



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95329 (13) C2

(51) МПК

C07K 14/54 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СОБАЧИЙ ТІМУСНИЙ СТРОМАЛЬНИЙ ЛІМФОПОЕТИН ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

1

2

(21) a200907400

(22) 11.12.2007

(24) 25.07.2011

(86) PCT/US2007/025318, 11.12.2007

(31) 60/875,135

(32) 14.12.2006

(33) US

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) МАТТСОН ДЖІНІН Д., US, ГОРМАН ДЕНІЕЛ М., US, ДЕ ВААЛ МАЛЕФІТ РЕНЕ, NL/US, МОРСІ МОХАМЕД А., CA/US

(73) ШЕРІНГ-ПЛАУ ЛТД., CH

(56) WO0029581 A, 25.05.2000.

DATABASE UniProt [Online] 1 December 2001 (2001-12-01), "Thymic stromal lymphopoietin precursor." XP002482348 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q969D9 Database accession no. Q969D9 -& RECHE P A ET AL: "Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, vol. 167, no. 1, 1 July 2001 (2001-07-01), pages 336-343.

LIU Y -J: "Thymic stromal lymphopoietin: Master switch for allergic inflammation" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 20060220 US, vol. 203, no. 2, 20 February 2006 (2006-02-20), pages 269-273.

QUENTMEIER H ET AL: "CLONING OF HUMAN THYMIC STROMAL LYMPHOPOIETIN (TSLP) AND SIGNALING MECHANISMS LEADING TO PROLIFERATION" LEUKEMIA, MACMILLAN PRESS LTD, US, vol. 15, no. 8, 1 August 2001 (2001-08-01), pages 1286-1292.

(57) 1. Гібридний білок, який містить тімусний стромальний лімфопоетин (TSLP) або його антигенний фрагмент, де вказаний TSLP містить амінокислотну послідовність, яка на 90 % або більше є ідентичною до амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2, за виключенням 28 амінокислотного залишку сигнальної послідовності; та де вказаний TSLP є крос-реактивним з антитілом, яке виробля-

ється проти собачого TSLP, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

2. Гібридний білок за п. 1, де TSLP зв'язує епітоп-специфічне собаче TSLP антитіло.

3. Гібридний білок за п. 1, де TSLP є собачим TSLP.

4. Гібридний білок за п. 3, у якому собачий TSLP містить амінокислотні залишки 29-155 SEQ ID NO:2.

5. Гібридний білок, який містить антигенний фрагмент собачого TSLP, який містить амінокислотні залишки 29-155 SEQ ID NO: 2, де вказаний антигенний фрагмент містить амінокислотну послідовність, яку вибирають з групи, яка складається з послідовностей SEQ ID NO: 8-101 або комбінації двох або більше таких послідовностей.

6. Гібридний білок за п. 5, де вказаний антигенний фрагмент містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яка складається з SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 64 або комбінації двох або більше таких послідовностей.

7. Гібридний білок за п. 5, де вказаний антигенний фрагмент містить амінокислотну послідовність з 5-22 суміжних амінокислот NPPDCLARIERLTLHRIRGCAS (SEQ ID NO: 118); та

де вказаний антигенний фрагмент приєднується до епітоп-специфічного собачого TSLP антитіла.

8. Вакцина, яка містить фармацевтично прийнятний ад'ювант та ефективну кількість гібридного білка за п. 1.

9. Молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує гібридний білок за п. 1.

10. Молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує гібридний білок за п. 4.

11. Молекула нуклеїнової кислоти за п. 10, яка містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1.

12. Вектор експресії, який містить молекулу нуклеїнової кислоти за п. 9, п. 10 або п. 11.

13. Вакцина, яка містить вектор експресії за п. 12.

(13) C2

(11) 95329

(19) UA

Перехресне посилення на подібні заявки

Ця заявка є безумовною заявкою, пріоритет якої заявлено за 35 U.S.C. § 119(e) попередньої заявки США № 60/875,135, поданої 14 грудня 2006 року, вміст якої включено у даний документ як посилення.

Галузь винаходу

Даний винахід стосується собачого тимусного стромального лімфопоетину (собачий "TSLP"), молекул нуклеїнової кислоти, векторів та клітин-хазяїнів, які кодує собачий TSLP, та способів одержання та застосування собачого TSLP.

Передумови винаходу

Тварини, включаючи людину, які страждають від реакцій-опосередкованих розладів, таких як atopічні хвороби, мають спадкову тенденцію до розвитку миттєвих алергічних реакцій, які викликають вироблення IgE антитіл. Багаточисельні генетичні фактори впливають на експресію фенотипу таких тварин. Миттєва гіперчутливість, яку спостерігають при atopічних захворюваннях, з'являється внаслідок впливу специфічних алергенів, таких як домашні пилові кліщі (*Dermatophagoides pteronyssinus*), пилок, цвіль та подразнення. Не дивно, що індивідууми з atopічною хворобою частіше страждають від астми, atopічного дерматиту, та інших хвороб, пов'язаних з ендегенним вивільненням IgE.

Atopічні хвороби, такі як алергічний дерматит тощо, також виникають у собак, включаючи домашніх собак. У таких собак хвороба починає проявлятися зазвичай між першим та третім роком життя. Внаслідок спадкової природи хвороби декілька порід, включаючи золотих ретриверів, більшість тер'єрів, ірландського сеттеру, Лхаса апсо, далматинців, бульдогів та старих англійських вівчарок, мають більшу тенденцію до atopії, хоча відомо, що інші породи собак, включаючи змішані породи, також страждають від цього стану. Частота зустрічальності щонайменше одного конкретного виду atopій, atopічного дерматиту, значно однаково збільшується як у людей, так і у собак.

Atopічні собаки зазвичай труться, лижуть, жують, кусають або дряпають свої ноги, морду, вуха, ділянки під мишками та біля паху, що призводить до втрати шерсті, почервоніння та потовщення шкіри. У деяких випадках одночасно наявність декількох хвороб шкіри призводить до сверблячки, у той час як наявність тільки однієї алергії не призведе до такої сверблячки. Такі проблеми виникають внаслідок повітряних алергенів (пилку тощо), алергенів у їжі та алергенів з паразитів (блох тощо). Бактеріальна або грибова інфекція також може призвести до появи сверблячки.

Одним простим засобом для полегшення подразнювальних симптомів є уникнення провокуючих алергенів. Нажаль, таке уникнення зазвичай є неможливим. Раніше, ветеринари лікували atopічний дерматит у собак шляхом орального введення антигістамінів, орального або місцевого введення кортикостероїдних протизапальвальних агентів, інших пригнічувачів імунної системи, таких як циклоспорин або такролімус, додавання жирних кислот та алерген-специфічної імунотерапії (що потребує введення ідентифікованого антигену). Однак, жодне з цих лікувань не є ефективним в

усіх випадках. Більш того, таке лікування є дорогим та/або призводить до появи побічних ефектів. Таким чином, протягом довгого часу існує потреба у безпечному, більш ефективному та більш економічному способі лікування або пригнічення симптомів atopічного дерматиту у собак.

Імунна відповідь ссавців заснована на серії складних клітинних взаємодій, які називають "імунною сіткою". Більша частина імунної відповіді складається з взаємодії лімфоцитів, макрофагів, гранулоцитів та інших клітин з розчинними білками, які називають цитокінами, які відіграють значну роль у опосередкуванні/контролі/регулюванні цих клітинних взаємодій. Таким чином, цитокіни та імунні клітини є посередниками специфічних фізіологічних механізмів або шляхів, які ведуть до різноманітних запальвальних розладів.

Імунне запалення є результатом каскаду складних імунних реакцій, які призводять до того, що Т-клітини нерегульовано продукують TH2-цитокіни, такі як IL-4, IL-5 та IL-13. Ці цитокіни, в свою чергу, провокують бронхіальну гіперактивність, вироблення IgE, еозінофілію та вироблення слизу (дивитись, наприклад, Busse and Lemanske, Jr. (2001) N. Engl. J. Med. 344:350-62; Holgate (2000) Br. Med. J. 320:231-234; and Renauld (2001) J. Clin. Pathol. 54:577-589).

Тимусний стромальний лімфопоетин (TSLP) є IL-7-цитокином, який спочатку ідентифікували у мишей як фактор, який підтримує: (i) *in vitro* розвиток поверхневих IgM⁺ В клітин, та (ii) проліферацію В та Т клітин (Friend et al., 1994 Exp Hematology 22:321-328, see also, Levin et al., 1999, J. Immunol 162: 677 - 683). Зараз відомо, що TSLP приєднується до клітинного рецептора, який містить IL-7R-альфа субодиницю, та до унікальної рецепторної субодиниці, яку називають TSLP-R. Така взаємодія ініціює сигнальну трансдукцію завдяки активації STAT або експресії тимусних активаційно-регулюючих хемокинів (TARC) у гемопоетичних клітинах, таких як стовбурна мієлоїдна клітина, така як моноцит або дендритна клітина (дивись, наприклад, співвласник патенту США № 6,890,734, який наведено у даному документі за допомогою посилань).

TSLP також може грати у мишей значну роль у патогенезі алергічних хвороб, таких як atopічний дерматит та астма. Наприклад, у трансгенних мишей, у яких спеціально викликали експресію гену TSLP на шкірі, показано наявність імунологічних та клінічних ознак atopічного дерматиту, таких як екземи, які містять запальвальні клітинні інфільтрати шкіри, суттєве збільшення Th₂ CD4⁺ Т клітин, які експресують шкіряні «хомінг»-рецептори, підвищений рівень IgE у сироватці. Більш того, на легенях мишей, які експресують легенево-специфічний трансген TSLP виявлено наявність імунологічних та клінічних ознак астми, включаючи масивну інфільтрацію лейкоцитів, гіперплазію бокаловидних клітин, субепітеліальний фіброз, збільшення цитокинів Т-хелпер типу 2 та збільшення рівня IgE.

Сімс та ін.. отримали послідовність кДНК мишиного TSLP за допомогою клонування, проте їм не вдалось клонувати людський гомолог за допо-

могою гібридизаційних зондів на основі мишиного TSLP (Sims et al. 2000, J exp Med, 192: 671 - 680). Після цього, людський гомолог визначили за допомогою ретельного аналізу EST. З'ясували, що нуклеотидна послідовність людського TSLP тільки на 43% гомологічна відповідній мишиній послідовності.

Внаслідок цього, залишається потреба у забезпеченні новим та більш практичним лікуванням atopічних розладів у собак, включаючи atopічний дерматит та пов'язані з ним клінічні прояви. Більш того, потрібно визначити фактори, включені в імунологічний каскад, який призводить до atopічних розладів у собак, що допоможе розробити таке лікування.

Цитування будь-яких посилань у даному документі слід розуміти як припущення, що такі посилання включені у попередній рівень техніки.

Резюме винаходу

Даний винахід стосується нового та більш практичного лікування atopічних розладів у собак, включаючи atopічний дерматит та пов'язані з ним клінічні прояви. Відповідно, даний винахід стосується нового ізольованого та/або рекомбінантного тимусного стромального лімфопоетину (TSLP), який входить до імунологічного каскаду, який призводить до появи atopічних розладів. Винахід також стосується антигенних фрагментів таких TSLP білків. У конкретному аспекті даного винаходу TSLP представлено собачим TSLP.

Таким чином даний винахід стосується білку TSLP, який містить амінокислотну послідовність, яка на 80% або більше є ідентичною до амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2, за виключенням 28 амінокислотного залишку сигнальної послідовності, де при введенні білку собакам у складі вакцини, у сироватці взятої з вакцинованих собак виявляють антитіла, які зв'язують TSLP собак, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2. У відповідному варіанті здійснення білок TSLP містить амінокислотну послідовність, яка на 80% або більше є ідентичною до амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2, за виключенням 28 амінокислотного залишку сигнальної послідовності; та кросс взаємодіє із антитілом, яке виробляється проти собачого TSLP, який містить амінокислоту SEQ ID NO: 2.

Даний винахід стосується білку TSLP, який містить амінокислотну послідовність, яка на 80% або більше є ідентичною до амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2 (за виключенням 28 амінокислотного залишку сигнальної послідовності), яка зв'язує епітоп-специфічне до собачого TSLP моноклональне антитіло.

У більш конкретному варіанті здійснення білок TSLP містить амінокислотну послідовність, яка на 90% або більше є ідентичною до амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2, за виключенням 28 амінокислотного залишку сигнальної послідовності. У іншому конкретному варіанті здійснення білок TSLP містить амінокислотну послідовність, яка на 95% або більше є ідентичною до амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2, за виключенням 28 амінокислотного залишку сигнальної послідовності.

У специфічному варіанті здійснення білок TSLP представлено собачим TSLP, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2. У іншому варіанті здійснення білок TSLP представлено процесованим собачим TSLP, який містить амінокислотні залишки 29-155 SEQ ID NO: 2.

Також даний винахід стосується антигенних фрагментів TSLP. Такі антигенні фрагменти включають такі, що містять один або кілька епітопів, які індивідуально відрізняються за амінокислотними послідовностями SEQ ID NOs: 8-101. У конкретному варіанті здійснення, антигенний фрагмент даного винаходу включає один або кілька епітопів, які містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 30, 31, 32 та/або 34. У іншому варіанті здійснення, антигенні фрагменти можуть включати амінокислотну послідовність, яка міститься у місці покривання амінокислотних послідовностей SEQ ID NO: 30, 31, 32 та/або 34, тобто, NPPDCLARIERLTLHRIRGCAS (SEQ ID NO: 118). У конкретному варіанті здійснення, антигенний фрагмент собачого TSLP зв'язує анти-людське TSLP моноклональне антитіло. Розмір антигенних фрагментів амінокислотної послідовності NPPDCLARIERLTLHRIRGCAS (SEQ ID NO: 118) знаходиться у діапазоні від приблизно 5 до приблизно 21 амінокислотного залишку.

Вакцини можуть включати ефективну кількість будь-якого білку TSLP даного винаходу, один або кілька їх антигенних фрагментів, або комбінації таких непроцесованих білків та один або кілька таких фрагментів. У одному варіанті здійснення білок TSLP представлено собачим білком TSLP, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2. У конкретному варіанті здійснення, вакцина включає один або кілька антигенних фрагментів собачого TSLP, який містить від 5 до 22 сусідніх амінокислотних залишків 71-92 SEQ ID NO: 2 (зазначено у даному документі як SEQ ID NO: 118). Приклади таких антигенних фрагментів включають описані у даному документі епітопи, які містять амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 або SEQ ID NO: 34. Усі вакцини даного винаходу додатково містять фармацевтично прийнятний ад'ювант.

Вакцину даного винаходу застосовують у собі викликання проти-собачих TSLP антитіл. Такий спосіб включає імунізацію ссавця ефективною кількістю вакцини. Цей спосіб необов'язково включає спосіб даун-регулювання активності TSLP у собак та/або спосіб лікування або запобігання виникнення симптомів алергії у atopічних собак, який включає імунізацію собак ефективною кількістю вакцини. Симптоми алергії включають дерматит, астму тощо.

Вакцину даного винаходу вводять наступними шляхами: внутрішньом'язово, підшкірно, внутрішньовенно, інтрадермально, орально, інтраназально, скарифікацією та комбінуванням вказаних шляхів.

Даний винахід також стосується молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує білок TSLP даного винаходу або його антигенний фрагмент. У одному варіанті здійснення, молекула нуклеїнової кислоти кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.

У конкретному варіанті такого здійснення, молекула нуклеїнової кислоти містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO: 1. Даний винахід також стосується фрагментів нуклеотидної послідовності SEQ ID NO:1, які складаються приблизно з 18 сусідніх нуклеотидів, приблизно з 24 сусідніх нуклеотидів, приблизно з 36 сусідніх нуклеотидів, приблизно з 45 сусідніх нуклеотидів, або більше. Даний винахід також стосується нуклеїнових кислот, які складаються з приблизно 18 нуклеотидів, приблизно 24 нуклеотидів, приблизно 36 нуклеотидів, приблизно 45 нуклеотидів, приблизно 66 нуклеотидів, або більше, включаючи нуклеїнові кислоти, які кодують непроцесовані TSLP білки, гібридизовані по SEQ ID NO:1 в жорстких умовах гібридизації. Усі молекули нуклеїнової кислоти даного винаходу та їх фрагменти можуть додатково включати гетерогенну нуклеотидну послідовність.

Даний винахід також стосується вектору експресії, який містить раніше вказані молекули нуклеїнової кислоти та/або її фрагменти. Окрім цього, даний винахід стосується клітин-хазяїнів, які містять вказані вектори експресії. Клітина-хазяїн представлена необов'язково прокариотичною або еукаріотичною клітиною-хазяїном. У одному варіанті здійснення, прокариотичною клітиною-хазяїном є *Escherichia coli*. У конкретному варіанті такого здійснення, клітиною-хазяїном є *E. coli* BL21(DE3)/pLysS, яка містить ген T7 РНК-полімерази, який контролюється ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозид (IPTG)-індукованим *lacUV5* промотором.

Даний винахід стосується рекомбінантних вірусних векторів та/або векторів депротейнізованої ДНК, які містять одну з вищевказаних молекул нуклеїнової кислоти, які кодують собачий TSLP, наприклад, SEQ ID NO: 1, та/або її фрагменти. Такі вектори застосовують, наприклад, у вакцинах, придатних для введення собакам, хворим на atopічний дерматит.

Даний винахід також стосується способу одержання білку TSLP даного винаходу. Такий спосіб включає культивування клітин-хазяїнів даного винаходу у придатному культуральному середовищі. Цей спосіб може додатково включати стадію ізолювання та/або очищення білку TSLP від культивованих клітин-хазяїнів або культурального середовища. Даний винахід також стосується отриманого ізолюваного та/або очищеного білку TSLP.

