代表性昆虫和螨制备的可溶性抗原制剂的反应性检测 Bol mAb 对 B. Ovis 的特异性。通过在玻璃匀浆器中在含有 1mM Pefabloc® (Boehringer Mannheim)的冷 PBS 中破碎昆虫而从成虫白蛉,成虫蚊子和丽蝇蛆制备抗原。离心使抗原制剂澄清。根据实施例 1 所述制备 B. ovis 抗原。商业上可购得 D. pteronyssinus 抗原(变应原提取物, Standardized Mite DP, Bayer Corporation)。适当稀释之后,使用抗原包被微量滴定平板中的各孔,并且使用 Bol mAb 作为一抗,山羊抗-小鼠 IgG 偶联物作为二抗,利用标准方法进行 ELISA。Bol mAb 表现出只与从 B. ovis 制备的抗原的实质的反应性(图 5)。

#### 实施例 11

##### B. ovis-特异性抗体在体外诊断测试中检测虱子侵染的用途

如下面实施例所述,应用抗原捕获 ELISA 检测虱子侵染和没有虱子侵染的羊羔的羊毛是否存在 Bol。

对牧养的 29 只虱子侵染的和 12 只没有虱子侵染的羊羔通过计数全身 12 处预测点处 10 厘米长羊毛部分中观察到的虱子的总数对虱子侵染水平进行评分。在羊羔的肩部中央与皮肤水平割下羊毛样品,并且放在各个纸袋中并且在室温下贮存。将各样品的一克羊毛放在玻璃容器中并且与 20ml 缓冲剂(PBS 加 0.5% Tween 20)在室温下混合 2 小时。清析上清液,并且在随后的抗原捕获 ELISA 中使用。

经蛋白质 G 亲和层析柱(Pharmacia)从杂交瘤上清液纯化对 Bol 特异性的单克隆抗体(Bol mAb),并且使用 30 kDa Ultrafree®-15 Centrifugal Filter Device (Millipore)浓缩。使用 NHS-LC-生物素(Pierce)根据厂商说明,将一半纯化的 Bol mAb 生物素化。用 PBS(2 微克/毫升)中没有生物素化的 Bol mAb

包被 Maxisorp™ 微量滴定板(Nunc), 在室温下包被 2 小时, 用冲洗缓冲液(含 150mM NaCl, 0.05% Tween 20 的 10mM 磷酸盐缓冲剂, pH7.2)冲洗三次, 并且用 blotto (10mM 磷酸盐缓冲剂, 其中含有 0.5% Tween 20, pH7.2)和 5%脱脂牛奶粉封闭。又冲洗 6 次之后, 室温下双份向平板中加入没有稀释的来自羊毛样品的提取物, 正对照(PBS 中的来自全虱的天然可溶性抗原)和负对照 (PBS 加 0.5% Tween 20)温育 1 小时。再次将平板冲洗 6 次并且室温下加入生物素化 Bol mAb(2 微克/ml)温育 1 小时。冲洗 6 次之后, 加入链霉亲和素-辣根过氧化物酶偶联物(2 微克/ml)温育 1 小时。使用四甲基联苯胺底物进行酶反应, 使用 1M 硫酸终止反应并且在 450nm 波长处读取各孔的吸光度。

10 所有 12 只没有侵染虱子的羊羔虱子评分为零, 并且在 ELISA 中呈阴性 (图 6)。29 只侵染了虱子的羊羔的结果与该虱子评分明显相关( $r=0.77$ ,  $P<0.001$ , 图 6)。利用该测试来检查绵羊群的虱子侵染, 从而帮助农夫合理利用抗虱子处理, 从而对绵羊产品和环境都减少化学残留。

## 15 实施例 12

通过使用纯化的 Bol 抗原的真皮内皮试体内诊断对 *B. ovis* 的免疫超敏反应。

使用 12 月龄的 3 只没有虱子的羊羔和 3 只侵染了虱子的羊羔。通过紧贴肩区切割下羊毛来为羊羔的真皮内皮试做准备。真皮内注射 0.1ml 体积的抗原和对照溶液。注射后 0.5, 5, 24 和 48 小时测量皮肤反应直径。根据实施例 5 所述纯化 Bol。使用 PBS 将中和的洗脱缓冲剂中的 Bol 稀释至大约 6.0 微克/毫升(通过 280nm 处的吸光度测定)。同样用 PBS 稀释的中和的洗脱缓冲剂是 Bol 的负对照溶液。将根据实施例 1 所述从全 *B. ovis* 制备的天然可溶性抗原稀释至 100 微克/毫升。天然 *B. ovis* 抗原的负对照是以 1:1 与甘油混合的 PBS, 并且同样稀释。使用 PBS 中的组胺 HCl(1 比 250000, w/v)来检测对组胺的反应能力。

25 皮试结果表明只有侵染了虱子的绵羊才对天然 *B. ovis* 抗原和 Bol 存在实质的反应(图 7)。由于反应(典型的 IgE)抗体-介导的机制, 30 分钟之内发生反应是超敏反应的典型情况, 而反应延迟至 5 小时或者更长时间, 则表明是细胞机制。

