



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101631800 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 05

(21) 申请号 200780051269. 0

A61K 38/20 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 12. 11

A61K 39/39 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/875, 135 2006. 12. 14 US

(56) 对比文件

WO 0029581A , 2000. 05. 25,

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 08. 12

审查员 杨振宇

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/025318 2007. 12. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02008/076255 EN 2008. 06. 26

(73) 专利权人 先灵 - 普劳有限公司

地址 瑞士卢塞恩

(72) 发明人 J·D·马特森 D·M·戈曼

R·德瓦尔马莱菲特 M·A·莫西

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 张萍 李连涛

(51) Int. Cl.

C07K 14/54 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 28 页

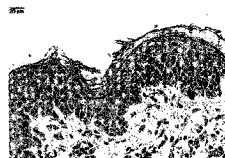
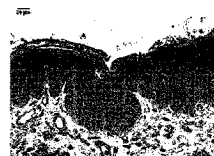
序列表 31 页 附图 5 页

(54) 发明名称

犬胸腺基质淋巴细胞生成素蛋白及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种犬 TSLP 蛋白和编码该蛋白的核酸。本发明也公开了该蛋白的包含犬 TSLP 蛋白特异性表位的肽片段。犬 TSLP 蛋白和相关肽片段可用作免疫分析的抗原,也可用作诱导抗 TSLP 抗体的疫苗。本发明进一步公开了制备和使用犬 TSLP 基因、犬 TSLP 蛋白、以及相关肽片段的方法。



1. SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的胸腺基质淋巴细胞生成素蛋白 (TSLP)。
2. 疫苗,其包含药学上可接受的佐剂和有效量的免疫原,该免疫原选自:权利要求 1 所述的 TSLP 蛋白。
3. 核酸分子,其编码如权利要求 1 所述的 TSLP 蛋白。
4. 表达载体,其包含如权利要求 3 所述的核酸分子。
5. 疫苗,其包含如权利要求 4 所述的表达载体。
6. 制备权利要求 1 的 TSLP 蛋白的方法,其包括在合适的培养基中培养宿主细胞,其中所述宿主细胞包含如权利要求 4 所述的表达载体,并且 TSLP 蛋白在其中表达。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其进一步包括从培养的宿主细胞或培养基中分离 TSLP 蛋白。
8. 权利要求 2 所述的疫苗在制备用于免疫哺乳动物以诱导抗 TSLP 抗体的药物中的应用。
9. 融合蛋白,其包括 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的胸腺基质淋巴细胞生成素蛋白 (TSLP)。
10. 疫苗,其包含药学上可接受的佐剂和有效量的如权利要求 9 的融合蛋白。
11. 核酸分子,其编码如权利要求 9 所述的融合蛋白。
12. 表达载体,其包含如权利要求 11 所述的核酸分子。
13. 疫苗,其包含如权利要求 12 所述的表达载体。

犬胸腺基质淋巴细胞生成素蛋白及其应用

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请为非临时申请,要求 2006 年 12 月 14 日根据美国法典第 35 篇第 119 条 e 款提交的系列号为 60/875,135 的美国临时专利申请的优先权,并将该申请的全部内容合并到本文中作为参考。

发明领域

[0003] 本发明涉及犬胸腺基质淋巴细胞生成素蛋白(犬“TSLP”)、编码犬 TSLP 的核酸分子、载体和宿主细胞,以及制备和使用犬 TSLP 的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 患有反应素介导的疾病,例如特应性疾病的动物,包括人,具有产生涉及免疫球蛋白 E(IgE) 抗体的速发变态反应的遗传倾向。由此得到的这些动物的这种表型的表达是由多个遗传因子促成的。特应性疾病的速发过敏性是由于暴露于特定的过敏原,例如室内尘螨(Dermatophagoides pteronyssinus)、花粉、霉菌、以及毛屑。不出人意料的是,患有特应性疾病的个体更容易患哮喘、遗传过敏性皮炎、以及与内部 IgE 释放有关的其它疾病。