Даний винахід також стосується анти-TSLP антитіл, введених у гібридому за допомогою вакцини даного винаходу. У одному варіанті такого здійснення застосовують гібридому ссавців. У конкретному варіанті здійснення, ізолюють та/або очищують антитіла. Антитіла можуть бути як поліклональними, так і моноклональними. Згідно з винаходом моноклональне антитіло, вилучене з не собачих видів, може бути необов'язково сконструйоване подібно до такого у собак, для того щоб бути мінімально антигенним при введенні собаці. У бажаних варіантах здійснення, домени зв'язування будь-якого антитіла згідно з винаходом необов'язково перетворюються на фрагменти зв'язування

меншого розміру ніж справжнє антитіло, наприклад, шляхом розщеплення та/або як рекомбінантний Fv, Fab та F(ab')₂ зв'язуючий білок. Даний винахід також стосується терапевтичних білків, отримані з антитіл, з унікальною структурою та функціональними властивостями подібними до природних антитіл з важким ланцюгом (наприклад, NANOBODIES®). Окрім цього, даний винахід також стосується замінників антитіл з високою афінністю для TSLP та низькою імуногенністю (наприклад, avimer-протеїни з зв'язувальних частин рецептора TSLP). Розроблені проти-собачі TSLP антитіла/avimers можна застосовувати у способі лікування симптомів алергії у atopічних собак шляхом введення ефективної кількості вказаних проти-собачих TSLP антитіл.

Даний винахід також стосується вакцини, яка містить ефективну кількість не-TSLP імуногену у комбінації з ефективною кількістю білку TSLP даного винаходу, один або кілька його антигенних фрагментів, або комбінації непроцесованого білка та один або кілька таких фрагментів. У конкретному варіанті здійснення, білок TSLP представлено собачим TSLP. У більш конкретному варіанті здійснення, собачий TSLP містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2.

Даний винахід додатково стосується способів діагностики із застосування винайденого собачого TSLP, його фрагментів та/або антитіл викликаних собачим TSLP та їх фрагментів. У одному варіанті здійснення, даний винахід стосується способу діагностики atopічного дерматиту у собак, який включає одержання зразку шкіри собаки та визначення наявності собачого TSLP у вказаному зразку.

Зазначені та інші аспекти даного винаходу можна краще зрозуміти шляхом посилання на наступні фігури та детальний опис.

Детальний опис фігур

На Фіг. 1 показано SDS-PAGE аналіз (електролітичний одномірний електрофорез) білка еукаріотичної безклітинної білоксинтезуючої системи, яка експресує собачий TSLP. Лінія 1: стандарт білку; Лінія 2: загальний білок; Лінія 3: розчинний білок; Лінія 4: нерозчинний білок. Галузі локалізації білка TSLP позначені стрілкою.

Фіг. 2A показано аналіз білка вестерн-блоттінг з безклітинної білоксинтезуючої системи, яка експресує собачий TSLP. Білок реагував з Anti-His (C Term)/ AP Ab від Invitrogen. Лінія 1: стандарт білку; Лінія 2: загальний білок; Лінія 3: розчинний білок; Лінія 4: нерозчинний білок. Собачий TSLP визначали у загальному білку та нерозчинному білку (що позначено стрілками).

На Фіг. 2B показано аналіз білка вестерн-блоттінг з безклітинної білоксинтезуючої системи, яка експресує собачий TSLP. Білок реагував з моноклональними антитілами пацюків специфічними до людського TSLP. Лінія 1: стандарт білку; Лінія 2: загальний білок; Лінія 3: розчинний білок; Лінія 4: нерозчинний білок. Собачий TSLP визначали у загальному білку та нерозчинному білку (що позначено стрілками).

На Фіг. 3A показано експресію та очищення TSLP від клітин-хазяїнів *E. coli*, та полоса @ 61 кД наявна у розчинній фракції *E. coli*, що представляє

злиття між собачим TSLP та білком GST та мітки з 6 залишків гістидину. "M" означає стандарт білку (однаково на всіх Фіг. 3A-3D). На лінії 1 та лінії 2 представлено розчинні фракції E. coli B121(DE3)pLysS, які містять плазмиду 1265-93B без або з індукцією IPTG, відповідно. Стрілочка вказує на ділянку гібридного білку GST-TSLP-His (однаково на всіх Фіг. 3A-3D).

На Фіг. 3B показано, що мічений гібридний білок GST-TSLP-His можна очистити за допомогою смоли глутатіон-сефарози 4B. На лініях 1-3 представлено різні елюйовані фракції смоли глутатіон-сефарози 4B.

На Фіг. 3C показано, що гібридний білок лінії B можна додатково очистити за допомогою смоли Ni-NTA. На цій фігурі показано переочищення гібридного білка GST-TSLP-His на смолі Ni-NTA після очистки на смолі глутатіон-сефароза 4B. Стовбчик 1 є потоком, лінія 2 є елюювання на смолі Ni-NTA.

На Фіг. 3D показано вестерн-блоттинг гібридного білка GST-TSLP-His та підтверджено, що гібридний білок розпізнається анти-GST антитілом (GE Health Care Cat No. 27457701).

На Фіг. 4 показано забарвлення флуоресцин-зоціанатом (ФІТЦ) зрізу зануреної у парафін пошкодженої тканини шкіри, отриманої з собаки # 10197, з діагнозом atopічний дерматит. Цей зріз обробляли анти-людськими кролячими TSLP поліклональними антитілами та реакцію забарвлювали стрептавідин-ФІТЦ. Інтенсивність флуоресценції (світлі ділянки) вказує на зв'язування кролячих TSLP поліклональних антитіл з TSLP наявним у тканині.

На Фіг. 5A показано забарвлення імунопероксидазою зрізу пошкодженої тканини шкіри, зануреного у парафін, отриманого з собаки, з діагнозом atopічний дерматит. У цьому зрізі виявили розмиті забарвлення (темні ділянки) поверхневого шару зразку шкіри кролячим анти-людським TSLP моноклональним антитілом.

На Фіг. 5B показано контрольний зріз. Зріз робили з зануреної у парафін пошкодженої тканини шкіри, отриманої з собаки, з діагнозом atopічний дерматит, який вводили тільки контрольний фосфатний буфер.

На Фіг. 6 показано мапування епітопів собачого TSLP з кролячим анти-людським TSLP моноклональним антитілом. Потрібні піки з номером епітопів 22-26 (SEQ ID NOs 29-33). Епітопи 22-26 також дериватизували по N-кінцю (пік 55 та вище), для підтвердження, що зв'язаний епітоп не потребує N-термінального залишку.

На Фіг. 7 показано порівняння собачого (SEQ ID NO: 32) та людського аналогу епітопу 25 (SEQ ID NO: 3) TSLP пептидної послідовності.

На Фіг. 8A показано ДНК послідовність гену собачого TSLP (SEQ ID NO: 1).

На Фіг. 8B показано прогнозований TSLP поліпептид, експресований ДНК послідовністю, яка показана на Фіг. 8A (SEQ ID NO: 2). Зірочкою помічені N-термінальний кінець початкової сигнальної послідовності (залишки 1-28), та підкреслені залишки 71-92 (SEQ ID NO: 118) складають домен, з якого визначали епітопи 22-26, що перетинаються, вказані на Таблиці 2.

Детальний опис винаходу

Атопічний дерматит ("АД") є Th2-опосередкованим алергічним запальвальним захворюванням. Ця хвороба проявляється багаточисельними подібними клінічними проявами у людини та собак. Схоже що імунопатогенез АД у собак є подібним до АД у людей відносно клітинного типу та цитокінів ураженої шкіри.

Зв'язування TARC ліганду (CCL22) з CC хемокіновим рецептором 4 (CCR4), який селективно експресується Th2 лімфоцитами, викликає селективну міграцію цих клітин до пошкоджених алергічних ділянок. Відомо, що TARC та їх рецептор CCR4 апрегулюються в уражених ділянках шкіри собак з АД. З огляду на те, що TSLP викликає вироблення TARC у людини, припустили, що TSLP також повинні бути присутніми в уражених ділянках собак з АД. Антитіла вироблені проти людського TSLP тестували на ураженій шкірі собак з АД. Імунгістохімічний аналіз цих зразків підтвердив наявність антигену реактивного до анти-людського TSLP антитіла у уражених ділянках, як показано на Фіг. 4. Однак, дуже складно ідентифікували собачий ортолог генів, які кодують мишиний та людський TSLP, внаслідок значної дивергенції нуклеїнової кислоти та амінокислотних послідовностей TSLP у ссавців, як описано у даному документі.

Імунізація домашніх собак TSLP даного винаходу та/або його одним або кількома антигенними фрагментами, знижує ендогенну активність TSLP та тим самим, полегшує, убирає та/або запобігає одному або кільком atopічним симптомам, таким як ті, що з'являються при астмі та/або atopічному дерматиті, у вакцинованих собак. Окрім цього, собачий TSLP застосовують як імунотен для викликання анти-собачих TSLP антитіл для застосування як реагенту для досліджень та діагностики у домашніх собак або у інших видів ссавців. Як альтернатива, у певних обставинах, собачий TSLP та/або нуклеїнові кислоти, які кодують собачий TSLP, слугують для апрегулювання елементів імунної системи собак з послабленою імунною системою тобто, за допомогою активації STAT або експресії TARC, наприклад, у гематопоетичних клітинах.

Для більш чіткого розуміння даного винаходу наведені наступні визначення.

У даному описі застосовують термін™ у однині для зручності та це ніяким чином не спрямовано на обмеження. Тому, наприклад, посилення на композицію, яка містить "поліпептид" включає посилення на один або кілька таких поліпептидів. Таким чином у даному документі термін "приблизно" означає, що значення знаходиться в діапазоні 20 % від вказаного значення, наприклад, зазначення, що пептид, який містить "приблизно" 50 амінокислотних залишків, означає, що він містить від 40 до 60 амінокислотних залишків.

Термін "зв'язувальна композиція" стосується молекул, які специфічно зв'язують собачий TSLP, наприклад, у антитіло-антиген взаємодії. Специфічність може бути більш або менш ємною, наприклад, специфічною до конкретного варіанту здійснення або групи пов'язаних варіантів здійснення, наприклад, собачого TSLP та/або собачих антитіл.

Використовуваний у даному документі термін "собачий" включає всіх домашніх собак, *Sam's lupus familiaris* або *Canis familiaris*, доки не вказано протилежне.

Використовуваний у даному документі термін "поліпептид" є взаємозамінним з термінами "білок" та "пептид" та означає полімер, який містить дві або кілька амінокислот зв'язаних пептидними зв'язками. Термін "поліпептид" як зазначено у даному документі включає значний фрагмент або сегмент та містить ділянку амінокислотних залишків з щонайменше 8 амінокислот, зазвичай з щонайменше 12 амінокислот, зазвичай з щонайменше 16 амінокислот, бажано з щонайменше 20 амінокислот, та у найбільш бажаному варіанті здійснення з щонайменше 30 або більше амінокислот, наприклад, 35, 40, 45, 50 тощо. Такі фрагменти можуть містити кінці які починаються та/або закінчуються практично в усіх положеннях, наприклад, починаються з залишків 1, 2, 3, тощо, та закінчуються на, наприклад, 155, 154, 153, тощо, в усіх придатних комбінаціях.

Необов'язково поліпептид може не містити певного амінокислотного залишку, який кодується геном або мРНК. Наприклад, ген або молекула мРНК може кодувати відщеплену послідовність амінокислотних залишків на N-кінці поліпептида (наприклад, сигнальна послідовність), та тому вона може не входити у склад кінцевого білку.

Як зазначено у даному документі амінокислотна послідовність є 100% "гомологом" другої амінокислотної послідовності, якщо обидві амінокислотні послідовності є ідентичними, та/або відрізняються тільки проміжними або консервативними замісниками як зазначено нижче. Відповідно, амінокислотна послідовність є на приблизно 80% "гомологом" другої амінокислотної послідовності, якщо приблизно 80% другої амінокислотної послідовності є ідентичними, та/або відрізняються тільки проміжними або консервативними замісниками.

Функціонально еквівалентні амінокислотні залишки часто замінюють на залишки послідовності, отриманої при заміщенні консервативної амінокислотної послідовності. Такі зміни зазначають терміном "консервативне заміщення" як вказано у даному документі. Наприклад, один або кілька амінокислотних залишків всередині послідовності можуть бути заміщеними іншою амінокислотою з такою ж полярністю, яка діє як функціональний еквівалент, що призводить до мовчазної заміни. Замісники амінокислоти всередині послідовності вибирають з інших членів класу, до якого належить така амінокислота. Наприклад, неполярні (гідрофобні) амінокислоти включають аланін, лейцин, ізолейцин, валін, пролін, фенілаланін, триптофан та метіонін. Амінокислотами, які містять ароматичні кільцеві структури, є фенілаланін, триптофан та тирозин. Полярні нейтральні амінокислоти включають гліцин, серин, треонін, цистеїн, тирозин, аспарагін та глутамін. Позитивно заряджені (основні) амінокислоти включають аргінін, лізин та гістидин. Негативно заряджені (кислотні) амінокислоти включають аспарагінову кислоту та глутамінову кислоту. Такі заміни не повинні впли-

нути на наявну молекулярну масу, визначену електрофорезом у поліакриламідному гелі, або ізоелектричну точку.

Особливо бажаними консервативними замісниками є: Ліз для Арг та навпаки, таким чином зберігається позитивний заряд; Глу для Асп та навпаки, таким чином зберігається негативний заряд; Сер для Тре, таким чином зберігається вільний -ОН; та Глн для Асн, таким чином зберігається вільний NH₂. Амінокислоти також можна розділити на наступні подібні групи: (1) пролін, аланін, гліцин, серин та треонін; (2) глутамін, аспарагін, глутамінова кислота та аспарагінова кислота; (3) гістидин, лізин та аргінін; (4) цистеїн; (5) валін, лейцин, ізолейцин, метіонін; та (6) фенілаланін, тирозин та триптофан.

У відповідному варіанті здійснення дві гомологічні послідовності ДНК ідентифікують за їх власною гомологією, або гомологією амінокислот, які вони кодують. Таке порівняння послідовностей здійснюють використовуючи стандартне програмне забезпечення, наявне у базі даних послідовностей. У конкретному варіанті здійснення дві високгомологічні послідовності ДНК кодують амінокислотні послідовності на 80% ідентичні, більш бажано на 90% ідентичні та ще більш бажано приблизно на 95% ідентичні. Більш конкретно, дві високгомологічні амінокислотні послідовності є ідентичними приблизно на 80%, більш бажано приблизно на 90% та ще більш бажано приблизно на 95%.

Як зазначено у даному документі процент ідентичності білка та ДНК визначають за допомогою програмного забезпечення, такого як MacVector v9, наявного на ринку від Accelrys (Burlington, Massachusetts) та алгоритм Clustal W з вивірванням параметрів за замовченням, та параметрами за замовченням для ідентичності. Дивитись, наприклад, Thompson, et al., 1994. *Nucleic acids Res.* 22:4673-4680. Clustal W вільно завантажується для операційних систем Dos, Macintosh та Unix від, наприклад, EMBL, Європейський інститут біоінформатики. Дане посилання наявне на сайті <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. Вказані та інші доступні програми також застосовують для визначення подібності послідовностей при використанні зазначених параметрів.

"Полінуклеотид" або "молекула нуклеїнової кислоти" є молекулою, яка містить нуклеотиди, які включають проте не обмежуються РНК, кДНК, геномними ДНК та навіть штучними ДНК послідовностями. Вказані терміни також включають молекули нуклеїнової кислоти, які включають будь-які відомі у галузі аналоги ДНК та РНК.

Даний винахід стосується нуклеїнових кислот, гібридизованих у нуклеотидні послідовності, які кодують білки TSLP даного винаходу. Молекула нуклеїнової кислоти є "здатною до гібридизації" у іншу молекулу нуклеїнової кислоти, таку як кДНК, геномна ДНК або РНК, коли єдина зкручена форма молекули нуклеїнової кислоти перетворюється у іншу молекулу нуклеїнової кислоти в певних температурних умовах та при іонній силі розчину [дивитись Sambrook and Russell, *Molecular Cloning*, A

laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor L.I. (2000)].

Дуже жорсткі умови гібридизації відповідають найвищій T_m , наприклад, 50% формамід, 5X або 6XSSC. Для гібридизації потрібно, щоб дві нуклеїнові кислоти містили комплементарні послідовності, хоча в залежності від жорсткості гібридизації, можлива невідповідність між основами. Потрібна жорсткість гібридизації нуклеїнових кислот залежить від довжини нуклеїнових кислот та рівня компліментарності, змінювальності відомих у галузі. Чим більший рівень подібності або гомології між двома нуклеотидними послідовностями, тим більше значення T_m для гібридів нуклеїнових кислот, які містять ці послідовності. Відносна стабільність гібридизації (що відповідає більшому T_m) нуклеїнової кислоти зменшується у наступному порядку: РНК:РНК, ДНК:РНК, ДНК:ДНК. Для гібридів, довжина яких складає більше ніж 100 нуклеотидів, рівняння для розрахування T_m є похідною інтенсивності [дивитись Sambrook and Russell, Molecular Cloning, A laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor L.I. (2000)]. Для гібридизації більш коротких нуклеїнових кислот, наприклад, олігонуклеотидів, кількість неспівпадінь є більш вагомим, та довжина олігонуклеотиду визначає його специфічність.

Для гібридизації бажана довжина нуклеїнової кислоти становить щонайменше приблизно 12 нуклеотидів; більш бажано щонайменше приблизно 18 нуклеотидів; ще більш бажано довжина становить щонайменше приблизно 24 нуклеотиди; та самим бажаним варіантом є щонайменше приблизно 36 нуклеотидів. У певному варіанті здійснення, термін "стандартні умови гібридизації" стосується T_m яка дорівнює 55°C, та умов використання, зазначених вище. У іншому певному варіанті здійснення жорсткі умови означають що T_m дорівнює 65°C як для гібридизації, так і для умов промивання відповідно.

ДНК "кодуюча послідовність" певний білок або пептид є ДНК послідовністю, яка транскрибується або переноситься у поліпептид *in vitro* або *in vivo*, коли її обробляють відповідними регуляторними елементами.

Мікрооточення (амінокислотне) кодуючої послідовності визначають починаючи з кодону на 5'-кінці та термінатору трансляції на 3'-кінці. Кодуюча послідовність включає проте не обмежується прокаріотичними послідовностями, кДНК з еукаріотичної мРНК, геномною ДНК послідовністю з еукаріотичної (наприклад, ссавців) ДНК та навіть штучними ДНК послідовностями. Термінатор транскрипції завжди знаходиться на 3' кінці кодуючої послідовності.