### 实施例 13

Bol 抗原在检测对 *B. Ovis* 的免疫超敏反应的体外测试中的用途。

作为诊断对 *B. ovis* 的超敏反应的真皮内皮试的替代方法，可以利用 ELISA 或者类似测试来检测免疫血清中对 Bol 的 IgE 的特异性。或者，可以利用类似的测试来检测具有对 Bol 特异性的其它绵羊免疫球蛋白同种型，提供宿主被寄生虫侵染的证据。

为了检测 Bol 特异性 IgE，用 SAS(饱和硫酸铵溶液)处理来自山羊的各个血清样品，减少竞争 IgG 水平。以 1:1(v/v)的比例向血清样品加入 70% SAS 盐水溶液，温育 30 分钟，定期搅拌。沉淀物旋转沉积(13000g, 10 分钟)，并且以 1:8 用含有 0.1% Tween 20 的蒸馏水稀释上清液，得到 1:16 的最终稀释度。接着进行标准 ELISA 程序，并且作出简要描述。用亲和纯化的 Bol(1:100 在 PBS 中)室温下将 96 孔微量滴定板包被 5 小时。用含有 0.5% Tween 20 和 5% 脱脂牛奶粉的 10 mM 磷酸盐缓冲液，pH7.2 将平板封闭 1 小时，之后用冲洗缓冲液(150mM NaCl, 0.05% Tween 20 于 10mM 磷酸盐缓冲液，pH 7.2) 冲洗 6 次。向双份孔中加入 SAS 处理过的血清，并且在室温下保持 1 小时，然后在 4℃ 保持过夜。然后用冲洗缓冲液将平板冲洗 6 次，并且加入稀释缓冲剂(5mg/ml BSA, 0.1% Tween 20 于 PBS 中)中的抗-羊 IgE 单克隆抗体，室温下温育 4 小时。冲洗之后，加入与辣根过氧化物酶偶联的山羊-抗小鼠 IgG(Sigma A3673, 1:1000 于稀释缓冲剂中)，37℃ 下温育 1 小时。再次冲洗平板，并且加入 0.1M 乙酸盐缓冲剂 pH6.5 加 0.1% DMSO 和 0.03% 过氧化氢中的四甲基联苯胺(0.1mg/ml, Sigma T8768)反应 15 分钟。使用 1M 硫酸终止反应并且在自动平板读数器上在 450nm 波长处读取吸光度。将使用 Bol 的 ELISA 的结果与使用天然 *B. Ovis* 抗原的类似 ELISA 相比较(图 8)。

与来自没有虱子的绵羊相比，使用全虱子抗原和纯化的变应原-包被的平板的 ELISA 展示出高得多的来自虱子侵染的绵羊的血清 IgE 的反应性(分别是  $P < 0.0001$  和 0.0025, 图 8)。63% (19/30) 的虱子侵染的绵羊表现出的 *B. ovis*-特异性 IgE 吸光度高于使用来自没有虱子的羊羔的血清获得的吸光度的平均值加 2 个标准差(图 8)。在相同条件的基础上，50% (15/30) 虱子侵染的羊羔的血清表现出比纯化的 Bol 变应原提高的 IgE 吸光度。该数据表明纯化的变应原是 *B. Ovis* 的主要变应原。在 13 份血清中，检测到提高的对两种抗原制剂的应答(图 8)。但是，在虱子侵染的绵羊中，观察到对两种抗原制剂的

IgE 应答之间只有中度关联( $r=0.49$ ,  $P>0.006$ ), 提示当使用纯化的 Bo1 变应原时, 天然虱抗原中存在其它变应原和/或较小的非特异性反应性。

### 讨论

- 5 申请人第一次体外证明了对虱子 *B. Ovis* 的抗原特异性的血清抗体应答 (包括 IgG 和 IgE) 和对用虱子 *B. Ovis* 抗原攻击的应答中从皮肤排放淋巴结获得的淋巴细胞的特异性增殖。另外, 通过真皮内皮试证实了对虱的免疫性应答, 其中 1 小时之内的应答大大反映出反应性抗体 (IgE 和其它嗜同种细胞抗体) 的存在, 24 小时和超过 24 小时的持久应答大大反映出细胞介导机制。
- 10 通过比较相同条件下虱子侵染的羊羔的应答和没有虱子的羊羔的应答确定不同免疫应答的特异性。通过组织学检测所确定的对虱子的免疫应答的性质和褶皱损伤的特征支持这样的概念, 即导致虱子侵染的绵羊毛皮缺陷的褶皱, 外表皮炎, 是对虱子的变应性 (或超敏反应) 免疫应答的结果。本发明的新的变应原和与其结合的配体可以在诊断, 预防和处理 *B. Ovis* 感染和相关变应
- 15 性疾病中使用, 其结果是改善羊毛和毛皮质量, 减少合成杀虫剂的使用并且提高农民的经济收益。

应该明白虽然本说明书使用了术语 "包含" (或者其语法同义词), 但是该术语不是为了限制, 本发明不排除存在其它特征或成分。因此, 术语 "包含" 等同于术语 "包括"。

- 20 只是以例举的方式描述本发明的各个方面, 要明白不脱离后面权利要求书中定义的其范围可以进行修饰和添加。

序列表

(1)一般信息:

(iii)序列编号: 2

5 (2)SEQ ID NO:1 的信息:

(i)序列特征

(A)长度: xxx 碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链: 单链

10 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA

(ix)特征:

(A)关键词

(B)位置:

15 (xi)序列描述: SEQ ID NO:1:

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

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

AACCCCAAAATCGAAATACTGTTGAACGAATTGGCCCCGAAGCTAAAGAAGGACTCCAAAAATTAATAAGAAATTAGAGATTTGGTCAAT  
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

20 GAAGAAGAAACCAGAATTAATGTCATCTTCAAACTCTTATTGGTGCTTTGGACCAACTGAAACCAATTAAGGCACCATGCGCCGACCCCGTT  
E 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

TCTAAAGAAGCTAAAAATTTGGCCAACGATGTTGAAAGGAAATCGTCAAATTCATTAATATTTAGAACAAAAATACGAAAAGGTATTTACA  
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

AACATCAAGAATGGAGTTACCAAAGTAATCACCAGAGCCAGGAAATGTTTGACACTGAAGTTCCCGAAGTCGTGAAATGTTTGACCCCAAAA  
N I K N 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

25 AACAAAGAGGCCACTAAATGCATCAATACACACATCGACAAAAATCTTGGTGAAGTTGCCAAATCGGTGCCGACATTTGGACTCCTTGTAAATC  
N K E A T K C I N T H I D K I L G E V A Q I G A D I G L L V I

TCTTCTGAAGAAGCTCTTAATCCCGTTATTAAGGAAGTTGTCGCCAAAATAGGTGAACAAGTGTGAAGGTTTTGGGTGAAGGTAGGCCCATTT  
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

ATCAACAAAATCTCAGACTGTGTTGCAAAAATGTAAGAATAAAAAGAAATAAGTNAATAAATTAATTTTAAATTTTTTTTAAATTTTTTTTTT  
I N K I S D C V A K M .

CTTTAATGCCAAACAAAAAATTAATAATTTTAAATNAATTTTAAAAATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

30 (2)SEQ ID NO:2 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 275 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链: 单链

(D)拓扑结构: 线性

5 (ii)分子类型: 蛋白质

(ix)特征:

(A)关键词

(B)位置:

(xi)序列描述: SEQ ID NO:2:

10

Met Gln Gly Leu Lys Leu Ile Phe Val Ala Phe Leu Ala Val Phe Ala Val Gly Cys Glu 20

Gly Asn Thr Leu Val Lys Ser Pro Thr Glu Leu Asp Leu Arg Leu Leu Val Glu Thr Ala 40

Arg Asp Ile Ser Val Ile Leu Phe Lys Asn Leu His Ala Gly Tyr Asn Glu Val Asn Pro 60

Lys Ile Glu Ile Leu Leu Asn Glu Leu Ala Pro Glu Ala Lys Glu Gly Leu Gln Lys Ile 80

Ile Lys Glu Ile Arg Asp Leu Val Asn Glu Glu Glu Thr Arg Ile Asn Val Ile Phe Lys 100

15

Thr Leu Ile Gly Ala Leu Asp Gln Leu Lys Pro Ile Lys Ala Pro Cys Ala Asp Pro Val 120

Ser Lys Glu Ala Lys Lys Leu Ala Asn Asp Val Glu Arg Glu Ile Val Lys Phe Ile Lys 140

Tyr Leu Glu Gln Lys Tyr Glu Lys Val Phe Thr Asn Ile Lys Asn Gly Val Thr Lys Val 160

Ile Thr Arg Ala Arg Lys Leu Phe Asp Thr Glu Val Pro Glu Val Val Lys Cys Leu Thr 180

Pro Lys Asn Lys Glu Ala Thr Lys Cys Ile Asn Thr His Ile Asp Lys Ile Leu Gly Glu 200

20

Val Ala Gln Ile Gly Ala Asp Ile Gly Leu Leu Val Ile Ser Ser Glu Glu Ala Leu Asn 220

Pro Val Ile Lys Glu Val Val Ala Lys Ile Gly Glu Gln Val Leu Lys Val Leu Gly Glu 240