[0006] 特应性疾病如过敏性皮炎、哮喘等等,也发生于犬类,包括家犬。这些犬一般在 1 到 3 岁之间开始出现特异反应性的征兆。尽管我们知道其它种类的犬,包括杂交品种,也会出现特异反应性,但由于该病的遗传特性,许多品种,包括金毛猎犬、许多小猎犬、爱尔兰长毛猎犬、拉萨狮子犬、斑点犬、斗牛犬、以及英国古老牧养犬,有更大的倾向出现特异反应性。至少一种特定类型的特异反应性,即遗传过敏性皮炎的发病率在人和犬中都显著提高。

[0007] 特异反应性犬通常会摩擦、舔、啃、咬、或抓自己的脚、鼻口部、耳朵、腋窝或腹股沟区域,导致毛发脱落、皮肤变红、增厚。在某些情况下,多种皮肤病共同作用导致动物发痒,而单独一种过敏症不会导致如此之痒。这些恶化的问题可能是由于空气传播的过敏原(花粉等)、食物中的过敏原、以及来自寄生虫(跳蚤等)的过敏原。皮肤的细菌和/或真菌感染也能加重痒的感觉。

[0008] 一种减轻特异反应性的恼人症状的简单方法是避免刺激性的过敏原。遗憾的是,这种避免通常是不现实的。迄今为止,兽医师已经通过下列方法治疗了犬遗传过敏性皮炎:口服抗组胺药、口服或外用皮质类固醇消炎剂、其它免疫系统抑制剂如环孢霉素或他克莫司(tacrolimus)、脂肪酸增补剂、以及过敏原特异性免疫疗法(需要注射确定的抗原)。然而,上述疗法没有一种能适用全部病例。此外,这些疗法花费昂贵和/或产生显著的副作用。因此,长期以来需要更安全、更有效、并且更经济的方法来治疗或抑制犬遗传过敏性皮炎的症状。

[0009] 哺乳动物的免疫应答基于一系列复杂的细胞相互作用,称为“免疫网络”。大多数免疫应答涉及淋巴细胞、巨噬细胞、粒细胞、以及其它细胞的网络状相互作用,其中被称为细胞因子的可溶性蛋白在介导/控制/调节这些细胞相互作用中起关键作用。因此,细胞因子和免疫细胞介导导致各种炎症的特定生理机制或通路。

[0010] 过敏性炎症是由于复杂的免疫级联造成的,其导致 T 细胞产生源于失调的 2 型

T 辅助淋巴细胞 (TH2) 的细胞因子, 例如白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 5 (IL-5)、以及白细胞介素 13 (IL-13)。这些细胞因子依次触发了支气管过度反应、IgE 生成、嗜酸性粒细胞增多、以及黏液的产生。(参见 Busse and Lemanske, Jr. (2001) *N. Engl. J. Med.* 344 : 350-62 ; Holgate (2000) *Br. Med. J.* 320 : 231-234 ; 以及 Renauld (2001) *J. Clin. Pathol.* 54 : 577-589)。

[0011] 胸腺基质淋巴细胞生成素蛋白 (TSLP) 是一种类似白细胞介素 7 (IL-7) 的细胞因子, 其最初在鼠中被鉴定为一种因子支持 : (i) 膜表面具有免疫球蛋白 M (IgM) 的 B 细胞的体外发育, (ii) B 细胞与 T 细胞的增殖 (Friend 等人, 1994, *Exp Hematology* 22 : 321-328, Levin 等人, 1999, *J. Immunol* 162 : 677-683)。现在已知 TSLP 结合于一种细胞受体, 其包含 IL-7R- α 亚单位和一种称为 TSLP-R 的独有受体亚单位。这种相互作用可在造血细胞, 例如骨髓谱系细胞如单核细胞, 或树突细胞中触发信号传导, 其经由转录活化因子 (STAT) 的激活或胸腺和激活可调节趋化因子 (TARC) 的表达来实现 (参见例如共有的美国专利第 6, 890, 734 号, 合并到本文中作为参考)。