Термін "дійсно зв'язані" стосується розташування елементів, де таким чином описані елементи, розташовані так, щоб виконувати свою звичайну функцію. Таким чином, контрольні елементи, дійсно зв'язані з кодуючою послідовністю, здійснюють експресію кодуючої послідовності. Потрібно щоб контрольні елементи були суміжними з кодуючою послідовністю протягом часу, коли вони спрямовують її експресію. Таким чином, наприклад, введення ще нетрансльованих транскрибованих пос-

лідовностей здійснюють між промотором та кодуючою послідовністю, та промотор все ще може бути "реально зв'язаним" з кодуючою послідовністю.

"Гетерологічна нуклеотидна послідовність" як вказано у даному документі є нуклеотидною послідовністю, яку додають до нуклеотидної послідовності даного винаходу за допомогою рекомбінації з метою утворення нуклеїнової кислоти, якої не має в природі. Такі нуклеїнові кислоти кодують гібридні (тобто химерні) білки. Таким чином гетерологічна нуклеотидна послідовність кодує пептиди та/або білки, які мають регуляторні та/або структурні властивості. У іншому варіанті здійснення гетерологічна нуклеотидна послідовність кодує білок або пептид, який функціонує як детектор білка або пептиду, який кодується нуклеотидною послідовністю даного винаходу, після експресії рекомбінантною нуклеїновою кислотою. У іншому варіанті здійснення гетерологічна нуклеотидна послідовність функціонує як детектор нуклеотидної послідовності даного винаходу. Гетерологічна нуклеотидна послідовність може містити некодуючі послідовності, включаючи сайти рестрикції, регуляторні сайти, промотори тощо.

У даному документі терміни "гібридний білок" та "гібридний пептид" є взаємозамінними та означають «химерні білки та/або химерні пептиди». Гібридний білок містить щонайменше частину собачого TSLP даного винаходу, приєднаного пептидним зв'язком до щонайменше частини іншого білку, наприклад, не собачого TSLP, та/або містить комбінацію двох або кількох несуміжних частин собачого TSLP, наприклад, епітопів, які зазвичай не знаходяться один за іншим у собачому TSLP поліпептиді (наприклад, гібридний пептид з 10 амінокислотних залишків складається з амінокислотних залишків 71-75 та 101-105 SEQ ID NO: 2, зв'язаних пептидним зв'язком). У бажаних варіантах здійснення частина собачого TSLP є функціональною, наприклад, зберігає антигенність. Гібридні білки також можуть містити маркер або білок який допомагає у ізолюванні та/або очищенні (наприклад, FLAG tag, дивитись Приклади нижче) та/або антигенності собачого TSLP даного винаходу. Несобачі TSLP послідовності можуть бути аміно- або карбокси-термінальними до собачих TSLP послідовностей.

Молекула рекомбінантною ДНК, яка кодує гібридний білок даного винаходу, наприклад, може містити послідовність, яка кодує щонайменше частину не собачого TSLP, приєднану як основу до послідовності, яка кодує собачий TSLP, та додатково кодує сайт розщеплення для спеціальної протеази, наприклад, тромбін або Фактор Ха, бажано біля або близько до місця з'єднання між послідовністю собачого TSLP та послідовністю не собачого TSLP. У певному варіанті здійснення, гібридні білки експресуються прокаріотичними клітинами. Такий гібридний білок застосовують для ізолювання собачого TSLP даного винаходу, за допомогою афінної колонки специфічної до білка та/або маркера, прищепленого до собачого TSLP (дивитись Приклади нижче). Очищений собачий TSLP, наприклад, потім очищають від гібридного

білка шляхом застосування протеолітичного ферменту та сайту розщеплення, на який посилались вище.

"Вектор" або "вектор реплікації" є репліконом, таким як плазмід, вірус або космід, до якого можна приєднати або включити інший сегмент ДНК з метою реплікації приєданого сегменту. Термін також включає реплікон, який включає потрібний введений або приєднаний сегмент ДНК.

Вектори, які використовують у даному винаході, включають мікробні плазмід, віруси, бактеріофаги, інтегруємі фрагменти ДНК та інші засоби, які допомагають інтеграції нуклеїнових кислот у геном хазяїна. Як плазмід найчастіше використовують вектор, проте інші вектори, які функціонують подібно та, які відомі у галузі, також є придатними для застосування у даному винаході, [дивитись, наприклад, Pouwels et al., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985 and Supplements, Elsevier, N.Y., and Rodriguez et al. (eds.), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, 1988, Butterworth, Boston, MA.].

Введення ДНК, яка кодує собачий TSLP винаходу, у вектор легко здійснити, коли кінці ДНК та вектору містять сайти рестрикції, що сполучаються. У разі, коли це неможливо, потрібно модифікувати кінець ДНК та/або вектору шляхом розщеплення заднього виступу одно-ланцюгової ДНК за допомогою рестрикційної ендонуклеази з метою одержання сліпих кінців, або такий самий результат можна отримати шляхом обробки одно-ланцюгового кінця відповідною ДНК-полімеразою. Навпаки, потрібні сайти можна отримати, наприклад, шляхом лігування нуклеотидної послідовності (лінкери) до кінців. Такі лінкери можуть містити специфічні олігонуклеотидні послідовності, які розпізнають потрібні сайти рестрикції. Сайти рестрикції також можна отримати шляхом застосування полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Дивитись, наприклад, Saiki et al., *Science* 239:487 (1988). Розщеплений вектор та фрагменти ДНК також можна модифікувати, у разі потреби, шляхом гомополімерного нарощування.

Рекомбінантні вектори експресії даного винаходу є звичайними самореплікуючимися ДНК або РНК, які містять нуклеїнові кислоти, які кодують собачий TSLP даного винаходу та/або його антигенний фрагмент, які зазвичай приєднані до придатних генетичних контрольних елементів, що регулюють експресію нуклеїнових кислот у сумісних клітинах-хазяїнах. Генетичні контрольні елементи включають прокаріотичну промотор систему або еукаріотичну систему контролю експресії промотору, та зазвичай включають промотор транскрипції, обов'язковий оператор для контролю за початком транскрипції, підсилювачі транскрипції для підвищення рівня експресії мРНК, послідовність, яка кодує потрібний сайт зв'язування з рибосомою та, послідовності, які зупиняють транскрипцію та трансляцію. Вектори експресії також містять ділянку реплікації, яка дозволяє реплікацію вектора незалежно від клітини-хазяїна.

Експресію нуклеїнових кислот, які кодують собачий TSLP, здійснюють традиційними способами як у прокаріотичних, так і еукаріотичних клітинах.

"Клітина-хазяїн" є клітиною, яка містить або може містити, та експресує екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти, як короткочасно, так і постійно. Клітина є «трансформованою» екзогенною ДНК, коли таку екзогенну ДНК вводять у клітинну мембрану. Екзогенна ДНК може бути включеною або може бути не включеною (ковалентно зв'язаною) у хромосому ДНК поповнюючи геном клітини. У прокаріот та грибів, наприклад, екзогенна ДНК знаходиться на епісомі, такої як плазмід. Що стосується еукаріотичних клітин, стабільно трансформованою клітиною є клітина, де екзогенна ДНК інтегрована у хромосому, успадковану дочірніми клітинами під час хромосомної реплікації. Така стабільність підтверджується можливістю еукаріотичної клітини дати початок ліній клітин або клонам, які складаються з популяції дочірніх клітин, які містять екзогенну ДНК.

Прокаріоти включають як грам-негативні, так і грам-позитивні організми, наприклад, *E. coli* та *B. subtilis*. Еукаріоти включають адаптовані клітинні лінії культури тканин тваринних, які отримують не з ссавців, наприклад, комах та птахів, та ссавців, наприклад, людини, приматів та гризунів.

Системи вектору прокаріотичного хазяїна включають велику кількість векторів різних видів. Вектори ампліфікації ДНК включають pBR322 або його багато чисельні похідні, або вектор експресії pET42b(+) (Novagen).

Контрольні прокаріотичні послідовності експресії зазвичай включають промотори, включаючи ті, що отримані з систем β-лактамаза-промотор та лактоза-промотор [Chang et al., *Nature*, 798:1056 (1977)], наприклад, pUC-серії, система триптофан (trp)- промотор [Goeddel et al., *Nucleic acids Res.* 8:4057 (1980)], наприклад, (pBR322-trp), система лямбда промотор P_L [Shimatake et al., *Nature*, 292:128 (1981)], промотори лямбда-pP або pR (pOTS), арабінозо-індуковані промотори (InVitrogen), tac промотор [De Boer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 292:128 (1983)], lpp промотор (the pIN-series); або гібридні промотори, такі як ptac (pDR540). Інші багаточисельні вектори експресії, які містять такі контрольні послідовності, також відомі у галузі та є наявними у продажу. [Дивитись також, Brosius et al., "Expression Vectors Employing Lambda-, trp-, lac-, and lpp-derived Promoters", in Rodriguez and Denhardt (eds.) *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, 1988, Butterworth, Boston, pp. 205-236.]

Вектори експресії, загалом еквівалентні до векторів, придатних для *E. coli*, які застосовують для інших прокаріот, також застосовують для експресії білків TSLP даного винаходу.

Гриби, також як і культури клітин тканин вищих еукаріот, також розглядають як хазяїни для рекомбінації собачого TSLP винаходу та/або антисобачих TSLP антитіл та/або фрагментів вказаних антитіл. Хоча можна використовувати будь-які клітинні лінії культури тканин вищих еукаріот, включаючи системи експресії бакуловірусу комах, проте бажано застосовувати клітини ссавців. Трансформація, або трансфекція, або відтворення таких клітин стало звичайною процедурою. Приклади придатних ліній клітин включають клітини

HeLa, лінії клітин яєчників китайських хом'яків (CHO), лінії клітин нирок маленьких пацюків (BRK), лінії клітин комах (наприклад, SF9), лінії клітин птахів (наприклад, DF-11), клітини нирок биків MA-Din-darby (MDBK), лінії клітин собак нирок MA-Din-Darby (MDCK), клітини Vero, лінії клітин HEK-293 та лінії клітин мавпи (COS).

Вектори експресії таких ліній клітин зазвичай включають, наприклад, сайт реплікації, промотор, сайт ініціювання трансляції, сайти сплайсингу РНК (при застосуванні геномної ДНК), сайт поліаденілування та термінатор транскрипції. Такі вектори зазвичай містять ген селекції або ампліфікації. Придатними векторами експресії є плазмиди, промотори вірусів або ретровірусів, отримані, наприклад, з аденовірусу, SV40, парвовірусу або цитомегаловірусу. Прикладами придатних векторів експресії є pCR^{3.1}, pCDNA1, pCD [Okayama et al., *Mol. Cell Biol.* 5:1136 (1985)], pMC1neo Poly-A [Thomas et al., *Cell* 51:503 (1987)], pUC19, pREP8, pSVSPORT та їх похідні, та вектори бакуловірусу, такі як pAC 373 або pAC 610.

Експресований собачий TSLP винаходу очищають за стандартними у галузі способами, включаючи осадження сульфатом амонію, афінними колонками, колоночною хроматографією тощо (дивитись, R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Для фармацевтичного застосування бажаними є по суті чисті композиції, які щонайменше приблизно на 90 - 95% гомогенні, та більш бажано на 98 - 99% гомогенні або більше. Очищення може бути частковим або гомогенним як описано. При терапевтичному застосуванні собачого TSLP, білок повинен бути по суті вільним від ендотоксину. Селективне очищення експресованого TSLP на колонці для зв'язування антитіл проти TSLP, або на колонці для зв'язування рецептора TSLP, є наявними стратегіями для отримання високоочищеного собачого TSLP.

Способи очищення є добре відомими у галузі. Наприклад, нуклеїнові кислоти очищають шляхом осадження, хроматографії, ультрацентрифугування та іншими засобами. Білки та поліпептиди, також як і пептиди, очищають багаточисельними способами, включаючи препаративний диск-гель електрофорез, ізоелектричне фокусування, HPLC, HPLC зворотної-фази, гельфільтрацію, іонообмінну та розділювальну хроматографію, екстракцію та розподілення в протитокі. Для деяких цілей бажано одержати поліпептид у рекомбінантній системі, у якій білок містить додаткову вільну послідовність, яка полегшує очищення, таку як, проте не обмежується, послідовністю полігістидину або послідовністю, яка специфічно приєднується до антитіла, такою як FLAG[®] та GST. Поліпептид очищають від неочищеного лізату клітини-хазяїну шляхом хроматографії на відповідному твердофазному матриці. Навпаки, антитіла або їх фрагменти зв'язування, одержані замість поліпептида, використовують як реактиви для очищення.

Розчинник та електrolіти складають біологічно сумісний буфер, який зберігає біологічну активність, та зазвичай є фізіологічним водним розчинником. Зазвичай розчинник має нейтральну pH, значення якої знаходиться між приблизно 5 та 10,

та бажано становить приблизно 7,5. У деяких випадках додають один або кілька детергентів, зазвичай м'який неденатуруючий детергент, наприклад, CHS (холестерин гемісукцинат) або CHAPS (3-[3 холамідопропіл]диметиламоній)-1-пропан сульфат), або детергент у достатньо низькій концентрації, щоб уникнути значного руйнування структурних та фізіологічних властивостей білка. У інших випадках для досягнення значної денатурації використовують жорсткий детергент.

Навпаки, функціонально гетерогенні білки E. coli або інших бактерій ізолюють з об'єктів для включення шляхом солюбілізації, використовуючи сильні денатуруючі агенти та наступне згортання. Відомі у галузі денатуруючі агенти включають тіоціанат калію, гуанадин HCl ("GuHCl"), йодид калію та/або йодид натрію та їх комбінації. Бажано, GuHCl застосовують як відновлювальний агент, наприклад, у концентрації від приблизно 6 до приблизно 8M в лужних умовах, pH дорівнює приблизно 8. Необов'язково застосовують інший відновлювальний агент, дитіотреїтол ("DTT"), як самостійно, так і у комбінації з GuHCl. Коли застосовують DTT, то концентрація змінюється в діапазоні від приблизно 50 mM до приблизно 0,5 mM DTT. Протягом стадії солюбілізації, яка є добре відомою у галузі, потрібна присутність відновлювального агента для розриву або денатурації дисульфідних зв'язків. Одним з таких буферів є: 0,1 M Tris pH 8,0, 6 M гуанідин, 2 mM EDTA та 0,3 M DTE (дитіоеритритол).

Ренатурація зазвичай завершується шляхом розведення (наприклад, в 100 разів) денатурованого та відновленого білка у буфері для рефолдинга, у присутності окислювача. Застосовують будь-які відомі у галузі окислювачі, які дозволяють здійснити відповідний рефолдинг з великим виходом. Наприклад, окислення та рефолдинг можна здійснити тількиними реагентами з маленькою молекулярною масою у відновленій та окисненій формах, як описано у Saxena, et al., 1970, *Biochemistry* 9: 5015-5021, яке включено у даному документі як посилання, та особливо як описано Buchner, et al., вище. Ренатурацію зазвичай завершують шляхом розведення (наприклад в 100 разів) денатурованого та відновленого білка у буфері для рефолдингу. Одним таким буфером для рефолдингу є: Tris HCl 100 mM, pH 10,0, 25 mM EDTA, NaCl 0,1 M, GSSG 551 мг/л, 0,5 M Аргінін. GSSG є окисленою формою глутатіону.

Розмір та структура поліпептида повинні загалом знаходитись у стабільному стані, та зазвичай не бути денатурованими. Поліпептид може бути зв'язаний з іншими поліпептидами у четвертинній структурі, наприклад, для забезпечення розчинності, або може бути асоційованим з ліпідами або детергентами.

Термін «по суті чистий», наприклад, у контексті білка, зазвичай означає, що білок не містить інших забруднюючих білків, нуклеїнових кислот або інших біологічних речовин з природного організму. Чистоту можна виміряти за допомогою стандартних способів, зазвичай по вазі, та чистота зазвичай дорівнює щонайменше приблизно 40%, зазвичай щонайменше приблизно 50%, часто що-

найменше приблизно 60%, типово щонайменше приблизно 80%, бажано щонайменше приблизно 90%, та найбільш бажаному варіанті здійснення становить щонайменше приблизно 95%. Зазвичай додають основи або наповнювачі. Чистоту можна виміряти за допомогою хроматографії, гель електрофорезу, імунологічного аналізу, аналізу складу, біологічного аналізу та інших способів відомих у галузі. З функціонального аспекта ізольований собачий TSLP згідно з винаходом є достатньо відділеним від інших матеріалів, включаючи попередник собачого TSLP та/або процесований собачий TSLP, що таким чином дозволяє викликати імунну відповідь, специфічну до собачого TSLP.

Розчинність поліпептида або фрагментів залежить від навколишнього середовища та поліпептида. На розчинність поліпептида впливає багато факторів, включаючи температуру, електролітичне середовище, розмір та молекулярні характеристики поліпептида, та природа розчинника. Зазвичай температура, при якій застосовують поліпептид, знаходиться в діапазоні від приблизно 4°C до приблизно 65°C. Зазвичай температура становить більше ніж приблизно 18°C. Для цілей діагностики температура зазвичай дорівнює кімнатній температурі або тепліша, проте менша ніж температура денатурації компонентів сироватки. Для терапевтичних цілей температура зазвичай дорівнює температурі тіла, зазвичай становить приблизно від 36 °C до 40°C (наприклад, приблизно 39°C для собак), хоча у певних умовах температуру можна підвищити або понизити *in situ* або *in vitro*.

Як вказано у даному документі термін «антигенний фрагмент» по відношенню до конкретного білка є антигенним фрагментом цього білка (включаючи як відсутні великі фрагменти, так і маленькі фрагменти як одна амінокислота з непроцесованого білку), наприклад, який здатний до специфічної взаємодії з молекулою імунної системи, яка розпізнає антиген, такою як імуноглобулін (антитіло) або антигенний рецептор Т-клітин. Наприклад, антигенний фрагмент собачого TSLP даного винаходу є антигенним фрагментом собачого TSLP. Такі фрагменти повинні бути самі по собі імуногенними, наприклад, здатними викликати імунну відповідь без наявності носію, протягом часу, що їх використовують для вироблення антитіл проти TSLP, після кон'югації фрагмента та молекули носія для імунізації. Бажано, однак, щоб антигенний фрагмент даного винаходу був імунодомінантним для антитіла та/або рецептора розпізнавання Т-клітини.