Gly Arg Pro Ile Ile Asn Lys Ile Ser Asp Cys Val Ala Lys Met . 270

### 参考文献

- 5 Bany J, Pfeffer A 和 Phegan M (1995), 体外对 *B. ovis*-侵染的和没有侵染的羊羔的 *Bovicola ovis* 抗原和刀豆球蛋白 A 的淋巴细胞的局部和全身应答之比较(Comparison of local and systemic responsiveness of lymphocytes in vitro to antigen and Concanavalin A in infested and naive lambs), *International Journal for Parasitology* 25:1499-1504.
- 10 Bany J, Pfeffer A, Phegan M 和 Heath ACG (1995), *Bovicola ovis* 侵染的羊羔的淋巴细胞增殖性应答(Proliferative responses of lymphocytes in *Bovicola ovis*-infested lambs), *International Journal for Parasitology*.25:765-768.
- 15 Cleland PC, Dobson KJ 和 Meade RJ (1989), 绵羊虱子(*Damalinea ovis*)的扩散率和它们对羊毛品质的影响(Rate of spread of sheep lice (*Damalinea ovis*) and their effects on wool quality), *Australian Veterinary Journal*. 66:298-299.
- 20 Heath ACG, Cole DJW, Bishop DM, Pfeffer AT, Cooper SM, 和 Risdon P (1995), 对褶皱, 绵羊毛皮缺陷的病因学 and 处理的初步研究(Preliminary investigations into the aetiology and treatment of Cackle, a sheep pelt defect), *Veterinary Parasitology*. 56:239-254.
- 25 Heath ACG, Cooper SM, Cole DJW 和 Bishop DM (1995), 绵羊咬虱 *Bovicola ovis* 在产生褶皱, 绵羊毛皮缺陷中的作用的证据(Evidence for the role of the sheep biting-louse *Bovicola ovis* in producing cackle, a sheep pelt defect), *Veterinary Parasitology*. 59:53-58.
- 30 Johnson PW, Boray JC, Plant JW 和 Blunt SC (1993), 新南威尔士绵羊群中羊毛不整的广泛原因(Prevalence of the causes of fleece derangement among sheep flocks in New South Wales), *Australian Veterinary Journal* 70:220-224.
- Kettle PR 和 Lukies JM (1982), 绵羊虱子(*Damalinea ovis*)对羊毛颜色的

影响(Effects of sheep lice (*Damalinia ovis*) on wool colour), *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*. 10:15-17.

5 Kettle PR 和 Lukies JM (1984), 从打捆的羊毛回收绵羊虱子(*Damalinia ovis*): 世界范围监督虱子侵染羊群的技术(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.

10 Lipson M 和 Bacon-Hall RE (1976), 绵羊身上各种寄生虫群对羊毛加工性能的一些影响( Some effects of various parasite populations in sheep on the processing performance of wool), *Wool Technology and Sheep Breeding*. pp18-20.

15 McLeod RS (1995), 澳大利亚家畜业主要寄生虫带来的成本('Costs of major parasites to the Australian livestock industries'), *Proceedings of the Australian Society for Parasitology Annual Meeting, 1994*, *International Journal for Parasitology* 25:1363-1367.

20 Pfeffer AT, Bany J, Phegan MD 和 Osborn PJ (1993), 对咬虱(*Bovicola ovis*) 侵染的羊羔超敏反应皮试('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*, *New Zealand Veterinary Journal* 42:76.

25 Pfeffer A, Phegan MD 和 Bany J (1997), 应用嗜碱细胞组胺释放试验对虱子 *Bovicola ovis* 侵染的羊羔检测嗜同种细胞抗体( 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.

30 Seymour-Jones A (1913), 绵羊皮中的褶皱('Cockle" in Sheepskins'), 绵

羊和它的皮毛(In The sheep and It's Skin), Seymour Jones A. Leather Trades Review, London. Chapter VII, pp 204-221.

```

<110> 农业研究有限公司(AgResearch Limited)
      亚历山大, 普费弗(Pfeffer, Alexander)
      查尔斯, 休梅克(Shoemaker, Charles)
<120> 绵羊虱 Bovicola ovis 变应原的处理
<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> 未知碱基

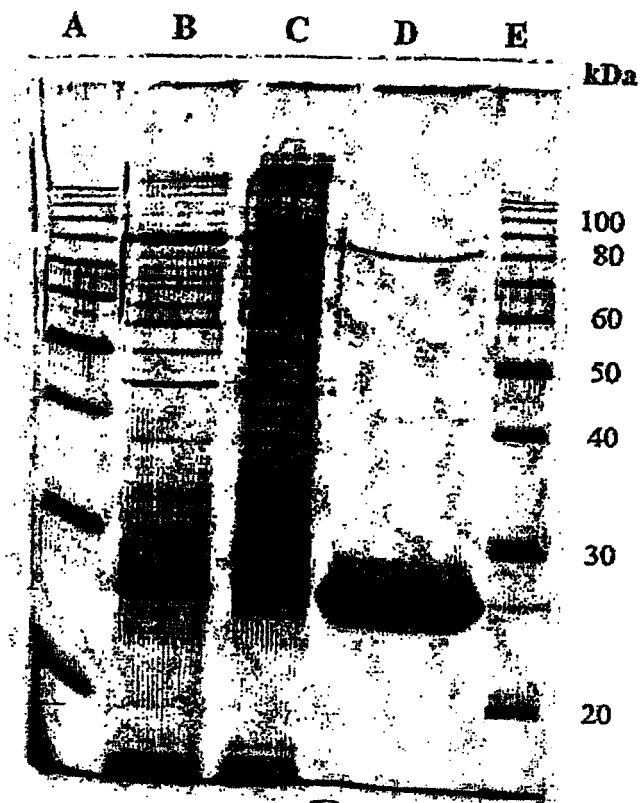
<400> 1
atcaaaacaa caatgcaagg attaaaatta attttcgctg cctttttggc agttttcgct 60
gttgggtgtg agggaaatac tttggtcaaa tccccaacag aactcgatct tcgtcttctt 120
gttgaaaccg ctcgagatat ctctgtcatc ttgtttaaaa acttacctgc tggatataat 180
gaagttaacc ccaaaatcga aatactggtg aacgaattgg cccccgaagc taaagaagga 240
ctccaaaaaa ttataaaaga aattagagat ttggtcaatg aagaagaaac cagaattaat 300
gtcatcttca aaactcttat tgggtgcttg gaccaactga aaccaattaa ggcacctgac 360
gccgaccccc tttctaaaga agctaaaaaa ttggccaacg atggtgaaag ggaaatcgtc 420
aaattcatta aatattttaga acaaaaatac gaaaaggat ttacaaacat caagaatgga 480
gttaccaaag taatcaccag agccaggaaa ttgtttgaca ctgaagttcc cgaagtcgtg 540
aaatgtttga cccccaaaaa caaagaggcc actaaatgca tcaatacaca catcgacaaa 600
attcttggtg aagttgccca aatcggtgcc gacattggac tccttgtaat ctcttctgaa 660
gaagctctta atcccgttat taaggaagtt gtcgccaaaa taggtgaaca agtggtgaag 720
gttttggtg aaggtaggcc cattatcaac aaaatctcag actgtgttgc aaaaatgtaa 780
gaaataaaaa gaaataagtn aataaattaa ttttaatttt tttttaattt ttttttctt 840
taatgccaaa caaaaaaatt aaaaattttt aatnaattt taaaaattaa aaaaaaaaaa 900
aaaaaaaaa a 911