[0012] TSLP 在鼠的过敏性疾病如遗传过敏性皮炎和哮喘的发病机理中也可能起重要作用。举例来说, 在皮肤中特别诱导 TSLP 基因表达的转基因鼠表现出遗传过敏性皮炎的免疫学和临床特征, 例如湿疹性损伤, 其包括炎性皮肤细胞浸润、表达皮肤归巢受体的 Th₂CD4⁺T 细胞显著增多、以及 IgE 血清水平的升高。此外, 表达肺特异性 TSLP 基因的鼠的肺部表现出哮喘的免疫学和临床特征, 其包括大量白细胞浸润、杯状细胞增生、上皮纤维化、2 型 T 辅助细胞因子的增多, 以及 IgE 水平的升高。

[0013] Sims 等用表达克隆得到了鼠 TSLP 的 cDNA 序列, 但是用基于鼠 TSLP 的杂交探针不能克隆人的同源体 (Sims 等人, 2000, *J exp Med*, 192 : 671-680)。其后, 通过详细的表达序列标签 (EST) 分析, 人的同源体被鉴定出来。已发现人 TSLP 的核苷酸序列与对应的小鼠序列只有 43% 的同源性。

[0014] 因此, 需要提供新的且更实用的方法来治疗犬特异性疾病, 包括遗传过敏性皮炎及其相关临床表现。此外, 需要分离出导致犬特异性疾病的免疫级联所涉及的因子, 其可能引发上述疗法的发展。

[0015] 本文对任何参考文献的引用不应解释为承认该参考文献可作为本申请的“现有技术”。

发明概要

[0016] 本发明提供了新的且更实用的方法来治疗犬特异性疾病, 包括遗传过敏性皮炎及其相关临床表现。相应地, 本发明提供了新的分离的和 / 或重组的胸腺基质淋巴细胞生成素蛋白 (TSLP), 其涉及导致特异性疾病的免疫级联。本发明进一步提供了这些 TSLP 蛋白的抗原片段。在本发明的某一具体方面, TSLP 蛋白为一种犬 TSLP 蛋白。

[0017] 因此本发明提供了一种 TSLP 蛋白, 其包含一段氨基酸序列, 该序列与 SEQ ID NO : 2 的氨基酸序列有 80% 或更高的同一性, 且不包括其 28 个氨基酸残基的信号序列, 当该蛋白作为疫苗施用于实验犬时, 从接种疫苗的实验犬取样的犬血清中可检测到抗体, 该抗体与包含 SEQ ID NO : 2 的氨基酸序列的犬 TSLP 蛋白结合。在一相关实施方式中, 所述 TSLP 蛋白包含一段氨基酸序列, 该序列与 SEQ ID NO : 2 的氨基酸序列有 80% 或更高的同一性,

且不包括其 28 个氨基酸残基的信号序列；并且可与包含 SEQ ID NO :2 中氨基酸的犬 TSLP 的抗体交叉反应。

[0018] 本发明进一步提供了一种 TSLP 蛋白,其包含一段氨基酸序列,该序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列有 80%或更高的同一性(不包括其 28 个氨基酸残基的信号序列),该蛋白与一种表位特异性的犬 TSLP 单克隆抗体结合。

[0019] 在一更具体的实施方式中,TSLP 蛋白包含一段氨基酸序列,该序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列有 90%或更高的同一性,不包括其 28 个氨基酸残基的信号序列。在另一实施方式中,TSLP 蛋白包含一段氨基酸序列,该序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列有 95%或更高的同一性,不包括其 28 个氨基酸残基的信号序列。

[0020] 在本发明的一特定实施方式中,TSLP 蛋白为犬 TSLP 蛋白,其包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。在另一实施方式中,TSLP 蛋白为成年犬 TSLP 蛋白,其包含 SEQ ID NO :2 中的氨基酸残基 29-155。