У конкретному варіанті здійснення антигенний фрагмент собачого TSLP містить від 5 до 150 амінокислотних залишків. У конкретному варіанті здійснення антигенний фрагмент собачого TSLP містить більше ніж 120 амінокислотних залишків. У іншому варіанті здійснення антигенний фрагмент собачого TSLP містить від 10 до 120 амінокислотних залишків. У іншому варіанті здійснення антигенний фрагмент собачого TSLP містить від 20 до 100 амінокислотних залишків. У ще одному варіанті здійснення антигенний фрагмент собачого TSLP містить від 25 до 75 амінокислотних залишків.

Антигенний фрагмент собачого TSLP отримують з рекомбінантного джерела, з білку, одержаного з природного джерела, або шляхом хімічного синтезу. Більш того, антигенний фрагмент одержують за допомогою протеолітичного розщеплення собачого TSLP, або його фрагментів, шляхом рекомбінантної експресії, або навпаки, його одержують *de novo*, наприклад, шляхом синтезу пептидів.

Вакцини

Даний винахід також стосується вакцин, які містять ефективну кількість TSLP даного винаходу, один або кілька його антигенних фрагментів, або комбінації непроцесованого білку та одного або кількох таких фрагментів. Наприклад, собачий TSLP та/або його фрагменти, такі як ті, що перелічені у таблиці 2, нижче, можуть бути включеними у будь-які білок- або пептид-сумісні композиції вакцин. Такі композиції вакцин є добре відомими у галузі та можуть необов'язково включати, наприклад, фізіологічно сумісні буфери тощо, також як і фармацевтично прийнятні ад'юванти, такі як CARBOPOL® або Emulsigen®.

Композицію вакцини можна застосовувати для викликання ендогенних анти-TSLP антитіл у собак, які цього потребують, наприклад, з метою лікування клінічних ознак хвороби або розладу, який відповідає за даун-регуляцію активності TSLP у собак. Навпаки, або у зв'язку з цим, вакцину даного винаходу також застосовують для отримання антисироватки для скринінгу та/або ідентифікування собачого TSLP, наприклад, як допоміжного агенту у тестовому наборі для ідентифікування собак, які дуже сильно експресують TSLP.

Пептиди TSLP, такі як вказані на Таблиці 2 нижче, та їх варіанти, можна застосовувати як імуногени, як по однині так і у різних комбінаціях. Такі пептиди можуть бути необов'язково зв'язаними одним з одним та/або більшими білками, відомими як носії, як за допомогою хімічних, так і рекомбінантних ДНК технологій. Носії потрібні для покращення розпізнавання пептиду тваринами-хазяїнами, як мішені імунної відповіді, та збільшення імуногенності пептидів TSLP. У галузі відомо декілька носіїв, та вони містять правцевий анатоксин або нетоксичний С фрагмент правцевого анатоксину, дифтерійний анатоксин, PhoP білок, гемоціанін лімфи слимака (KLH), бетагалактозидазу, gD білок вірусу BHV-1, G білок вірусу сказу, F білок собачого вірусу чуми та синтетичні носії, такі як ті, що отримані шляхом полімеризації відомих "загальних" епітопів Т-клітин.

Пептиди TSLP, придатні для застосування як імуногени, вибирають з пептидів, зазначених у Таблиці 2, та їх різновидів, шляхом використання відомих алгоритмів, які оцінюють такі ознаки як доступність поверхні нативного білка TSLP, гідрофільність, мобільність атомів та антигенність. Епітопи з переліку вказаних у Таблиці 2 та їх різновиди також вибирають на основі їх реактивності з поліклональними або моноклональними антитілами, які взаємодіють з нативним TSLP, та особливо з тими антитілами, які здатні нейтралізувати біоактивність TSLP. Такі антигени можуть включати синтетичні пептиди, одержані з послідовностей,

описаних у даному документі, з використанням стандартної технології синтезу пептидів та/або навпаки, можуть містити фрагменти, одержані з рекомбінантного або природнього TSLP.

Фармацевтично прийнятні ад'юванти даного винаходу одержують з багатьох джерел, включаючи природні джерела, рекомбінантні джерела та/або можуть бути хімічно синтезованими тощо. Приклади хімічних сполук, які застосовують як ад'юванти включають, проте не обмежуються наступними: сполуки алюмінію, олії, що метаболізуються та, що не метаболізуються, блок-полімери, ISCOM's (імуностимулюючі комплекси), вітаміни та мінерали (включають, проте не обмежуються наступними: вітамін Е, вітамін А, селен та вітамін В12), та Quil А (сапоніни), повний ад'ювант Френда, полімери акрилової кислоти поперечно-зв'язані з етерами поліалклену або дивінілгліколем, які продаються під торговою маркою CARBOPOL® (наприклад, CARBOPOL® 941), та рівномірно дисперговані краплі олії розміром з мікрон у водній емульсії (наприклад, продаються під торговою маркою Emulsigen®). Додаткові приклади ад'ювантів, які іноді застосовують як специфічні імуностимулятори, включають компоненти клітинної стінки бактерій та грибів (наприклад, ліпополісахариди, ліпопротеїни, глікопротеїни, мурамідпептиди, бета-1,3/1,6-глюкани), різноманітні комплекси вуглеводнів, отриманих з рослин (наприклад, глюкани, ацеманнан), різноманітні білки та пептиди, отримані з тварин (наприклад, гормони, цитокіни, фактори спів-стимуляції), та нові нуклеїнові кислоти, отримані з вірусів та інших джерел (наприклад, дволанцюгова РНК, CpG). Окрім цього, будь-яка кількість комбінацій вищенаведених сполук може забезпечити вплив ад'юванту, та таким чином, може утворювати ад'ювант даного винаходу.

Вакцини даного винаходу можна вводити будь-яким шляхом, включаючи: внутрішньомязово, підшкірно, внутрішньовенно, інтрадермально, орально, інтраназально та комбінацією вказаних шляхів.

Антитіла

Даний винахід також стосується поліклональних та моноклональних (mAb) антитіл, які специфічно зв'язують собачий TSLP винаходу. Як вказано у даному документі, термін "антитіло" стосується імуноглобуліну та/або його фрагментів. Природній імуноглобулін складається з одного або кількох поліпептидів, які загалом кодуються генами імуноглобуліну. Розпізнавальні гени імуноглобуліну включають kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon та ми гени константної ділянки, також як і незчислену кількість генів варіабельної ділянки імуноглобуліну. Антитіло або антитіла згідно з винаходом також включають фрагменти антитіла, наприклад, антиген-зв'язувальні фрагменти, наприклад, Fv, Fab та F(ab')₂, сконструйовані одностанцюгові білки зв'язування, наприклад, Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-5883 (1988) and Bird et al., Science, 242, 423-426 (1988), включені у даний документ як посилання, також як і біфункціональні гібридні антитіла (наприклад, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). Дивитись, загальним чином, Hood et al.,

Immunology, Benjamin, N.Y., 2nd ed. (1984), Harlow and Lane, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) and Hunkapiller and Hood, Nature, 323, 15-16 (1986), які всі включені у даний документ як посилання.

Сироватку, отриману з тварин, імунізованих собачим TSLP винаходу, за допомогою стандартних способів, можна застосовувати безпосередньо, або від сироватки відділяють фракцію IgG за допомогою стандартних способів, таких як плазмафоре́з або адсорбційна хроматографія з IgG-специфічними адсорбентами, таким як імобілізований Білок А або Білок G. Альтернативно, можна одержати моноклональні антитіла, та необов'язково, фрагменти зв'язування антигену або рекомбінантні білки зв'язування, отримані з таких mAbs. Такі MAb's або їх фрагменти необов'язково гуманізують, або перетворюють на собачі шляхом застосування відомих у галузі способів, або їх безпосередньою модифікацією, відповідно.

Як вказано у даному документі, "епітоп-специфічне" антитіло проти собачого TSLP є анти тілом, яке виробляється проти фрагменту собачого TSLP, який містить епітоп, що містить один або кілька з наступних п'яти амінокислотних послідовностей: SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 та SEQ ID NO: 34; та додатково зв'язує білок з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 2, та/або білок з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 2, за виключенням 28 амінокислотного залишку сигнальної послідовності. У конкретному варіанті здійснення, епітоп-специфічне антитіло проти TSLP є моноклональним антитілом.

Гібридоми, які продукують mAbs, що селективно зв'язують собачий TSLP даного винаходу, одержують за відомими способами. Зазвичай спосіб включає злиття іморталізованої лінії клітин з В-лімфоцитом, який виробляє потрібне антитіло. Альтернативно, для отримання іморталізованої лінії клітин, яка продукує антитіла, можна застосовувати способи, що не включають злиття, наприклад, трансформацію викликану вірусами [Casali et al., Science 234:476 (1986)]. Іморталізованими лініями клітин зазвичай є трансформовані клітини ссавців, зокрема клітини миші гризунів, биків та людей. Найбільш часто застосовують лінії клітин мишей та пацюків, завдяки зручності їх використання та доступності.

Способи одержання лімфоцитів, які продукують антитіла, з тварин, яким вводили антигени, є добре відомими. Зазвичай застосовують лімфоцити периферійної крові (PBLs) у разі, коли беруть клітини людини, або клітини селезінки або лімфовузлів з джерел не людського походження. Тварині хазяїну вводять дози, що повторюються, очищеного антигену (людські клітини синтезують *in vitro*), та дозволяють тварині виробити потрібні антитіла продукуючі клітини, перед тим як їх зберуть для злиття з іморталізованою лінією клітин. Технології злиття також є відомий у галузі, та загалом включають змішування клітин з фактором, який викликає злиття клітин, таким як поліетиленгліколь.

Гібридоми вибирають за стандартними способами, такими як ГАТ (гіпоксантин-аміноптерин-

тимидин) відбір. Ті гібридоми, які виробляють потрібне антитіло, відбирають за допомогою стандартного імунологічного аналізу, такого як вестерн-блоттинг, ELISA (імуносорбентний аналіз), PIA (радіоімунологічний аналіз) або подібні. Антитіла відділяють від середовища за допомогою стандартних технологій очищення білка [Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985)].

Існує багато посилань для створення керівництва щодо застосування вищенаведених технологій [Kohler et al., Hybridoma Techniques (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980); Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985); Campbell, Monoclonal Antibody Technology (Elsevier, Amsterdam, 1984); Hurrell, Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications (CRC Press, Boca Raton, FL, 1982)]. Також моноклональні антитіла можна одержати шляхом застосування добре відомих бібліотек фагів [дивитись, наприклад, Huse, et al., Science 246:1275 (1989); Ward, et al., Nature, 341:544 (1989)].

Таким чином отримані антитіла, як поліклональні, так і моноклональні, застосовують, наприклад, в імобілізованій формі, яка приєднана до твердої основи за допомогою добре відомих способів, з метою очищення собачого TSLP шляхом імуноафінної хроматографії.

Антитіла проти собачого TSLP, немічені або мічені стандартними способами, також можна застосовувати як основи для імунологічного аналізу з метою виявлення або підрахування кількості собачого TSLP. Застосування конкретної мітки залежить від виду імунологічного аналізу. Приклади застосовуваних міток включають, проте не обмежуються, радіомітками, такими як ^{32}P , ^{125}I , ^3H та ^{14}C ; флуоресцентними мітками, такими як флуоресцин та його похідні, родамін та його похідні, данзил та умбеліферон; хемілюмінесцентні агенти, такі як люциферин та 2,3-дигідрофталазиндіони; та ферменти, такі як пероксидаза хрину, лужна фосфатаза, лізоцим та глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа.

Антитіла мітять такими мітками за допомогою відомих способів. Наприклад, зв'язувальні агенти, такі як альдегіди, карбодіміди, дималеміди, імідати, сукциніміди, біс-діазотований бензидин тощо, використовують для мічення антитіл флуоресцентними, хемілюмінесцентними та ферментними мітками. Загальні способи, які застосовували, є добре відомими та описані у, наприклад, Immunoassay: A Practical Guide, 1987, Chan (Ed.), Academic Press, Inc., Orlando, FL. Такий імунологічний аналіз можна проводити, наприклад, на фракціях, отриманих протягом очищення рецепторів.

Антитіла даного винаходу також застосовують для ідентифікації певних кДНК клонів, які експресують собачий TSLP, у клонованих системах експресії. Нейтралізуючі антитіла, специфічні до сайту зв'язування ліганду рецептора, також застосовують як антагоністи (інгібітори) для блокування або даун-регулювання функції собачого TSLP. Такі нейтралізуючі антитіла легко ідентифікувати протягом звичайного дослідження.

Антагонізм активності собачого TSLP досягають використовуючи повні антитіла або добре відомі фрагменти для зв'язування антигенів, такі як Fab, Fc, F(ab)₂, та Fv фрагменти. Визначення таких фрагментів можна знайти у вищенаведених джерелах або, наприклад, у Klein, Immunology (John Wiley, New York, 1982); Parham, Chapter 14, in Weir, ed. Immunochimistry, 4th Ed. (Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 1986). Застосування та вироблення фрагментів антитіл також описано, наприклад: Fab фрагменти у [Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985)], Fv фрагменти у [Hochman et al., Biochemistry 12:1130 (1973); Sharon et al., Biochemistry 15:1591 (1976); Ehrlich et al., U.S. Patent No. 4,355,023] та неповні антитіла у [Auditor-Hargreaves, U.S. Patent No. 4,470,925]. Способи отримання рекомбінантних фрагментів Fv на основі послідовностей варіабельних ділянок важких та легких ланцюгів описані, наприклад, Муром та ін. (Патент США № 4,642,334) та Plückthun [Bio/Technology 9:545 (1991)]. Альтернативно, їх можна синтезувати хімічно стандартними способами.

Даний винахід також стосується анти-ідіотипових антитіл, як поліклональних, так і моноклональних, які отримують використовуючи вищеописані антитіла як антигени. Ці антитіла є корисними, з огляду на те, що вони імітують структуру лігандів.

Антитіла вироблені ссавцями, що не є собаками, або несобачими гібридомними системами, можуть бути необов'язково сконструйовані для того, щоб вони були загалом неантигенними при введенні собакам, наприклад, їх можна зробити собачими. Спосіб модифікації моноклонального антитіла тварини для того, щоб зробити його менш імуногенним при терапевтичному введенні людині (гуманізація), активно розглядався та описаний у кількох публікаціях [наприклад, Antibody Engineering: A practical Guide. Carl A.K. Borrebaeck ed. W.H. Freeman and Company, 1992; Reichman, L. et al., "Reshaping human antibodies for therapy", Nature 332: 323-327 (1988)]. Альтернативно, моноклональні антитіла ссавців, що не є собаками, наприклад, моноклональні антитіла мишей, гібридують з собачими антитілами або їх послідовностями з метою отримання антитіл, які розпізнаються реципієнтом-хазяїном як менш імуногенні, ніж звичайні мишинні моноклональні антитіла. Дивитись, наприклад, патент США № 5,593,861, "Собача-мишинна гетерогібридома та фрагмент гену, який кодує константну ділянку собачих імуноглобулінів", який наведено у даному документі як посилання.

Окрім цього, Вассерман та Капра [Biochem. 16: 3160 (1977)] визначили амінокислотну послідовність варіабельних регіонів важких ланцюгів як собачого IgM, так і собачого IgA. Ці винахідники також визначили амінокислотну послідовність карпа легкого ланцюгу собачого IgA [Wasserman and Capra, Immunochim. 15: 303 (1978)].

Маккамбер та Капра [Mol. Immunol. 16: 565 (1979)] описали повні амінокислотні послідовності собачого та ланцюгу. Танг та ін. [Vet. Immunology

Immunopathology 80: 259 (2001)], описали один ланцюг гамма к ДНК собачого IgG-A та чотири гамма ланцюги послідовності собачого IgG-A. Танг та ін., про яких йшла мова вище, також описали ПЛР-ампліфікацію кДНК-бібліотеки собачої селезінки з виродженням олігонуклеотидним праймером, який складається з консервативних ділянок IgG людини, мишей, свинів та биків. Більш того, Кра та ін.. [Публікація США №20040181039, опублікована 16 вересня, 2004, наведена у даному документі як посилання] детально описали спосіб перетворення не собачих антитіл на собачі.

Виділення гену собачого TSLP

А. Перші спроби

Перші спроби ідентифікувати собачий TSLP були ґрунтовані на послідовності вивірювань клонуваних кДНК послідовностей TSLP людини та мишей з кДНК послідовностями TSLP пацюків, шимпанзе та резус, які зібрали з BLAT (загальної бази даних генів Каліфорнійського Університету, СантаКруз). На рівні амінокислот TSLP шимпанзе є на 100% ідентичним до людського TSLP, у той час як резус TSLP є на понад 90% гомологічним до людського TSLP (12/151 різних залишків) на рівні процесованого білку. Однак, TSLP та кДНК послідовності людини та нелюдських приматів сильно відрізняються від послідовностей TSLP мишей. кДНК послідовності людського та мишиного TSLP співпадають лише на 43%, що робить неможливим клонування шляхом міжвидової гібридизації в умовах пониженої жорсткості між цими видами. Більш

того, послідовність TSLP пацюків відрізняється на рівні послідовності залишків амінокислот процесованого білка як 39/121 від мишиного TSLP, що вказує на те, що навіть у близькоспоріднених мишиних видів послідовності TSLP значно відрізняються.

Несподівано, як описано у даному документі, послідовність собачого TSLP відрізняється від усіх мишиних послідовностей та подібних послідовностей приматів. Таким чином, одержання собачого TSLP шляхом міжвидової гібридизації в умовах пониженої жорсткості виявилось невдалим. Насправді, праймери, розроблені для спроби клонувати ортолог собачого TSLP за допомогою ПЛР стратегій, які застосовують до людських, мишиних послідовностей, послідовностей пацюків та мавп, не змогли ідентифікувати навіть простий зв'язок який відповідає собачому TSLP.