```

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

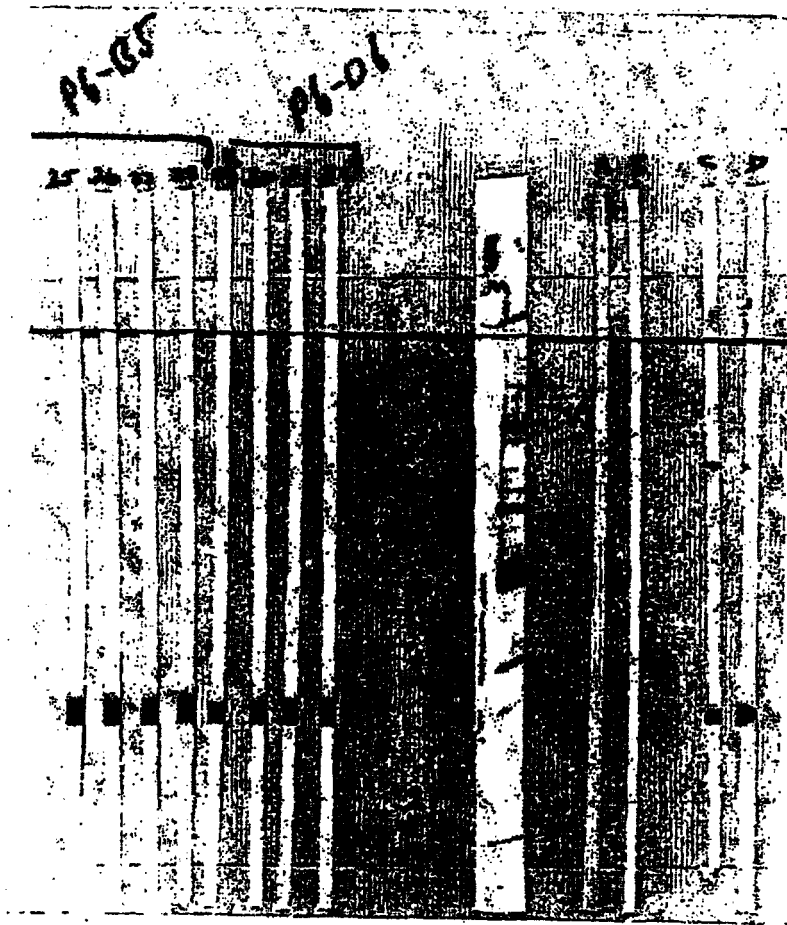
<400> 2

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



- A. 分子量标记
- B. 来自全*Bovicola ovis*的天然可溶性抗原
- C. 来自全*Bovicola ovis*通过免疫亲和层析去除Bol之后的天然可溶性抗原
- D. 通过免疫亲和层析纯化的Bol
- E. 分子量标记

图 1



与下面物质反应的可溶性Bovicola ovis抗原的蛋白质印迹:

25-28泳道: 来自原代克隆P6-B5的第二代杂交瘤

克隆的单克隆抗体

29-32泳道: 来自原代克隆P6-D6的第二代杂交瘤克隆的

单克隆抗体

分子量标记(KDa)

A泳道: 正常小鼠血清。负对照

B泳道: 杂交瘤培养基。负对照

C泳道: 来自用可溶性Bovicola ovis粪抗原免疫的  
小鼠的血清。正对照

D泳道: 已知的阳性杂交瘤培养上清液。正对照

图 2

PBAD18 载体 -----> ctttgctatgccatagcatttttatccataagattagcggatcctacctgacgc  
 阿拉伯糖起动机 Nde  
 tttttatcgcaactctctactgtttctccataaccggtttttttgggctagaataattttgtttaactttaagaaggagatatacatATGTC  
M S

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

AACCCCAAATCGAAATACTGTTGAACGAATTGGCCCCGAGCTAAAGAAGGACTCCAAAAAATTATAAAAGAAATTAGAGATTGGTCAAT  
 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