[0021] 本文还提供了本发明的 TSLP 蛋白的抗原片段。这些抗原片段包括含一个或多个表位的那些片段,所述表位分别由氨基酸序列 SEQ ID NOs :8-101 定义。在一种具体的实施方式中,本发明的一种抗原片段包含一个或多个表位,其包含一段氨基酸序列,该序列来自 SEQ ID NOs :30、31、32 和 / 或 34。在另一实施方式中,抗原片段可有一段氨基酸序列,该序列包含在氨基酸序列 SEQ ID NOs :30、31、32、和 / 或 34 的重叠区内,即 NPPDCLARIERLTLHRIRGCAS(SEQ ID NO :118)。在一种具体的实施方式中,犬 TSLP 蛋白的一种抗原片段能够与抗人 TSLP 的单克隆抗体结合。氨基酸序列 NPPDCLARIERLTLHRIRGCAS(SEQ ID NO :118) 的抗原片段的大小在约 5 个到约 21 个氨基酸残基之间。

[0022] 本文还提供了疫苗,这些疫苗可包含有效量的下列各项:本发明的任何 TSLP 蛋白、其一种或多种抗原片段、或者上述全长蛋白与一种或多种上述片段的组合。在一实施方式中,TSLP 蛋白为一种犬 TSLP 蛋白,其包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。在一具体的实施方式中,一种疫苗包含犬 TSLP 蛋白的一种或多种抗原片段,该蛋白包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸残基 71-92(本文鉴定为 SEQ ID NO :118) 中第 5 到 22 位邻接的氨基酸。在此公开了包括表位的上述抗原片段的实例,其包含 SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、或 SEQ ID NO :34 的氨基酸序列。本发明的所有疫苗可进一步包含药学上可接受的佐剂。

[0023] 本发明的疫苗可用于诱导抗犬 TSLP 抗体的方法。一种这样的方法包括用有效量的疫苗免疫哺乳动物。该方法任选包括一种下调犬体内 TSLP 活性的方法,和 / 或一种治疗或预防特异反应性犬的过敏症状的方法,其包括用有效量的疫苗免疫犬。被改善的过敏症状可包括过敏性皮炎、哮喘等等。

[0024] 本发明的疫苗可通过以下途径施用:肌肉注射、皮下注射、静脉注射、皮内注射、口服、鼻腔给药、划痕法、以及上述方法的组合。

[0025] 本发明进一步提供了一种核酸分子,其编码本发明的一种 TSLP 蛋白或者该蛋白的一种抗原片段。在一这样的实施方式中,所述核酸分子编码 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。在一具体的此类实施方式中,所述核酸分子包含 SEQ ID NO :1 的核苷酸序列。SEQ ID NO :1 的核苷酸序列的下列片段也是本发明的一部分:约 18 个连续核苷酸的片段、约 24 个连续核苷酸的片段、约 36 个连续核苷酸的片段、约 45 个连续核苷酸的片段、约 66 个连续核苷酸

的片段、或更大的片段。本发明还提供了下列核酸：约 18 个核苷酸、约 24 个核苷酸、约 36 个核苷酸、约 45 个核苷酸、约 66 个核苷酸、或更大的核酸，包括编码全长 TSLP 蛋白的核酸，其在严格的杂交条件下与 SEQ ID NO :1 杂交。本发明的所有核酸分子及其片段可进一步包含异源核苷酸序列。

[0026] 本发明还提供表达载体，其包括前面所述的核酸分子和 / 或其片段。另外，本发明提供包含这种表达载体的宿主细胞。宿主细胞可任选为原核或真核宿主细胞。在一实施方式中，原核宿主细胞为大肠杆菌。在一具体的此类实施方式中，所述宿主细胞为包含 T7 RNA 聚合酶基因的 E. coli BL21 (DE3) /pLysS，该基因受异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导的 lacUV5 启动子调控。