В. Вдале виділення гену собачого TSLP

Дослідження пізніше доступної бази даних собачих генів (отриманих за допомогою секвенування методом "постріла з рушниці" (шотган); опублікованої Каліфорнійським Університетом, СантаКруз) щодо послідовності людського TSLP призвело до часткової ідентифікації екзону 1 та 4 собачого TSLP. Коротко кажучи, завдяки цьому пошуку ідентифікували декілька попадань значної послідовності гомології (дивитись "попадання" 1-6, нижче). Їх послідовності збирали та використовували як вимоги для продовження та збору часткової електронної послідовності гену собачого TSLP.

Попадання 1

Показник= 60,8 біт (146), Очікується= 1e-08

Ідентичність = 33/58 (56%), Позитивні = 39/58 (67%), гени= 1/58 (1%)

Вимога:

7 LYVLSVS-FRKIFILQLVGLVLTDFNCDFEKIKAAVLTISKDLITYMSGTKSTEF 63
L + SVS FRKIF+LQLVGLVLT+Y+F +CDFEKI+ Y I + L YM G F

Об'єкт:

26 LIICSVSVFRKIFVLQLVGLVLTYNFIDCDFEKIRWKYQEVIIYQALEKYMDGVSE*TF 199

SEQ ID NO: 102; людський TSLP

SEQ ID NO: 103; >gi|36323560|gb|AACN010632090.1| домашня собака
ctg19866851299046, довжина повної геномної шотган-послідовності = 1007

Попадання 2:

Показник= 59.7 bits (143), Очікується = 3e-08

Ідентичність = 30/42 (71%), Позитивні = 33/42 (78%)

Рамка зчитування= -1

Вимога: 117 QINATQAMKKRRKRKVTNNKCLEQVSQLQGLWRRFNRPLLKQ 158 (SEQ ID
NO: 104)

QIN TQA KKR+KR VTTNKC EQV +L GLWRRF+R KQ

Об'єкт: 588 QINNTQAKKKRKRKGVTTNNKCREQVAHLIGLWRRFSRIS*KQ 463 (SEQ ID
NO: 105)

SEQ ID NO: 104 людський TSLP

SEQ ID NO: 105 >gi | 36314527|gb|AACN010674832.1 Домашня собака
ctg19866851282529, довжина повної геномної шотган-послідовності = 963

Попадання 3

Показник= 42.0 bits (97), Очікується = 0.006

Ідентичність = 21/44 (47%), Позитивні = 27/44 (61%)
Рамка зчитування= -2

Вимога: 76 L TEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQIN 119 (SEQ ID NO: 106)

L I+ LT + GCAS A+E FA T AALA CPGY+ ++
Об'єкт: 369 LARIERLTLHRIRGCASGAREAF AEGTVAALAAECPGYAAAPVS 238 (SEQ ID NO: 107)

SEQ ID NO: 106 : людський TSLP
SEQ ID NO: 107 >gi|36442813|gb|AACN011084208.1| Домашня собака
ctg19866851499233, довжина повної геномної шотган-последовності = 370

Попадання 4

Показник= 38.9 bits (89), Очікується = 0.047
Ідентичність = 15/32 (46%), Позитивні = 22/32 (68%)
Рамка зчитування= +1

Вимога: 87 TAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQI 118 (SEQ ID NO: 108)

T GC AKE A+ AL++WCPG+++TQ+
Об'єкт: 178 TPGCGICAKEAAALGWFCALSVWCPGWAQTQV 273 (SEQ ID NO: 109)

SEQ ID NO: 108 : людський TSLP
SEQ ID NO: 109 >gi|36211043|gb|AACN010354273.1| Домашня собака
ctg19866851087147, довжина повної геномної шотган-последовності = 1369

Попадання 5

Показник= 42.0 bits (97), Очікується = 0.006
Ідентичність = 21/44 (47%), Позитивні = 27/44 (61%)
Рамка зчитування= -2

Вимога: 76 L TEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQIN 119 (SEQ ID NO: 110)

L I+ LT + GCAS A+E FA T AALA CPGY+ ++
Об'єкт: 369 LARIERLTLHRIRGCASGAREAF AEGTVAALAAECPGYAAAPVS 238 (SEQ ID NO: 111)

(SEQ ID NO: 110 : людський TSLP
SEQ ID NO: x111 >gi|36211043|gb|AACN010354273.1| Домашня собак
actg19866851087147, довжина повної геномної шотган-последовності = 1369

Попадання 6

Показник= 38.9 bits (89), Очікується = 0.047
Ідентичність = 15/32 (46%), Позитивні = 22/32 (68%)
Рамка зчитування= +1

Вимога: 87 TAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQI 118 (SEQ ID NO: 112)

T GC AKE A+ AL++WCPG+++TQ+
Об'єкт: 178 TPGCGICAKEAAALGWFCALSVWCPGWAQTQV 273 (SEQ ID NO: 113)

SEQ ID NO: 112: людський TSLP
SEQ ID NO: 113: >gi|36211043|gb|AACN010354273.1| Домашня собака
ctg19866851087147, довжина повної геномної шотган-последовності = 1369

Порівняння цих електронних последовностей людини, мавпи, пацюка та миші показало ідентичність границь нітрон/екзон та суттєвої последовності, що призвело до ідентифікації цієї последовності як частини ортологу собачого TSLP. Пізніше на основі цієї теорії розробили ПЛР праймери та використали їх для ампліфікації відсутніх сегментів гену. За допомогою "подвійної вкладеної ПЛР" з кДНК-бібліотеки активованих мононуклеарних клітин периферійної крові собак (PBMC) отримали два клони, що частково перетинаються. Додаткові спроби розкрити повну кДНК собачого TSLP шля-

хом вкладеної ПЛР, або спроби продовжити последовності у напрямку 5' або 3' кінців виявились невдалими. Однак, ітераційні цикли дослідження бази даних за допомогою подовженої інформації последовності цих клонів щодо даних повної собачої геномної шотган-последовності (наведено Каліфорнійським Університетом, СантаКруз) у комбінації з ручною зборкою неочищеної ДНК последовності з цієї бібліотеки призвело до електронної зборки кДНК непротрессованого собачого TSLP. Реальний клон цієї кДНК последовності потім синтезували використовуючи синтезатор ДНК in vitro.

Наприкінці, застосування технологій молекулярного клонування сучасного рівня техніки не дозволяє отримувати послідовність собачого TSLP безпосередньо з послідовностей людини, миші, пацюка або мавпи. Тільки модернізоване ітераційне дослідження бази даних при використанні зібраних генів TSLP людини, миші, пацюка та NHP разом із застосуванням інтрон/екзон граничного розподілення та ідентичність послідовності у бази

даних генів, у комбінації з технологіями молекулярного ПЛР клонування, призведе до ідентифікації гену, який кодує собачий TSLP.

Отриманий собачий TSLP має відмінність 58/132 у порівнянні з амінокислотною послідовністю процесованого TSLP людини (61% ідентичності) та відмінність 83/129 у порівнянні із амінокислотною послідовністю процесованого TSLP миші (33% ідентичності) (дивитись нижче).

Порівняння послідовностей процесованих TSLP домашньої собаки та людини

TSLP_CF (домашня собака) довжина 141 (1..141)
TSLP_H (людина) довжина 145 (1..145)

Показник = 167 біт (423), очікується = $1e-40$

Ідентичність = 85/139 (61%), позитивний результат = 101/139 (72%)

Вимога:1

RKIFVLQLVGLVLTYNFIDCDFEKIRWKYQEVIIYQALEKYM DGTSTEF SHPVYCANPPD 60

RKIF+LQLVGLVLT Y+F +CDFEKI+ Y I + L YM GT+STEF++ V C+N P

Об'єкт:1

RKIFILQLVGLVLT YDFTNCD FEKIKAA YLSTISKDLITYMSGTKSTEFNNTVSCSNRPH 60

Вимога:61

CLARIERLTLHRIRGCASGAREAF AEGTVAALAAEC PGYAAAPINNTQAKKKRKRGVTT 120

CL I+ LT + GCAS A+E FA T AALA CPGY+ IN TQA KKR+KR VTT

Об'єкт:61

CLTBIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKKRRKRKVT 120

Вимога: 121 NKCREQVAHLIGLWRRFSR 139 (SEQ ID NO: 114)

NKC EQV+ L GLWRRF+R

Об'єкт: 121 NKCLEQVSQLQGLWRRFNR 139 (SEQ ID NO: 115)

SEQ ID NO: 114: TSLP домашньої собаки

SEQ ID NO: 115: TSLP людини

Порівняння послідовностей процесованих TSLP домашньої собаки та миші

TSLP_CF довжина 141 (1..141)

TSLP_M довжина 136 (1..136)

Показник= 72.0 біт (175), Очікується = $7e-12$

Ідентичність = 46/138 (33%), Позитивні результати = 67/138 (48%), Гепи = 8/138 (5%)

Вимога:1

RKIFVLQ-LVGLVLTYNFIDCDFEKIRWKYQEVIIYQALEKYM DGTSTEF SHPVYCANPP 59

R +F+LQ LV + LTYNF +C+F I Y +I+ L + G + + C + P

Об'єкт: 1

RSLFILQVLVRMGLTYNFSNCNFTSITKIYCNIIFHDLTGDLKGAKFEQIED---
CESKP 57

Вимота: 60

DCLARIERLTLHRIRGCASGAREAFAGTVAALAAECPGYAAAPINNTQAKKKRKRKRGVT 119
CL +IE TL+ I GC S + FA T AL CPGY N+ + ++

Об'єкт: 58

ACLLKIEYYTLNPIPGCPSLPDKTFARRTREALNDHCPGYPETERNDGTQEMAQE---V 113

Вимота: 120 TNKCREQVAHLIGLWRRF 137

(SEQ ID NO: 116)

N C Q + ++ LW F

Об'єкт: 114 QNICLNQTSQILRLWYSF 131

(SEQ ID NO: 117)

SEQ ID NO: 116: TSLP домашньої собаки

SEQ ID NO: 117: TSLP миші

Таким чином, шляхом подолання раніше значених труднощів даний винахід забезпечує отримання ДНК послідовностей, які кодують собачий TSLP, та собачого TSLP. Сбочий TSLP та його певні послідовності є придатними антигенами, наприклад, імуногенами, для викликання антитіл проти різноманітних епітопів білку, як проти лінійних, так і проти конформаційних епітопів. ДНК, яка кодує собачий TSLP, є придатною для отримання векторів та клітин-хазяїнів для виготовлення TSLP для імунізації та/або як реагент для дослідження, також і для одержання вакцини на основі ДНК, для викликання антитіл проти TSLP, або для застосування у формі "голої" ДНК або плазмиди або вектору тваринного вірусу, придатної для експресії TSLP у клітинах вакцинованої тварини.

Таким чином отримана послідовність гену собачого TSLP показана на Фіг. 8A (SEQ ID NO: 1), та прогнозована експресія TSLP показана на Фіг. 8B (SEQ ID NO: 2). Залишки 1-28 означають сигнальну послідовність, та залишки 29 - 155 означають процесований білок.

Ідентифікація гомологічних білків TSLP

Даний винахід також стосується білків TSLP, які містять амінокислотну послідовність, яка на 80% або більше є ідентичною до амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 2, за виключенням 28 амінокислотного залишку сигнальної послідовності, які при введенні собаці у складі вакцини викликають вироблення антитіл, які зв'язують собачий TSLP, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2. Також винахід стосується антигенних фрагментів таких TSLP.

Насправді, одним з способів показати, що запропонований TSLP є білком TSLP даного винаходу, є проаналізувати чи такий білок викликає вироблення антитіл, які зв'язують собачий TSLP, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2. Одним з таких способів є вакцинування (наприклад, ін'єкція) собак різними дозами в діапазоні від 5 до 500 мкг запропонованого антигену TSLP-GST. Такі антигени можна застосовувати у формі ад'юванту на основі гідроксиду алюмінію, такого як Rehydrogel. Собак вакцинують внутрішньом'язово тричі: на 0, 21 та 42 дні. Зразки сироватки відби-

рають у вакцинованих та контрольних (не імунізованих) собак на 0, 21, 42 та 63 дні.

Вироблення антитіл у собак, вакцинованих антигенами, вимірюють за допомогою аналізу ELISA наступним чином: собачий TSLP, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, розводять до 5 мкг/мл у буфері для нанесення (Бікарбонат натрію pH 9,0) та розподіляють по 100 мкл/лунку 96 лункового планшету (Pierce). Планшети інкубують при 4°C протягом ночі. Надалі планшети тричі промивають фосфатним сольовим буфером, який містить 0,05% Tween-20 (PBST). Після цього, 200 мкл блокуючого буферу (2% знежирене молоко у PBST) додають у кожну лунку та планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 60 хвилин. Після цього планшети тричі промивають PBST. Наступним кроком, антисироватку тестованих собак, розведену 1:100, додають по 100 мкл/лунку у відповідні лунки. Після цього зразки сироватки розводять в 10 разів до відповідного місця у планшеті. Після інкубації планшет при кімнатній температурі протягом 60 хвилин, планшети тричі промивали PBST.

Наступним кроком, 100 мкл/лунку розведеного 1:20,000 козячого проти-собачого IgG (Bethyl Laboratories), кон'югованого пероксидазою хріна, додають до кожної лунки. Після цього планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 60 хвилин. Наступним кроком планшети тричі промивають PBST, та після цього у всі лунки додають субстрат TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) у кількості 100 мкл/лунку. Забарвлення утворюється протягом 10-20 хвилин при кімнатній температурі, та реакцію зупиняють шляхом додавання 0,18 М сірчаної кислоти у кількості 50 мкл/лунку.

Оптичну густину (О.Г.) всіх лунок вимірювали при довжині волни 450 нм використовуючи ELISA планшет-рідер (Thermo Max; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Зразки сироватки, взяті з собак, вакцинованих запропонованими антигенами TSLP, розглядали як з виявленим забарвленням, та таким чином, антигени ідентифікували як білки TSLP даного винаходу, коли оптична густина зразків дорівнювала або була в тричі більшою, ніж почат-

кова, виявлена у зразках, взятих з собак до імунізації. Подібно, відносні титри антитіл для антигенів TSLP визначали на основі найбільшого розведення сироватки, значення О.Г. якої дорівнює або у тричі більше ніж початкове, виявлене у зразках, взятих з собак до імунізації.

Антитіла специфічні до антигенів TSLP

Антитіла виробляються у відповідь на різні епітопи собак TSLP, включаючи видові, поліморфні та алельні варіанти, та їх фрагменти, як у їх природній формі, так і у рекомбінантній формі. Антитіла виробляються проти собачого TSLP, як у його активній, так і у неактивній формі, включаючи нативну та денатуровану версії. Вважають, що також виробляються антиідіотипові антитіла.

Антитіла, включаючи фрагменти зв'язування та одноланцюгові версії, проти попередньо визначених фрагментів антигенів викликають шляхом імунізації тварин собачим TSLP та/або його фрагментами, разом із прийнятими у галузі ад'ювантами та/або кон'югованими імуногенними білками. Таким чином імунізовані тварини є собаками, яких імунізували з метою даун-регуляції активності собачого TSLP.

Прийнятним хазяїном є, наприклад, інбредний штам мишей, таких як Balb/c, імунізований вибраним білком, з використанням стандартного ад'юванту, та за стандартною методикою імунізації мишей (дивитись Harlow and Lane, Id вище). Ад'ювант вводять тварині до, у комбінації із або після введення вакцини.

Альтернативно, синтетичний пептид, отриманий з послідовностей, описаних у даному документі та кон'югований з білковою основою, застосовують як імуноген. Поліклональну сироватку збирали та титрували проти імуногенного білку протягом імунологічного аналізу, наприклад, твердо фазний імунологічний аналіз, імобілізований на твердій підложці. Вибирали поліклональну антисироватку з титром 1×10^4 або більше, та досліджували на крос-реактивність проти інших членів родини IL-7, наприклад, IL-7 гризунів, використовуючи конкурентно-зв'язуючий імунологічний аналіз, такий як описаний у Harlow and Lane, Id вище, на сторінках 570-573. Бажано, коли у цьому вимірюванні використовують IL-7 щонайменше одного іншого члену родини, наприклад, IL-7 приматів. Члени родини IL-7 отримують як рекомбінантні білки та ізолюють, використовуючи стандартні технології молекулярної біології та білкової хімії, як описано у даному документі.

Імунологічні аналізи у форматі конкурентного зв'язування використовують для визначення крос-реактивності. Наприклад, білок SEQ ID NO: 2 можна імобілізувати на тверду підложку. Білки додані до проби звершують зв'язування антисироватки з імобілізованим антигеном. Здатність вищенаведених білків завершити зв'язування антисироватки з імобілізованим білком порівнюють із білком, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2. Кросреактивність вищенаведених білків розраховують за допомогою стандартних способів. Ті проби сироватки, кросреактивність яких становила менше 10% з кожним з вищеперелічених білків, збирали та об'єднували. Після цього з об'єднаної

антисироватки виділяли кросреактивні антитіла шляхом імунологічної абсорбції вищенаведеними білками.

Імунологічно абсорбовану та об'єднану антисироватку після цього використовували у імунологічному аналізі конкурентного зв'язування, як описано вище, для порівняння другого білку з імунологічним білком (наприклад, 1L-7 подібний білок SEQ ID NO: 2). З метою здійснення такого порівняння кожен з двох білків досліджували у великому діапазоні концентрацій та визначали кількість кожного білка, потрібну для інгібування зв'язування антисироватки з імобілізованим білком на 50%. У випадку, коли потрібна кількість другого білку становить менше ніж дві кількості вибраного білку або потрібного білку, тоді вважали, що другий білок специфічно зв'язує антитіло, викликане у відповідь на імуноген.

Антитіла даного винаходу є придатними для діагностики. Як антитіла, що захоплюють або не нейтралізують, їх можна сортувати на здатність зв'язувати антигени, при цьому вони не інгібують зв'язування з рецептором. Як нейтралізуючі антитіла, вони є придатними для використання у аналізі конкурентного зв'язування. Вони також є придатними для визначення або підрахування кількості собачого TSLP або його рецепторів, [дивитись, наприклад, Chan (ed. 1987) Immunology: A Practical Guide, Academic Press, Orlando, Fla.; Price and Newman (eds. 1991) Principles and Practice of Immunoassay, Stockton Press, N.Y.; and Ngo (ed. 1988) Nonisotopic Immunoassay, Plenum Press, N.Y.] Крос-абсорбція, інактивація комплементу або інші засоби забезпечують одержання визначеної селективності, наприклад, унікальна або загально-видова специфічність. Вказані способи є основою для ідентифікації різних груп антигенів.