GAGAAGAAACCCAGAAATTAATGTCATCTTCAAACCTCTTATGGTGGCTTTGGACCAACTGAAACCAATTAGGCACCATGCGCCGACCCCGTT  
 E 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

TCTAAAGAAGCTAAAAAATTGGCCAACGATGTTGAAGGGAAATCGTCAAAITCATTAAATATTTAGAACAAAAATACGAAAAGGTATTACA  
 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

AACATCAAGAATGGASTTACCAAAGTAATCACCAGAGCCAGGAAATGTTTGCACACTGAAGTTCCCGAAGTCGTGAAATGTTTACCCCAAA  
 N I K N 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

AACAAGAGGCCACTAAATGCATCAATACACACATCGACAAAATTCITGGTGAAGTTGCCCAATCGGTGCCGACATTGGACTCCTTGTAAATC  
 N K E A T K C I N T H I D K I L S E V A Q I G A D I G L L V I

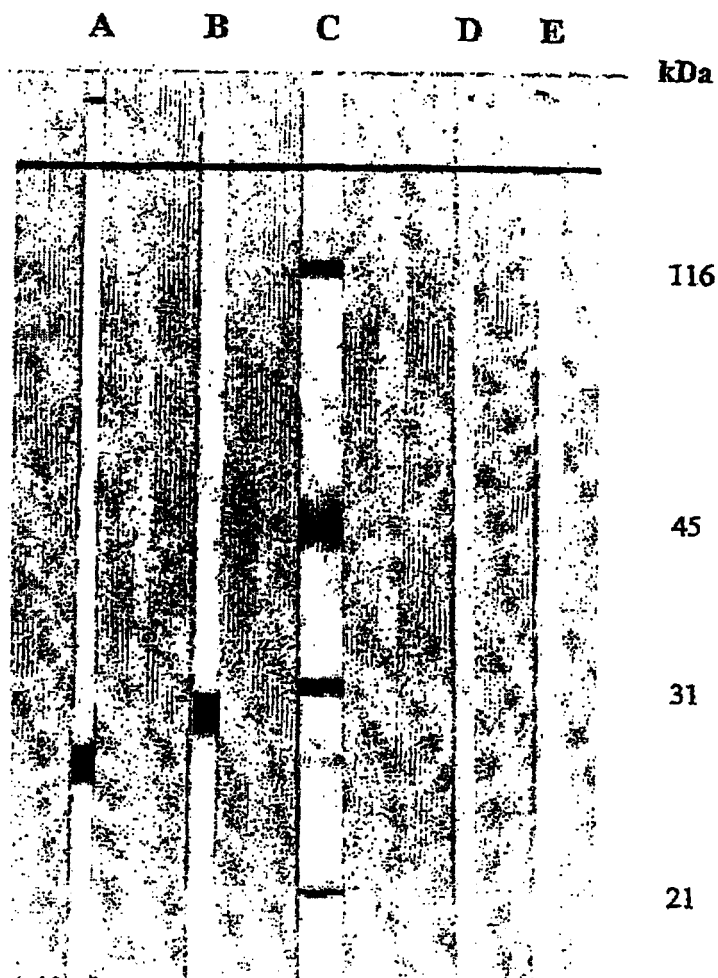
TCTTCTGAAGAAGCTCTTAATCCCGTTATTAAGGAAGTTGTGCCCCAAATAGGTGAACAAGTGTGAAGSTTTGGGTGAAGGTAGGCCCAAT  
 S S E E A L N P V I K E V V A K I G E Q V L K V L G E G R P I

Not 1 -----Etag-----

ATCAACAAAATCTCAGACTGTGTTGCAAAAATGgcggccgcaggtgcgccggtgcggtatccggatccgctggaaccgcgtgccgcccacat  
 I N K I S D C V A K H a a a g a p v p y p d p l e p r a a a h

catcatcatcatcattagaattaattcgatctcggatcccggggatcctctagagtcgacctgcagycatgcaagctt-----> pBAD18  
 h h h h h

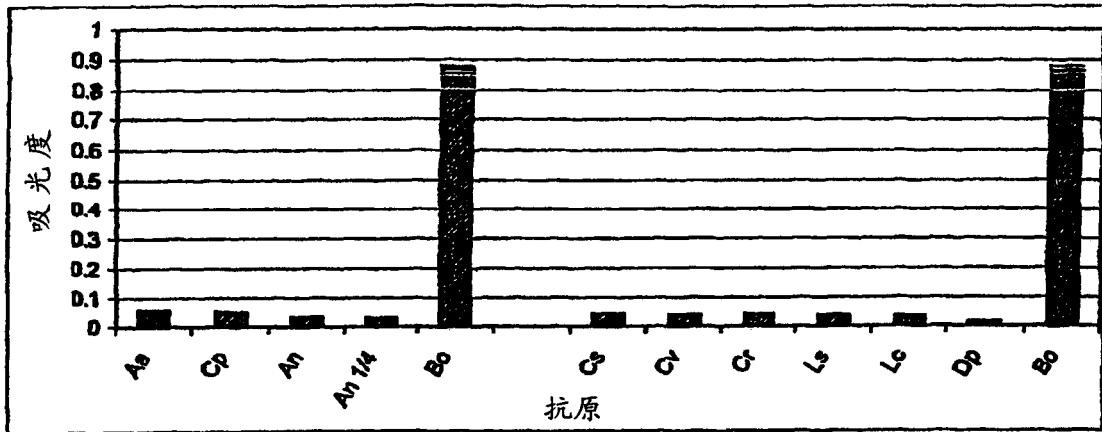
图 3



以下物质的蛋白质印迹:

- A. 与Bo1单克隆抗体反应的纯化的Bo1
- B. 与Bo1单克隆抗体反应的纯化的重组Bo1
- C. 分子量标记
- D. 与PBS反应的纯化的Bo1。负对照
- E. 与PBS反应的纯化的重组Bo1。负对照

图 4



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

图 5

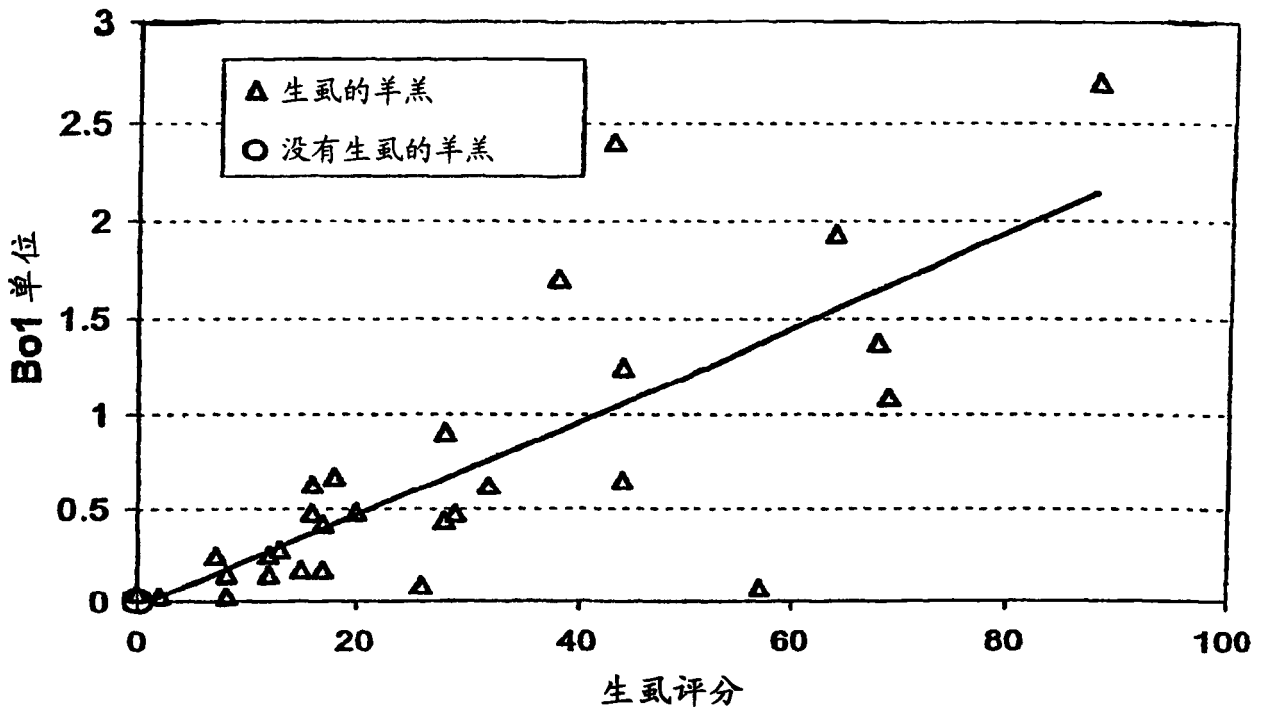


图 6

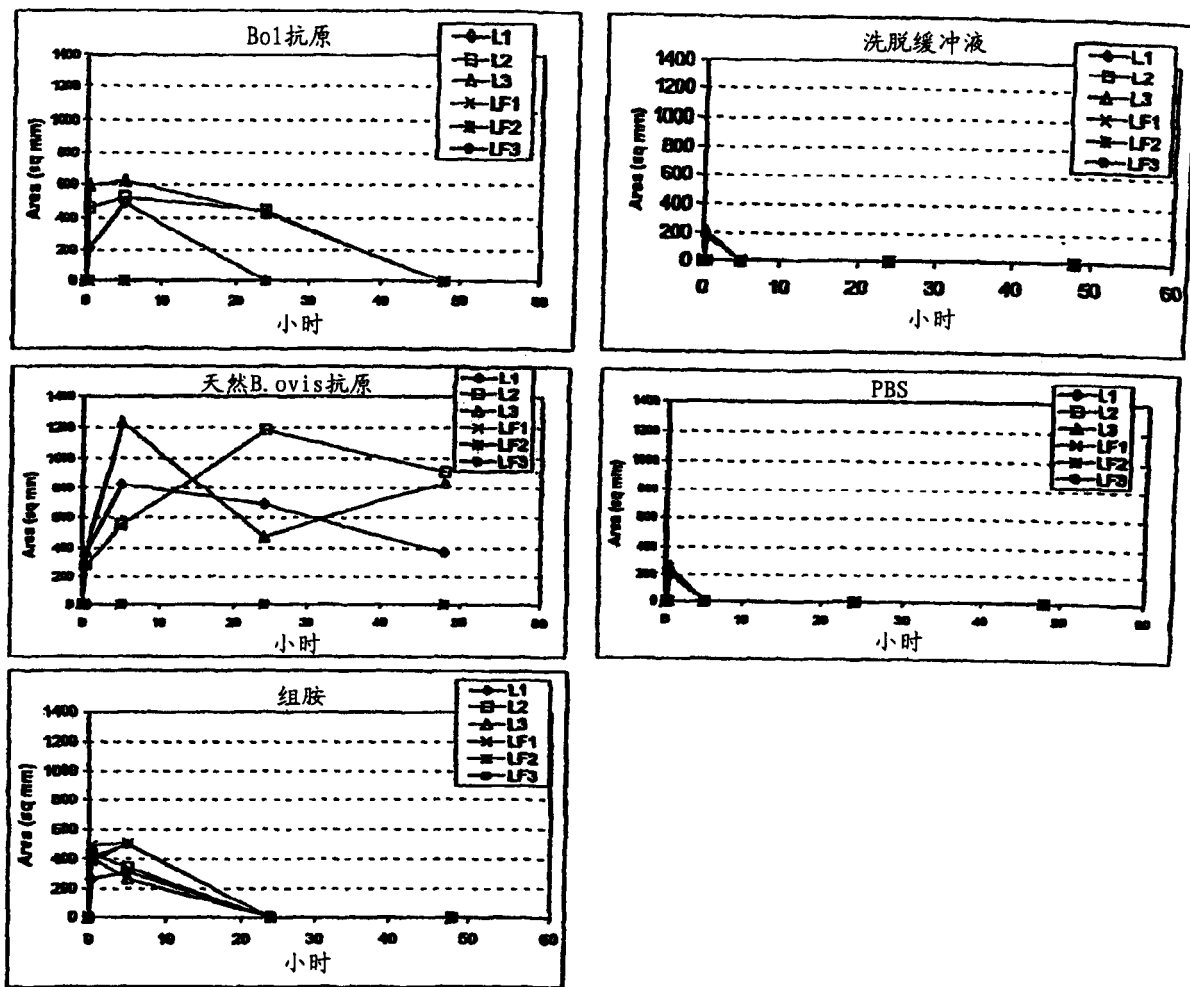
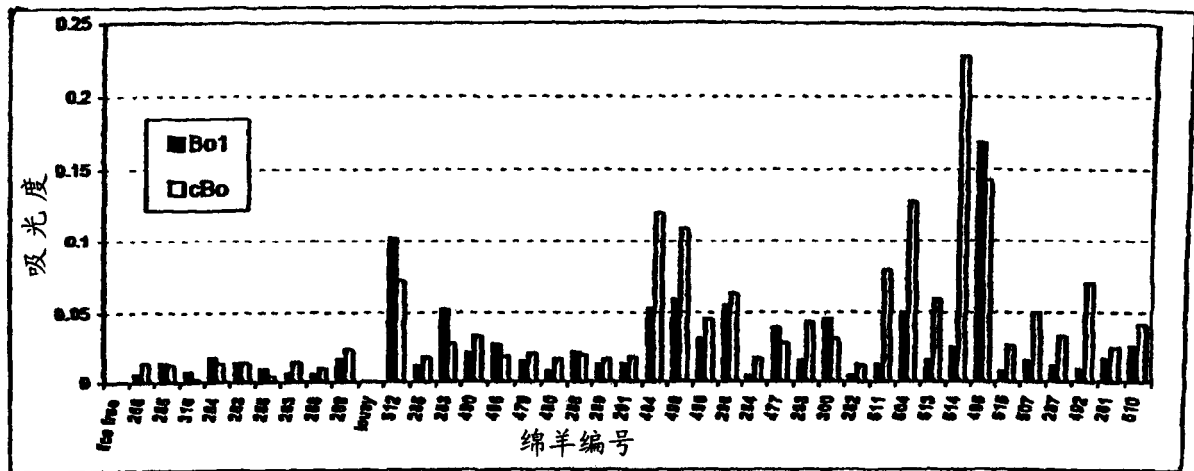


图 7



对天然B. ovis抗原和Bo1特异的羊IgE的ELISA检测

图 8

专利名称(译)	绵羊虱Bovicola ovis变应原的处理		
公开(公告)号	<a href="#">CN1430626A</a>	公开(公告)日	2003-07-16
申请号	CN01809957.2	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)	奥维塔有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	奥维塔有限公司		
[标]发明人	查尔斯 B 休梅克		
发明人	亚历山大·T·普费弗 查尔斯·B·休梅克		
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 C07H21/04 G01N33/535 A61K39/35		
CPC分类号	C07K14/43563 A61K39/00		
优先权	504096 2000-04-19 NZ		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及编码虱变应原，但并不是仅来自咀嚼虱Bovicola ovis的变应原的新的核苷酸序列，和所述核苷酸序列和蛋白质变应原在诊断、治疗和预防虱侵染和相关的变应原性疾病中的用途。