[0027] 本发明进一步提供重组病毒载体和 / 或裸 DNA 载体，其包含上述编码犬 TSLP 的核酸分子中的一种，例如 SEQ ID NO :1 和 / 或其片段。这些载体可用于，举例来说，适合施用于患有遗传过敏性皮炎的犬的疫苗。

[0028] 本发明还提供了生产本发明的 TSLP 蛋白的方法。这样的方法包括在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞。该方法可进一步包括从培养的宿主细胞或培养基中分离和 / 或提纯 TSLP 蛋白的步骤。分离和 / 或提纯所得到的蛋白也是本发明的一部分。

[0029] 由本发明的疫苗在杂交瘤体系中诱导产生的抗 TSLP 抗体也是本发明的一部分。在一此类实施方式中应用哺乳动物杂交瘤体系。在一具体的实施方式中，抗体被分离和 / 或提纯。所述抗体可以是多克隆或单克隆的。根据本发明，在非犬物种中诱导产生的单克隆抗体可任选进行犬源化改造，从而在给实验犬注射时尽量降低抗原性。在某些优选实施方式中，本发明的任何抗体的结合区可任选转换为（例如通过裂解）比原抗体小的结合片段，和 / 或成为一种重组 Fv、Fab、以及 F(ab')₂ 结合蛋白。本发明还包括源于抗体的治疗用蛋白，其包含天然重链抗体（例如 **NANOBODIES®**）所独有的结构和功能特性。另外，本发明还包括具有 TSLP 高亲和性和低免疫原性的抗体替代物（例如从 TSLP 受体的结合区制备的高亲合性多聚体）。这些新的抗犬 TSLP 抗体及高亲合性多聚体可方便地用于治疗特异反应性犬的过敏症状的方法，该方法通过施用有效量的抗犬 TSLP 抗体进行治疗。

[0030] 本发明还提供疫苗，其包含有效量的非 TSLP 免疫原，该免疫原与有效量的下列各项组合：本发明的 TSLP 蛋白、该蛋白的一个或多个抗原片段、或者全长蛋白与一个或多个上述片段的组合。在一具体的此类实施方式中，TSLP 蛋白为一种犬 TSLP 蛋白。在一更具体的实施方式中，犬 TSLP 蛋白包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。

[0031] 本发明另外提供诊断方法，这些方法应用新的犬 TSLP 蛋白、该蛋白的片段、和 / 或犬 TSLP 及其片段诱导产生的抗体。在一实施方式中，本发明提供诊断犬遗传过敏性皮炎的方法，其包括犬表皮样品的取样，以及在表皮样品中检测犬 TSLP 蛋白的存在。

[0032] 通过参考以下附图和详述部分，可以更好地了解本发明的上述方面和其它方面。

[0033] 附图简述

[0034] 图 1 所示为十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析，所分析蛋白来源于表达犬 TSLP 蛋白的无真核细胞的蛋白合成系统。第 1 道：蛋白分子量标准；第 2 道：全蛋白；第 3 道：可溶性蛋白；第 4 道：不可溶蛋白。TSLP 蛋白条带以箭头标示。

[0035] 图 2A 所示为蛋白质印迹 (Western blot) 分析，所分析蛋白来源于表达犬 TSLP 蛋白的无真核细胞的蛋白合成系统。该蛋白与购自 Invitrogen 公司的 Anti-His(C Term)/AP

Ab 反应。第 1 道:蛋白质分子量标准;第 2 道:全蛋白;第 3 道:可溶性蛋白;第 4 道:不可溶蛋白。犬 TSLP 蛋白在全蛋白和不可溶蛋白中检出(如箭头所示)。

[0036] 图 2B 所示为蛋白质印迹(Western blot)分析,所分析蛋白来源于表达犬 TSLP 蛋白的无真核细胞的蛋白合成系统。该蛋白与人 TSLP 特异性的大鼠单克隆抗体反应。第 1 道:蛋白质分子量标准;第 2 道:全蛋白;第 3 道:可溶性蛋白;第 4 道:不可溶蛋白。犬 TSLP 蛋白在全蛋白和不可溶蛋白中检出(如箭头所示)。