Окрім цього, антитіла, включаючи фрагменти зв'язування антигену, даного винаходу можуть бути потенційними антагоністами, які зв'язують антиген та інгібують функціональне зв'язування, наприклад, з рецептором, що викликає біологічну відповідь. Додатково ці антитіла можна поєднати з лікарськими засобами або іншими терапевтичними агентами, як безпосередньо, так і опосередковано за допомогою лінкеру, що приведе до ефекту "терапевії мішеней".

Синтетичний пептид, який складається з послідовностей, описаних у даному документі, та приєднаний до білкового носію, використовують як імуноген. У будь-якому випадку фрагменти антигену можуть бути приєднаними до інших матеріалів, зокрема поліпептидів, з огляду на те, що злиті або ковалентнопоєднані поліпептиди використовують як імуногени. Антиген або його фрагменти можуть бути злитими або ковалентно зв'язаними з різними імуногенами, такими як гемоціанін лімфи слимака, альбумін бичачої сироватки, правцевий токсин тощо. Дивитись Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1969; Landsteiner (1962) Specificity of Serological Reactions, Dover Publications, New York; Williams, et al. (1967) Methods in Immunology and Immunochemistry, vol. 1, Academic Press, New York; та Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press,

NY, описання способів одержання поліклональної антисироватки.

У деяких випадках, бажано одержувати моноклональні антитіла з різних видів ссавців хазяїнів, таких як миші, гризуни, примати тощо. Описання технологій одержання таких моноклональних антитіл наведено, наприклад, Stites, et al. (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4th ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, Calif., та посилання вказані у тому документі; Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed.), Academic Press, New York; та зокрема у Kohler and Milstein (1975) in *Nature* 256:495-497, де досліджують спосіб вироблення моноклональних антитіл.

Інші придатні технології включають *in vitro* вплив лімфоцитів на антигенні поліпептиди, або, альтернативно, вибір фага або подібних векторів для утворення бібліотек антитіл. [Дивитись, Huse, et al. (1989) "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda," *Science* 246:1275-1281; та Ward, et al. (1989) *Nature* 341:544-546.] Поліпептиди та антитіла даного винаходу використовують як у немодифікованій формі, так і у модифікованій, включаючи гібридні, подібні до собачих та/або гуманізованих антитіл.

Часто, поліпептиди та антитіла даного винаходу мітять шляхом приєднання субстрату, який забезпечує отримання сигналу. Таке приєднання може бути як ковалентним, так і не ковалентним. Існує велика кількість міток та технологій приєднання, вони описані у науковій та патентній літературі. Придатні мітки включають радіонуклеїди, ферменти, субстрати, кофактори, інгібітори, флуоресцентні залишки, гемілюмінесцентні залишки, магнітні частинки тощо. Патенти, в яких описано застосування таких міток, включають патенти США № 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 та 4,366,241. Також, отримують рекомбінантні або гібридні імуноглобуліни, дивитись Cabilly, патент США № 4,816,567; Moore, et al., U.S. Pat. No. 4,642,334; and Queen, et al. (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033; або трансгенних мишей, дивитись Mendez, et al. (1997) *Nature Genetics* 15:146-156. Ці документи включені у даний опис як посилання.

Антитіла даного винаходу також застосовують для афінної хроматографії для виділення білка. Готують колонки, де білок приєднаний до твердої основи (дивитись, наприклад, Wilchek et al. (1984) *Meth. Enzymol.* 104:3-55). Альтернативно, антигени, приєднані до твердої основи, використовують для очищення відповідних антитіл.

Антитіла, вироблені проти кожного собачого TSLP, також застосовують для викликання антиідіотипічних антитіл. Це є зручним для виявлення або діагностики різних імунологічних станів, пов'язаних з експресією відповідних антигенів.

Інгібування РНК

Інтерференція РНК, яка кодує собачий TSLP, у клітинах, які експресують собачий TSLP, є додатковим засобом інгібування біологічної активності TSLP та, в результаті, лікування TSLP-

асоційованих розладів, таких як atopічний дерматит. Для цієї мети молекули дволанцюгової РНК, як хімічно синтезовані, так і клоновані всередині відповідних векторів доставки, таких як плазмідні або вірусні вектори, включають у клітини, які активно продукують мРНК TSLP, з метою зменшення ендогенного рівня мРНК, яка кодує TSLP. Після введення цих молекул РНК (у випадку екзогенної доставки молекул або транскрипції РНК, після введення плазмідні або вірусних векторів у потрібні клітини) їх розщеплюють за допомогою рибонуклеази III на короткі нуклеотидні фрагменти, які називають siРНК (коротка інтерферуюча РНК). Після цього ці siРНК фрагменти включають у мультібілковий комплекс, який містить нуклеазу, який називається RISC (РНК-залежний комплекс репресії), який активується в результаті розгортання дволанцюгових фрагментів siРНК, внаслідок впливу РНК хелікази. Таким чином отримані одноланцюгові siРНК спрямовують комплекс RISC до його мішені мРНК, яка після цього розщеплюється та деградує внаслідок ендонуклеарної активності RISC.

Зокрема, плазмідні, які містять ген TSLP або його фрагмент, клонують у будь-якій з наявних у продажу еукаріотичних плазмід, де транскрипція гену TSLP або його фрагменту здійснюється відповідним промотором, наприклад, промотором CMV або SV40. Очищену плазмідну ДНК (1-100 мкг) після цього вводять у пошкоджені ділянки шкіри або у ділянки навколо пошкоджень, якими характеризується atopічний дерматит. Введення плазмідної ДНК після цього повторюють з частотою, потрібною для викликання відповідного зменшення мРНК TSLP. Таке зменшення визначають шляхом біопсій шкіри з уражених ділянок та визначають рівень мРНК за допомогою методів, таких як кількісна ПЛР.

Наступні приклади здійснення даного винаходу спрямовані на оцінку винаходу, проте ніяким чином не обмежують обсяг прав винаходу.

Приклади

Приклад 1

ДНК та білкові послідовності собачого TSLP

Ген собаки, який експресує собачий TSLP ідентифікували ітераційним шляхом, використовуючи дані, взяті з електронної бази даних та за допомогою методів молекулярної біології, як детально описано вище.

Результати

Послідовність гену собачого TSLP показана на Фіг. 8A (SEQ ID NO: 1), та прогнозований білок, який експресує TSLP, показано на Фіг. 8B (SEQ ID NO: 2). Залишки 1-28 на Фіг. 8B (SEQ ID NO: 2), позначені зірочкою, означають сигнальну послідовність, та залишки 29-155 означають процесований білок.

Приклад 2

Клонування та експресія собачого TSLP

ДНК, яка кодує собачий TSLP, ідентифікували як описано у даному документі, та клонували в векторі pDONR221 (Invitrogen Gateway System) за стандартними способами. Дослідження генів та клонування в вектор здійснювали у програмі досліджень ДНК 2.0., та це призвело до конструюван-

ня плазмиди, яку називають pDONR221.G03276, яка містить ідентифікований ген собачого TSLP. ДНК, яка кодує процесований (тобто без сигнальної послідовності) собачий TSLP, ПЛР-ампліфікували з pDONR221.G03276, за допомогою двох праймерів, які містять сайти Nco I та EcoR V, відповідно:

Праймери

#1: 5'
AATAATCCATGGCATACAATTTTCATTGAC-
GTGAC-3' (SEQ ID NO: 4); та

#2: 5'-
AAAATAGATATCTGAAATGCGACTGAAACGACG-3'
(SEQ ID NO: 5).

Після розщеплення Nco I та EcoR V, ПЛР продукти вводили у сайти Nco I та Sma I вектору pIVEX 1.3 WG (Roche Applied Sciences, Cat# 3728803). В результаті отримали плазмиду, яка містить ген, який кодує процесований собачий TSLP, зв'язаний з шістьма залишками гістидину на С-термінальному кінці ("His6-кінець"). Плазмиду, яка містить правильні послідовності з вставок, називали плазмиди 1265-93.D. Плазмиду 1265-93.D застосовували для експресії TSLP у RTS Proteomaster Instrument відповідно до методики одержання (Roche Applied Sciences, Cat# 3064859). Як показано на Фіг. 1, ділянку @16 кДа спостерігали на лініях 2 та 4 (стрілки). Дослідження вестерн-блотінг (Фіг. 2A та 2B) показали, що ця ділянка специфічно взаємодіє із анти-His кінцем антитіла (Фіг. 2A), та моноклональне антитіло пацюка є специфічним до людського TSLP (Фіг. 2B).

Приклад 3

Одержання собачого TSLP з клітин-хазяїн і в 3 метою експресії рекомбінантного TSLP у *E. coli*, нуклеотидну послідовність, яка кодує cTSLP (тобто, TSLP, який не містить нуклеотиди, які кодують сигнальну послідовність) ампліфікували шляхом ПЛР, використовуючи плазмиду 1265-66C як матрицю, разом із прямим праймером та зворотнім праймером, які містять сайти NcoI та Hind III, відповідно:

Прямий праймер

5'-
AATAATCCATGGCATACAATTTTCATTGAC-
GTGAC-3' (SEQ ID NO: 6)

Зворотній праймер

5'-
ACATAAAAGCTTTGAAATGCGACTGAAACGACG-3'
(SEQ ID NO: 7)

Після розщеплення Nco I та Hind III, продукти ПЛР вводили у сайти NcoI/HindIII вектору експресії pET42b(+) (Novagen). В результаті отримали плазмиду, яка кодує процесований cTSLP, зв'язаний з GST-лігандом на N-кінці та 6xHis лігандом на С-кінці. Плазмиду, яка містила правильні послідовності з введених назвали 1265-93B. Експресію гібридного білку GST-TSLP-His здійснювали у *E. coli* BL21(DE3)/pLysS, яка містила ген РНК-полімерази T7 під контролем ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозид (IPTG)-індуцибельного lacUV5 промотера. Клітини *E. coli*, які містили плазмиду 1265-93B, вирощували при 30° С до оптичної густини 600 0,6 та після цього викликали експресію білка шляхом додавання 0,5 мМ IPTG та подаль-

шою інкубацією при 30°С протягом 2 годин. SDS-PAGE описує галузь локалізації білка (стрілочка) правильного розміру (~ 61 кДа), наявного у розчинній фракції *E. coli* (Фіг. 3A). Вестерн-блотінг показує, що експресований білок взаємодіє із анти-GST антитілом (Фіг. 3D). Білок GST-TSLP-His очищають за допомогою смоли глутатіон-сефароза 4B (Фіг. 3B). Після додаткової очистки смолою Ni-NTA, переважна частина білка GST-TSLP містилась у проточній колонці (Фіг. 3C).

Приклад 4

Виявлення собачого TSLP за допомогою імунофлуоресценції

Експресію собачого TSLP у шкірі собаки та тканині мигдалин вимірювали за допомогою імуногістохімії ("ІГХ"), використовуючи поліклональні антитіла кроля проти людського TSLP. Імуногістохімію здійснювали на частинах тканини, оброблених парафіном, взятих як зі шкіри нормальних собак, яким вводили сольовий розчин, так і зі шкіри собак, хворих різними хворобами, включаючи атопічний дерматит, шкіряну червону вовчанку, ексудативну багатоформну ерітему та вроджений бульозний епідермоз. Окрім цього, експресію TSLP вимірювали у замороженій тканині мигдалин, взятої з двох собак. Методика вимірювання експресії TSLP за допомогою ІГХ є наступною:

I. Підготовка ділянок:

1. Зразки шкіри залиті воском, порізали на зрізи товщиною 5-7 мікрон та помістили на слайди, оброблені полі-L-Лизином, з метою стимулювання адгезії.

2. Зрізи тканин відділяли від парафіну ксиленом та переідратовували рядом розчинів етанолу.

3. Відновлення антигену здійснювали у цитратному буфері [10 мМ цитрат натрію, який містить Tween-20 у концентрації 0,5 мл/л протягом 25 хв., використовуючи лабораторний мікрохвильовий пристрій для досягнення температури приблизно 99-100 °C]. Цей процес спрямовано на відновлення антигенності ділянок шкіри, маскованих протягом їх занурення у парафін.

4. II. Імунозabarвлення:

1. Зрізи інкубували у 10% нормальній сироватці віслюка, розведений у фосфатному буфері (PBS), протягом 1 години при кімнатній температурі з метою зменшення неспецифічного зв'язування антитіла.

2. Надлишки сироватки видаляли, та зріз, покривали кролячим антитілом (1:100), розведеним у PBS, та інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години або протягом ночі при 4°С у камері вологості.

3. Після цього зрізи двічі промивали у PBS протягом 5 хвилин, обережно перемішуючи.

4. Надлишок PBS обережно видаляли та зрізи покривали біотинільованим віслючим антикролячим IgG, розведеним 1:5000 у PBS, протягом 30 хвилин при кімнатній температурі у камері вологості.

5. Після цього зрізи двічі промивали у PBS протягом 5 хвилин, обережно перемішуючи.

6. Надлишок PBS обережно видаляли, та зрізи інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі у кон'югаті стрептавідин-флуоресцин ізо-

тіоціанат (стрептавідин-FITC) у PBS при концентрації 5 мкг/мл.

7. Після цього зрізи двічі промивали у PBS протягом 5 хвилин, обережно перемішуючи.

8. Після цього зрізи контрастно забарвлювали гематоксилином протягом 2-3 хв.

9. Після цього зрізи досліджували за допомогою флуоресцентного мікроскопу.

10. Придатні картинки фотографували.

11. Експериментальні контролю не містили первинних анти-TSLP антитіл, або замінювали первинне анти-TSLP антитіло нормальними кролячими антитілами.

Таблиця 1, нижче, підсумовує результати ІГХ експериментів.

Таблиця 1

Імуногістохімія кролячого анти-людського TSLP проведена на блоках тканини, зануреної у парафін, взятої з собак, які хворіють на різні хвороби шкіри.

Умови хвороби (загальна кількість блоків)	Позитивні блоки	Негативні блоки
АД уражена шкіра (* n=10)	8	2
Нормальна шкіра, оброблена PBS (n=5)	1	4
Вроджений бульозний епідермоз (n=2)	2	0
Собачий шкіряний червоний вовчак (n=3)	0	3
Ексудативна багатоформна ерітема (n=3)	2	1
* n= кількість тварин.		

Експресію TSLP виявляли на 80% тканин шкіри з собак, яким поставили діагноз АД, тільки у 20% нормальних тканин шкіри оброблених сольовим розчином. Також TSLP виявляли у 66% та 100% тканин собак з ексудивною багатоформною ерітемою та собак з генетичними хворобами шкіри, вродженим бульозним епідермозом; відповідно. Не виявили експресію TSLP у тканинах шкіри собак, хворих на шкіряний червоний вовчак. У занурених у парафін тканинах шкіри експресію TSLP виявляли у потових залозах. Експресію TSLP у заморожених собачих тканинах залоз виявляли у шаровому сквамозному епітелії та прилежних слинних залозах. Приклад позитивного ІГХ забарвлення у зразках шкіри собак показано на Фіг. 4, на якій зображені зразки шкіри, занурені у парафін, отримані з собак, яким поставили діагноз atopічний дерматит.

Приклад 6

Виявлення собачого TSLP імунопероксидазою

Експресію собачого TSLP у зразках шкіри, занурених у парафін, які отримали з шкіри собак, яким поставили діагноз atopічний дерматит, також вимірювали за допомогою імуногістохімічного аналізу з використанням забарвлення імунопероксидазою як способу виявлення. У цьому способі епітоп-специфічне пацюкове моноклональне антитіло, яке вироблялось проти людського TSLP, використовували як первинне антитіло. Процедур визначення експресії TSLP шляхом забарвлення імунопероксидазою здійснювали наступним чином:

Спеціальні реагенти

Нормальна сироватка новонароджених телят: #N-4762 Sigma

Парафін-занурені тканини шкіри

Первинне антитіло: пацюковий анти-людський TSLP mAb пацюковий IgG2a

Вторинне антитіло: кролячий анти-пацюковий IgG (біотинільований): BA-4000 Vector Lab. Burlingame, CA.

Реагент для виявлення: стрептавідин-HRP: #43-8323 Zymed Labs. San Francisco, CA

AEC substrate Kit: Biogenex#HK129-5K San Ramon, CA

1. зразок 4-6 мм.

2. висушування протягом 10 хв. при кімнатній температурі

3. фіксація протягом 10 хв. у ацетоні

4. промивання у PBS (0,01 фосфатний сольовий буфер) протягом 3 хв.

5. блокування шляхом інкубації у 0,3 % пероксиді водню з 0,1% азидом натрію протягом 7-10 хв.

6. промивання протягом 5 хв. PBS.

7. блокування зразку 1% нормальною сироваткою новонароджених телят протягом 20 хв. у камері для зволоження.

8. Висушування препарату та нанесення первинного антитіла, розведеного 1:100, протягом 2 годин при кімнатній температурі.

9. промивання протягом 5 хв.

10. нанесення вторинного антитіла (кролячий анти-пацюковий IgG @1:400) протягом 30 хв. у камері для зволоження при кімнатній температурі.

11. промивання протягом 5 хв.

12. Висушування та нанесення реагенту для виявлення (стрептавідин-HRP @1:400) протягом 30 хв. при кімнатній температурі.

13. промивання протягом 2X5 хв.

14. нанесення АЕС протягом 2,5 хв. Регулювання відповідно до бажаної інтенсивності забарвлення та фону.

15. контрастне забарвлення гематоксилином та монтування препарату.

Набір тканин шкіри собак, взятий з собак хворих на АД, тестували шляхом ІГХ аналізу, використовуючи специфічне до собачого TSLP антитіло. Результати, зазначені на Фіг. 5, показали, що таке антитіло взаємодіє з молекулою, яка розділяє антигенні епітопи з людським TSLP. Забарвлення шматочків собачої шкіри з АД виявилось насиченим у ділянках хронічного запалення, де епідерміс був потовщений. Цей малюнок співпадає з даними, щодо розташування експресії TSLP у зрізах шкіри людини з АД та додатково підтверджує, що

молекула, виявлена у зрізах такнин шкіри собак з АД, є собачим TSLP. Не було виявлено забарвлення ані при PBS, ані при різних паціюкових моноклональних антитілах, специфічних до різних білків (лімфоцит-асоційованих білків).

Приклад 7

Мапування епітопів собачого TSLP

З метою ідентифікації епітопів собачого TSLP, придатних для включення у вакцину, здатну нейтралізувати активність TSLP, синтезували набір пептидів, що перетинаються, на основі послідовності собачого TSLP, та тестували їх на здатність взаємодіяти з нейтралізуючим анти-людським TSLP моноклональним антитілом. Для цієї мети набір пептидів, що перетинаються, довжиною 15 амінокислот кожен та виступ з двох амінокислот синтезували під номерами у MIMOTOPES

(Minneapolis, MN). Послідовності цих пептидів перелічені на таблиці 2. Пептиди 1-57 синтезували з амідованим кінцем у конфігурації NH₂-ПЕТИД-РІМ. Пептиди 58-94 (копії материнських пептидів 1-37) виробили з ацетильованим кінцем у конфігурації АЦЕТИЛ-ПЕПТИД-PIN.

Номери пептидів перелічені на таблиці 2 тестували у дослідженні ELISA згідно з рекомендованими методиками (Mimotopes, Minneapolis, MN). Як показано на Фіг. 6, пептид # 25 (епітоп 25) з амінокислотною послідовністю NH₂-ARIELTLHRIHGCA (SEQ ID NO: 32) мав найвищу реактивність проти PAB100 моноклонального антитіла. Порівняння цієї пептидної послідовності з відповідною уявною пептидною послідовністю людського TSLP показано на Фіг. 7.

Таблиця 2
Собачі TSLP, використані для картування епітопів

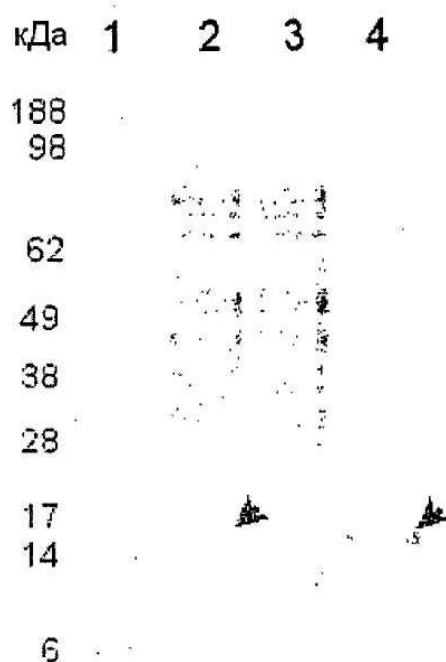
Номер епітопу	SEQ ID NOs:	Номер епітопу	SEQ ID NOs:
1 YNFIDCFEKIRWKY	8	48 AKKKRKRKRGVTTNKC	55
2 FIDCFEKIRWKYQE	9	49 KKKRKRKRGVTTNKC	56
3 DCFEKIRWKYQEV	10	50 RKKRGVTTNKC	57
4 DFEKIRWKYQEVYQ	11	51 KRGVTTNKC	58
5 EKIRWKYQEVYQAL	12	52 GVTNKC	59
6 IRWKYQEVYQALEK	13	53 TTNKC	60
7 WKYQEVYQALEKYM	14	54 NKC	61
8 YQEVYQALEKYM	15	55 CREQVAHLIGLWRRF	62
9 EVYQALEKYM	16	56 EQVAHLIGLWRRFSR	63
10 IYQALEKYM	17	57 VAHLIGLWRRFSRIS	64
11 QALEKYM	18	58 YNFIDCFEKIRWKY	65
12 LEKYM	19	59 FIDCFEKIRWKYQE	66
13 KYMDGTRSTEF	20	60 DCFEKIRWKYQEV	67
14 MDGTRSTEF	21	61 DFEKIRWKYQEVYQ	68
15 GTRSTEF	22	62 EKIRWKYQEVYQAL	69
16 RSTEF	23	63 IRWKYQEVYQALEK	70
17 TEF	24	64 WKYQEVYQALEKYM	71
18 FSH	25	65 YQEVYQALEKYM	72
19 HPV	26	66 EVYQALEKYM	73
20 VCAN	27	67 IYQALEKYM	74
21 CAN	28	68 QALEKYM	75
22 NPP	29	69 LEKYM	76
23 PDCL	30	70 KYMDGTRSTEF	77
24 CL	31	71 MDGTRSTEF	78
25 ARI	32	72 GTRSTEF	79
26 IER	33	73 RSTEF	80
27 RL	34	74 TEF	81
28 TL	35	75 FSH	82
29 HR	36	76 HPV	83
30 IR	37	77 VCAN	84
31 GC	38	78 CAN	85
32 AS	39	79 NPP	86
33 GA	40	80 PDCL	87
34 RE	41	81 CL	88
35 AF	42	82 ARI	89
36 AE	43	83 IER	90
37 GT	44	84 RL	91
38 VA	45	85 TL	92
39 AL	46	86 HR	93
40 AA	47	87 IR	94
41 EC	48	88 GC	95
42 PG	49	89 AS	96
43 YA	50	90 GA	97
44 AP	51	91 RE	98
45 PI	52	92 AF	99
46 NN	53	93 AE	100
47 TQ	54	94 GT	101

Даний винахід не обмежується певними варіантами здійснення, описаними у даному документі. Насправді, різні модифікації винаходу, на додаток до тих, що описані у даному документі, будуть очевидними для фахівців з вищенаведеного опису. Такі модифікації не виходять за рамки заявленого у формулі винаходу об'єму прав.

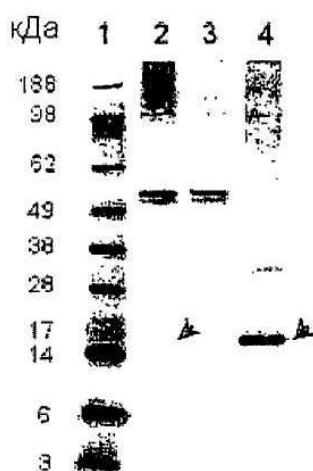
Також потрібно розуміти, що всі розміри основ або амінокислот, та значення молекулярної ваги або маси, наведені для нуклеїнових кислот або поліпептидів, є приблизними, та наведені для опису.

У даному документі наведені багаточисельні публікації, суть яких включена у даний документ як посилання.

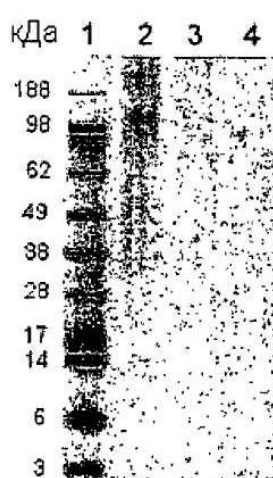
ФІГ. 1



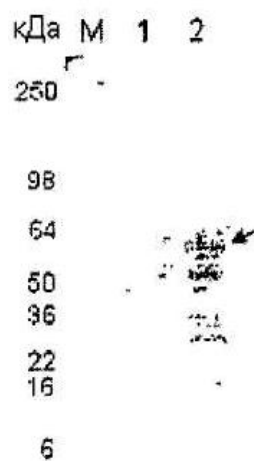
ФІГ. 2А



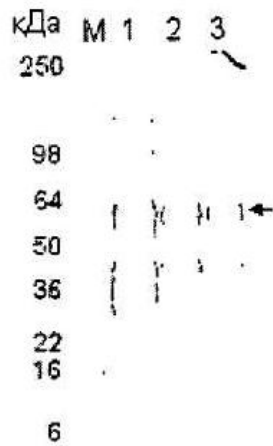
ФІГ. 2В



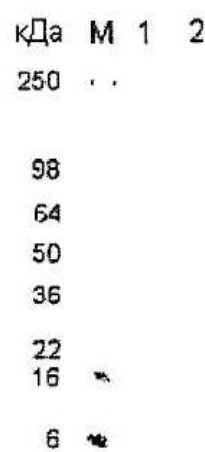
ΦΙΓ. 3Α



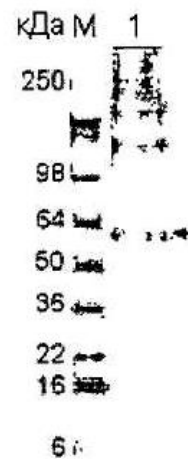
ΦΙΓ. 3Β



ΦΙΓ. 3C



ΦΙΓ. 3D



ΦΙΓ. 4



ΦΙΓ. 5A

20 ΜΚΜ

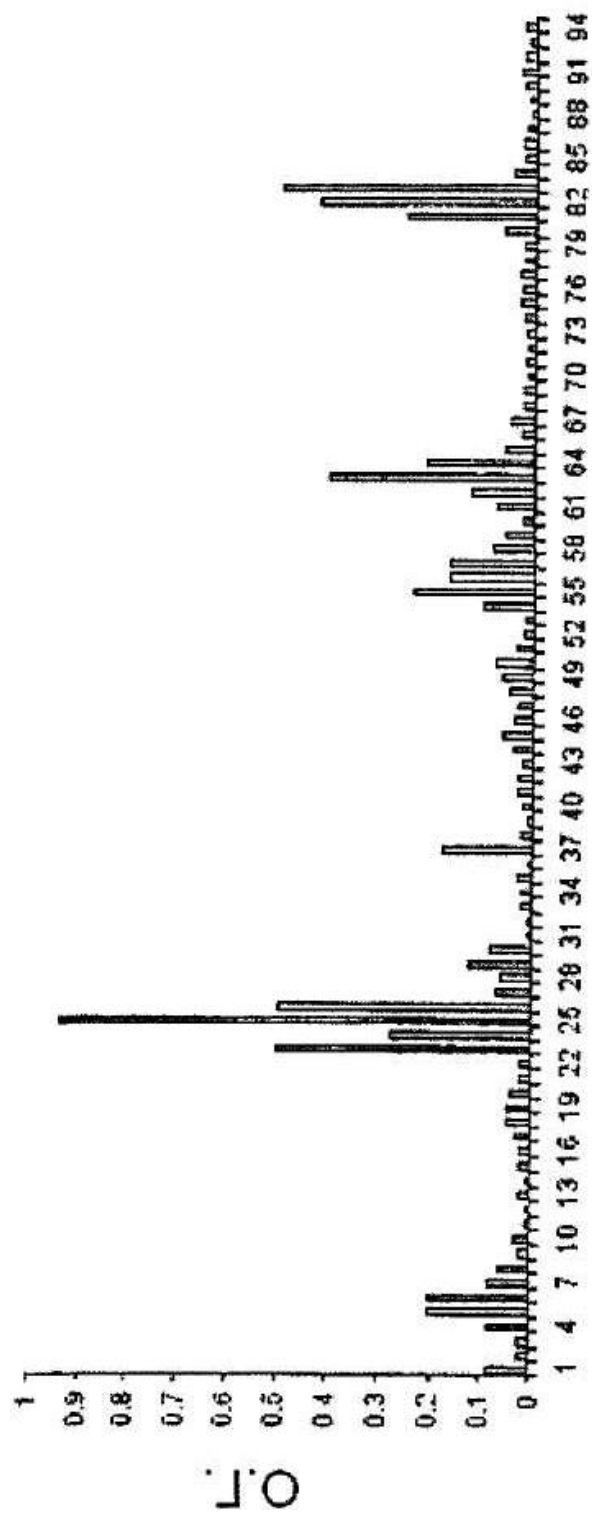


ΦΙΓ. 5B

20 ΜΚΜ



ФІГ. 6



Номер пептиду

Фиг. 7

Собака: ARIERLTLHRIRGCA
 Людина: TEIQSLTFNPTAGCA
 Фиг. 8А

5' -

ATGGTGCCTGATGCCCTGCTGAGCGTGCTGAGCGTGTTCTTTAGGAAGAT
 CTTTCGTCTTGCAGCTGGTAGGGCTGGTGCTAACCTACAATTTTCATTGACT
 GTGACTTTGAGAAGATTAGATGGAAGTATCAGGAAGTCATTTACCAAGCC
 CTGGAGAAATACATGGATGGGACCAGGAGCACGGAGTTCAGCCACCCCGT
 GTA CTGCGCGAACCCGCCCGACTGCCTGGCCAGGATCGAGCGGCTCACCC
 TGCACCGCATCCGCGGCTGCGCGTCCGGCGCCCGGGAGGCCCTTCGCCGAG
 GGGACGGTCGCCGCGCTCGCCGCCGAGTGCCCGGGCTACGCCGCAGCGCC
 GATAAATAATACCCAGGCCAAAGAAGAAAAGAAAAAAGAGGAGTCACAA
 CAAATAAATGCCGGGAACAAGTCGCACACTTAATAGGGCTGTGGCGTCGT
 TTCAGTCGCATTTTCATAG -3'

Фиг. 8В

*

MVPDALLSVLSVFFRKIFVLQLVGLVLTYNFIDCDFEKIRWKYQEVIIYQA
 LEKYMDGTRSTEF SHPVYCANPPDCLARIERLTLHRIRGCASGAREAFAE
 GTVAALAAECPGYAAAPINNTQAKKKRKKRGVTTNKCREQVAHLIGLWRR
 FSRIS

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ШЕРІНГ-ПЛАУ ЛТД.

<120> СОБАЧИЙ ТІМУСНИЙ СТРОМАЛЬНИЙ ЛІМФОПОЕТИН ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

<130> AH06501 WO

<150> 60/875,135

<151> 2006-12-14

<160> 118

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 468

<212> ДНК

<213> Домашня собака

<400> 1

atggtgacctg atgccctgct gagcgtgctg agcgtgttct ttaggaagat cttcgtcttg	60
cagctggtag ggctggtgct aacctacaat ttcattgact gtgactttga gaagattaga	120
tggaagtatc aggaagtcac ttaccaagcc ctggagaaat acatggatgg gaccaggagc	180
acggagttca gccaccccggt gtactgcgcg aaccgcgccg actgcctggc caggatcgag	240
cggctcacc cgcacccgat ccgcggctgc gcgtcgggcg cccgggaggc cttcgcgcgag	300
gggacggctg ccgcgcctcg cgccgagtcg ccgggctacg ccgcagcgcc gataaataat	360
accaggcaaa agaagaaaaa aaaaaaaa gaagtcacaa caataaatg cggggaacaa	420
gtcgcacact taatagggct gtggcgtcgt ttcagtcgca ttcatag	460

<210> 2

<211> 155

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 2

Met Val Pro Asp Ala Leu Leu Ser Val Leu Ser Val Phe Phe Arg Lys
1 5 10 15

Ile Phe Val Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asn Phe Ile
20 25 30

Asp Cys Asp Phe Glu Lys Ile Arg Trp Lys Tyr Gln Glu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Ala Leu Glu Lys Tyr Met Asp Gly Thr Arg Ser Thr Glu Phe Ser

55

95329

56

50

55

60

His Pro Val Tyr Cys Ala Asn Pro Pro Asp Cys Leu Ala Arg Ile Glu
65 70 75 80

Arg Leu Thr Leu His Arg Ile Arg Gly Cys Ala Ser Gly Ala Arg Glu
85 90 95

Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu Cys Pro Gly
100 105 110

Tyr Ala Ala Ala Pro Ile Asn Asn Thr Gln Ala Lys Lys Lys Arg Lys
115 120 125

Lys Arg Gly Val Thr Thr Asn Lys Cys Arg Glu Gln Val Ala His Leu
130 135 140

Ile Gly Leu Trp Arg Arg Phe Ser Arg Ile Ser
145 150 155

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala
1 5 10 15

<210> 4
<211> 35
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

<400> 4
aataatccat ggcatacaat ttcattgact gtgac 35

<210> 5
<211> 33
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

<400> 5
aaaatagata tctgaaatgc gactgaaacg acg 33

<210> 6
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

<400> 6
 aataatccat ggcatacaat ttcattgact gtgac 35

<210> 7
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

<400> 7
 acataaaaagc tttgaaatgc gactgaaacg acg 33

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Домашня собака

<400> 8
 Tyr Asn Phe Ile Asp Cys Asp Phe Glu Lys Ile Arg Trp Lys Tyr
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Домашня собака

<400> 9
 Phe Ile Asp Cys Asp Phe Glu Lys Ile Arg Trp Lys Tyr Gln Glu
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Домашня собака

<400> 10
 Asp Cys Asp Phe Glu Lys Ile Arg Trp Lys Tyr Gln Glu Val Ile
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Домашня собака

<400> 11

Asp Phe Glu Lys Ile Arg Trp Lys Tyr Gln Glu Val Ile Tyr Gln
1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 12

Glu Lys Ile Arg Trp Lys Tyr Gln Glu Val Ile Tyr Gln Ala Leu
1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 13

Ile Arg Trp Lys Tyr Gln Glu Val Ile Tyr Gln Ala Leu Glu Lys
1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 14

Trp Lys Tyr Gln Glu Val Ile Tyr Gln Ala Leu Glu Lys Tyr Met
1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 15

Tyr Gln Glu Val Ile Tyr Gln Ala Leu Glu Lys Tyr Met Asp Gly
1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 16

Glu Val Ile Tyr Gln Ala Leu Glu Lys Tyr Met Asp Gly Thr Arg
1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 17

Ile	Tyr	Gln	Ala	Leu	Glu	Lys	Tyr	Met	Asp	Gly	Thr	Arg	Ser	Thr
1				5					10					15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 18

Gln	Ala	Leu	Glu	Lys	Tyr	Met	Asp	Gly	Thr	Arg	Ser	Thr	Glu	Phe
1				5					10					15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 19

Leu	Glu	Lys	Tyr	Met	Asp	Gly	Thr	Arg	Ser	Thr	Glu	Phe	Ser	His
1				5					10					15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 20

Lys	Tyr	Met	Asp	Gly	Thr	Arg	Ser	Thr	Glu	Phe	Ser	His	Pro	Val
1				5					10					15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 21

Met	Asp	Gly	Thr	Arg	Ser	Thr	Glu	Phe	Ser	His	Pro	Val	Tyr	Cys
1				5					10					15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 22

Gly	Thr	Arg	Ser	Thr	Glu	Phe	Ser	His	Pro	Val	Tyr	Cys	Ala	Asn
1					5				10					15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 23

Arg	Ser	Thr	Glu	Phe	Ser	His	Pro	Val	Tyr	Cys	Ala	Asn	Pro	Pro
1				5					10				15	

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 24

Thr	Glu	Phe	Ser	His	Pro	Val	Tyr	Cys	Ala	Asn	Pro	Pro	Asp	Cys
1				5					10				15	

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 25

Phe	Ser	His	Pro	Val	Tyr	Cys	Ala	Asn	Pro	Pro	Asp	Cys	Leu	Ala
1				5					10				15	

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 26

His	Pro	Val	Tyr	Cys	Ala	Asn	Pro	Pro	Asp	Cys	Leu	Ala	Arg	Ile
1				5					10				15	

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 27

Val	Tyr	Cys	Ala	Asn	Pro	Pro	Asp	Cys	Leu	Ala	Arg	Ile	Glu	Arg
1				5					10				15	

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 28

Cys	Ala	Asn	Pro	Pro	Asp	Cys	Leu	Ala	Arg	Ile	Glu	Arg	Leu	Thr
1				5					10				15	

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 29

Asn	Pro	Pro	Asp	Cys	Leu	Ala	Arg	Ile	Glu	Arg	Leu	Thr	Leu	His
1				5					10				15	

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 30

Pro	Asp	Cys	Leu	Ala	Arg	Ile	Glu	Arg	Leu	Thr	Leu	His	Arg	Ile
1				5					10				15	

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 31

Cys	Leu	Ala	Arg	Ile	Glu	Arg	Leu	Thr	Leu	His	Arg	Ile	Arg	Gly
1				5					10				15	

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 32

Ala	Arg	Ile	Glu	Arg	Leu	Thr	Leu	His	Arg	Ile	Arg	Gly	Cys	Ala
1				5					10				15	

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 33

Ile	Glu	Arg	Leu	Thr	Leu	His	Arg	Ile	Arg	Gly	Cys	Ala	Ser	Gly
1				5					10				15	

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 34

Arg	Leu	Thr	Leu	His	Arg	Ile	Arg	Gly	Cys	Ala	Ser	Gly	Ala	Arg
1				5					10				15	

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 35

Thr	Leu	His	Arg	Ile	Arg	Gly	Cys	Ala	Ser	Gly	Ala	Arg	Glu	Ala
1				5					10				15	

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 36

His	Arg	Ile	Arg	Gly	Cys	Ala	Ser	Gly	Ala	Arg	Glu	Ala	Phe	Ala
1				5				10					15	

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 37

Ile	Arg	Gly	Cys	Ala	Ser	Gly	Ala	Arg	Glu	Ala	Phe	Ala	Glu	Gly
1			5					10					15	

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 38

Gly	Cys	Ala	Ser	Gly	Ala	Arg	Glu	Ala	Phe	Ala	Glu	Gly	Thr	Val
1				5				10					15	

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 39

Ala	Ser	Gly	Ala	Arg	Glu	Ala	Phe	Ala	Glu	Gly	Thr	Val	Ala	Ala
1				5				10					15	

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 40

Gly	Ala	Arg	Glu	Ala	Phe	Ala	Glu	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Ala
1				5				10					15	

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 41

Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu
1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 42

Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu Cys Pro
1 5 10 15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 43

Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu Cys Pro Gly Tyr
1 5 10 15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 44

Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu Cys Pro Gly Tyr Ala Ala
1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 45

Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu Cys Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Pro
1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 46

Ala Leu Ala Ala Glu Cys Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Pro Ile Asn
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 47

Ala Ala Glu Cys Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Pro Ile Asn Asn Thr
1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 48

Glu Cys Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Pro Ile Asn Asn Thr Gln Ala
1 5 10 15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 49

Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Pro Ile Asn Asn Thr Gln Ala Lys Lys
1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 50

Tyr Ala Ala Ala Pro Ile Asn Asn Thr Gln Ala Lys Lys Lys Arg
1 5 10 15

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 51

Ala Ala Pro Ile Asn Asn Thr Gln Ala Lys Lys Lys Arg Lys Lys
1 5 10 15

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 52

Pro Ile Asn Asn Thr Gln Ala Lys Lys Lys Arg Lys Lys Arg Gly
1 5 10 15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 53

Asn	Asn	Thr	Gln	Ala	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Val	Thr
1				5					10					15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 54

Thr	Gln	Ala	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Val	Thr	Thr	Asn
1				5					10					15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 55

Ala	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Lys	Cys
1				5					10					15

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 56

Lys	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Lys	Cys	Arg	Glu
1				5					10					15

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 57

Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Lys	Cys	Arg	Glu	Gln	Val
1				5					10					15

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 58

Lys	Arg	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Lys	Cys	Arg	Glu	Gln	Val	Ala	His
1						5				10				15

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 59

Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Lys	Cys	Arg	Glu	Gln	Val	Ala	His	Leu	Ile
1				5				10					15	

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 60

Thr	Thr	Asn	Lys	Cys	Arg	Glu	Gln	Val	Ala	His	Leu	Ile	Gly	Leu
1			5					10					15	

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 61

Asn	Lys	Cys	Arg	Glu	Gln	Val	Ala	His	Leu	Ile	Gly	Leu	Trp	Arg
1			5					10					15	

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 62

Cys	Arg	Glu	Gln	Val	Ala	His	Leu	Ile	Gly	Leu	Trp	Arg	Arg	Phe
1			5					10						15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 63

Glu	Gln	Val	Ala	His	Leu	Ile	Gly	Leu	Trp	Arg	Arg	Phe	Ser	Arg
1			5					10					15	

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 64

Val	Ala	His	Leu	Ile	Gly	Leu	Trp	Arg	Arg	Phe	Ser	Arg	Ile	Ser
1			5					10					15	

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 65

Tyr	Asn	Phe	Ile	Asp	Cys	Asp	Phe	Glu	Lys	Ile	Arg	Trp	Lys	Tyr
1				5					10					15

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 66

Phe	Ile	Asp	Cys	Asp	Phe	Glu	Lys	Ile	Arg	Trp	Lys	Tyr	Gln	Glu
1				5					10					15

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 67

Asp	Cys	Asp	Phe	Glu	Lys	Ile	Arg	Trp	Lys	Tyr	Gln	Glu	Val	Ile
1				5					10					15

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 68

Asp	Phe	Glu	Lys	Ile	Arg	Trp	Lys	Tyr	Gln	Glu	Val	Ile	Tyr	Gln
1				5					10					15

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 69

Glu	Lys	Ile	Arg	Trp	Lys	Tyr	Gln	Glu	Val	Ile	Tyr	Gln	Ala	Leu
1				5					10					15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 70

Ile	Arg	Trp	Lys	Tyr	Gln	Glu	Val	Ile	Tyr	Gln	Ala	Leu	Glu	Lys
1				5					10					15

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 71

Trp	Lys	Tyr	Gln	Glu	Val	Ile	Tyr	Gln	Ala	Leu	Glu	Lys	Tyr	Met
1				5					10					15

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 72

Tyr	Gln	Glu	Val	Ile	Tyr	Gln	Ala	Leu	Glu	Lys	Tyr	Met	Asp	Gly
1				5					10					15

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 73

Glu	Val	Ile	Tyr	Gln	Ala	Leu	Glu	Lys	Tyr	Met	Asp	Gly	Thr	Arg
1				5					10					15

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 74

Ile	Tyr	Gln	Ala	Leu	Glu	Lys	Tyr	Met	Asp	Gly	Thr	Arg	Ser	Thr
1				5					10					15

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 75

Gln	Ala	Leu	Glu	Lys	Tyr	Met	Asp	Gly	Thr	Arg	Ser	Thr	Glu	Phe
1				5					10					15

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 76

Leu	Glu	Lys	Tyr	Met	Asp	Gly	Thr	Arg	Ser	Thr	Glu	Phe	Ser	His
1				5					10					15

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 77

Lys	Tyr	Met	Asp	Gly	Thr	Arg	Ser	Thr	Glu	Phe	Ser	His	Pro	Val
1				5					10					15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 78

Met	Asp	Gly	Thr	Arg	Ser	Thr	Glu	Phe	Ser	His	Pro	Val	Tyr	Cys
1				5					10					15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 79

Gly	Thr	Arg	Ser	Thr	Glu	Phe	Ser	His	Pro	Val	Tyr	Cys	Ala	Asn
1				5					10					15

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 80

Arg	Ser	Thr	Glu	Phe	Ser	His	Pro	Val	Tyr	Cys	Ala	Asn	Pro	Pro
1				5					10					15

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 81

Thr	Glu	Phe	Ser	His	Pro	Val	Tyr	Cys	Ala	Asn	Pro	Pro	Asp	Cys
1				5					10					15

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 82

Phe	Ser	His	Pro	Val	Tyr	Cys	Ala	Asn	Pro	Pro	Asp	Cys	Leu	Ala
1				5					10					15

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 83

His	Pro	Val	Tyr	Cys	Ala	Asn	Pro	Pro	Asp	Cys	Leu	Ala	Arg	Ile
1				5					10					15

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 84

Val	Tyr	Cys	Ala	Asn	Pro	Pro	Asp	Cys	Leu	Ala	Arg	Ile	Glu	Arg
1				5					10					15

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 85

Cys	Ala	Asn	Pro	Pro	Asp	Cys	Leu	Ala	Arg	Ile	Glu	Arg	Leu	Thr
1				5					10					15

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 86

Asn	Pro	Pro	Asp	Cys	Leu	Ala	Arg	Ile	Glu	Arg	Leu	Thr	Leu	His
1				5					10					15

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 87

Pro	Asp	Cys	Leu	Ala	Arg	Ile	Glu	Arg	Leu	Thr	Leu	His	Arg	Ile
1				5					10					15

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 88

Cys	Leu	Ala	Arg	Ile	Glu	Arg	Leu	Thr	Leu	His	Arg	Ile	Arg	Gly
1				5					10					15

<210> 89

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 89

Ala Arg Ile Glu Arg Leu Thr Leu His Arg Ile Arg Gly Cys Ala
1 5 10 15

<210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 90

Ile Glu Arg Leu Thr Leu His Arg Ile Arg Gly Cys Ala Ser Gly
1 5 10 15

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 91

Arg Leu Thr Leu His Arg Ile Arg Gly Cys Ala Ser Gly Ala Arg
1 5 10 15

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 92

Thr Leu His Arg Ile Arg Gly Cys Ala Ser Gly Ala Arg Glu Ala
1 5 10 15

<210> 93

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 93

His Arg Ile Arg Gly Cys Ala Ser Gly Ala Arg Glu Ala Phe Ala
1 5 10 15

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 94

Ile Arg Gly Cys Ala Ser Gly Ala Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gly
1 5 10 15

<210> 95

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 95

Gly Cys Ala Ser Gly Ala Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val
1 5 10 15

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 96

Ala Ser Gly Ala Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala
1 5 10 15

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 97

Gly Ala Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala
1 5 10 15

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 98

Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu
1 5 10 15

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 99

Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu Cys Pro
1 5 10 15

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 100

Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu Cys Pro Gly Tyr
1 5 10 15

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 101

Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu Cys Pro Gly Tyr Ala Ala
 1 5 10 15

<210> 102

<211> 57

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Leu Tyr Val Leu Ser Val Ser Phe Arg Lys Ile Phe Ile Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys
 20 25 30

Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr
 35 40 45

Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe
 50 55

<210> 103

<211> 55

<212> PRT

<213> Домашняя собака

<400> 103

Leu Ile Ile Cys Ser Val Ser Val Phe Arg Lys Ile Phe Val Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asn Phe Ile Asp Cys Asp Phe Glu
 20 25 30

Lys Ile Arg Trp Lys Tyr Gln Glu Val Ile Tyr Gln Ala Leu Glu Lys
 35 40 45

Tyr Met Asp Gly Val Ser Glu
 50 55

<210> 104

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val
 1 5 10 15

Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp

91	95329	92
20	25	30
Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln		
35	40	
<210> 105		
<211> 39		
<212> PRT		
<213> Домашняя собака		
<400> 105		
Gln Ile Asn Asn Thr Gln Ala Lys Lys Lys Arg Lys Lys Arg Gly Val		
1	5	10 15
Thr Thr Asn Lys Cys Arg Glu Gln Val Ala His Leu Ile Gly Leu Trp		
20	25	30
Arg Arg Phe Ser Arg Ile Ser		
35		
<210> 106		
<211> 44		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 106		
Leu Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala		
1	5	10 15
Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala		
20	25	30
Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn		
35	40	
<210> 107		
<211> 44		
<212> PRT		
<213> Домашняя собака		
<400> 107		
Leu Ala Arg Ile Glu Arg Leu Thr Leu His Arg Ile Arg Gly Cys Ala		
1	5	10 15
Ser Gly Ala Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala		
20	25	30
Ala Glu Cys Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Pro Val Ser		
35	40	

<210> 108
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 108
 Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr
 1 5 10 15

Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile
 20 25 30

<210> 109
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Домашня собака

<400> 109
 Thr Pro Gly Cys Gly Ile Cys Ala Lys Glu Ala Ala Ala Leu Gly Trp
 1 5 10 15

Phe Cys Ala Leu Ser Val Trp Cys Pro Gly Trp Ala Gln Thr Gln Val
 20 25 30

<210> 110
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 110
 Leu Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala
 1 5 10 15

Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala
 20 25 30

Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn
 35 40

<210> 111
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Домашня собака

<400> 111
 Leu Ala Arg Ile Glu Arg Leu Thr Leu His Arg Ile Arg Gly Cys Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Ala Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala
 20 25 30

Ala Glu Cys Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Pro Val Ser
35 40

<210> 112
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112
Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr
1 5 10 15

Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile
20 25 30

<210> 113
<211> 32
<212> PRT
<213> Домашняя собака

<400> 113
Thr Pro Gly Cys Gly Ile Cys Ala Lys Glu Ala Ala Ala Leu Gly Trp
1 5 10 15

Phe Cys Ala Leu Ser Val Trp Cys Pro Gly Trp Ala Gln Thr Gln Val
20 25 30

<210> 114
<211> 139
<212> PRT
<213> Домашняя собака

<400> 114
Arg Lys Ile Phe Val Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asn
1 5 10 15

Phe Ile Asp Cys Asp Phe Glu Lys Ile Arg Trp Lys Tyr Gln Glu Val
20 25 30

Ile Tyr Gln Ala Leu Glu Lys Tyr Met Asp Gly Thr Arg Ser Thr Glu
35 40 45

Phe Ser His Pro Val Tyr Cys Ala Asn Pro Pro Asp Cys Leu Ala Arg
50 55 60

Ile Glu Arg Leu Thr Leu His Arg Ile Arg Gly Cys Ala Ser Gly Ala
65 70 75 80

Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu Cys

97

95329

98

85

90

95

Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Pro Ile Asn Asn Thr Gln Ala Lys Lys Lys
 100 105 110

Arg Lys Lys Arg Gly Val Thr Thr Asn Lys Cys Arg Glu Gln Val Ala
 115 120 125

His Leu Ile Gly Leu Trp Arg Arg Phe Ser Arg
 130 135

<210> 115
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 115
 Arg Lys Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp
 1 5 10 15

Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr
 20 25 30

Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu
 35 40 45

Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu
 50 55 60

Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala
 65 70 75 80

Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys
 85 90 95

Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys
 100 105 110

Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser
 115 120 125

Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg
 130 135

<210> 116
 <211> 137
 <212> PRT

<213> Домашня собака

<400> 116

Arg Lys Ile Phe Val Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asn
1 5 10 15

Phe Ile Asp Cys Asp Phe Glu Lys Ile Arg Trp Lys Tyr Gln Glu Val
20 25 30

Ile Tyr Gln Ala Leu Glu Lys Tyr Met Asp Gly Thr Arg Ser Thr Glu
35 40 45

Phe Ser His Pro Val Tyr Cys Ala Asn Pro Pro Asp Cys Leu Ala Arg
50 55 60

Ile Glu Arg Leu Thr Leu His Arg Ile Arg Gly Cys Ala Ser Gly Ala
65 70 75 80

Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu Cys
85 90 95

Pro Gly Tyr Ala Ala Ala Pro Ile Asn Asn Thr Gln Ala Lys Lys Lys
100 105 110

Arg Lys Lys Arg Gly Val Thr Thr Asn Lys Cys Arg Glu Gln Val Ala
115 120 125

His Leu Ile Gly Leu Trp Arg Arg Phe
130 135

<210> 117

<211> 131

<212> PRT

<213> Миша

<400> 117

Arg Ser Leu Phe Ile Leu Gln Val Leu Val Arg Met Gly Leu Thr Tyr
1 5 10 15

Asn Phe Ser Asn Cys Asn Phe Thr Ser Ile Thr Lys Ile Tyr Cys Asn
20 25 30

Ile Ile Phe His Asp Leu Thr Gly Asp Leu Lys Gly Ala Lys Phe Glu
35 40 45

Gln Ile Glu Asp Cys Glu Ser Lys Pro Ala Cys Leu Leu Lys Ile Glu
50 55 60

101

95329

102

Tyr Tyr Thr Leu Asn Pro Ile Pro Gly Cys Pro Ser Leu Pro Asp Lys
65 70 75 80

Thr Phe Ala Arg Arg Thr Arg Glu Ala Leu Asn Asp His Cys Pro Gly
85 90 95

Tyr Pro Glu Thr Glu Arg Asn Asp Gly Thr Gln Glu Met Ala Gln Glu
100 105 110

Val Gln Asn Ile Cys Leu Asn Gln Thr Ser Gln Ile Leu Arg Leu Trp
115 120 125

Tyr Ser Phe
130

<210> 118
<211> 22
<212> PRT
<213> Домашня собака

<400> 118
Asn Pro Pro Asp Cys Leu Ala Arg Ile Glu Arg Leu Thr Leu His Arg
1 5 10 15

Ile Arg Gly Cys Ala Ser
20