[0037] 图 3A 所示为来源于大肠杆菌(*E. coli*)宿主细胞的 TSLP 的表达与纯化,并且显示了存在于可溶性 *E. coli* 馏分的一个 61kd 条带,这表示犬 TSLP 与谷胱甘肽 S 转移酶(GST)融合蛋白以及一个 6 组氨酸标签的融合。“M”表示蛋白质分子量标准(在图 3A-3D 中相同)。第 1 道和第 2 道为包含质粒 1265-93B 的 *E. coli* B121(DE3)pLysS 的可溶性馏分,分别没有进行和进行了 IPTG 诱导。箭头标示了 GST-TSLP-His 融合蛋白条带(在图 3A-3D 中相同)。

[0038] 图 3B 显示 GST-TSLP-His 标签融合蛋白可用谷胱甘肽琼脂糖 4B 树脂纯化。第 1 到 3 道表示谷胱甘肽琼脂糖 4B 树脂的不同洗脱馏分。

[0039] 图 3C 显示 B 道的融合蛋白可用镍-次氨基三乙酸(Ni-NTA)树脂进一步纯化。本图所示为谷胱甘肽琼脂糖 4B 树脂纯化后的 GST-TSLP-His 融合蛋白用 Ni-NTA 树脂的再次纯化。第 1 道为流穿液,第 2 道为 Ni-NTA 树脂的洗脱液。

[0040] 图 3D 所示为 GST-TSLP-His 融合蛋白的蛋白质印迹(Western blot),证实了该融合蛋白可被一种抗 GST 抗体(GE Health Care 公司商品编号 27457701)识别。

[0041] 图 4 所示为损伤皮肤组织的石蜡包埋块切片的异硫氰酸荧光素(FITC)染色,样品取自被诊断为遗传过敏性皮炎的 10197 号犬。所述切片与兔抗人 TSLP 多克隆抗体反应,该反应用链霉亲和素-FITC(异硫氰酸荧光素)显影。荧光强度(照亮区)显示组织中出现兔抗人 TSLP 多克隆抗体与 TSLP 的结合。

[0042] 图 5A 所示为损伤皮肤组织的石蜡包埋块切片的免疫过氧化物酶染色,样品取自一只被诊断为遗传过敏性皮炎的犬。在此切片中,皮肤标本的表皮层有一大鼠抗人 TSLP 单克隆抗体导致的弥漫染色(暗区)。

[0043] 图 5B 所示为一对照切片。该切片来源于损伤皮肤组织的石蜡包埋块,样品取自一只被诊断为遗传过敏性皮炎的犬,只用磷酸缓冲液对照处理过。

[0044] 图 6 所示为犬 TSLP 蛋白与大鼠抗人 TSLP 单克隆抗体的表位图。需特别注意的峰来自第 22-26 号表位(SEQ ID NOs 29-33)。表位 22-26 还进行了 N 端修饰(55 号及以上各峰),以证实结合表位不需要 N 端氨基酸残基。

[0045] 图 7 所示为犬 TSLP 表位 25(SEQ ID NO:32)与人的同源体(SEQ ID NO:3)的多肽序列比较。

[0046] 图 8A 所示为犬 TSLP 基因的 DNA 序列(SEQ ID NO:1)。

[0047] 图 8B 所示为预测的由图 8A 所示 DNA 序列表达的 TSLP 多肽(SEQ ID NO:2)。星号标注了起始信号序列(氨基酸残基 1-28)的 N 末端,下划线标注的氨基酸残基 71-92(SEQ ID NO:118)表示一个域,从该域中确定了表 2 中相互重叠的表位 22-26。

[0048] 发明详述

[0049] 遗传过敏性皮炎(“AD”)是一种 Th2 介导的过敏性炎症性疾病。该病在病人和病犬

中显示出很多类似的临床特征。考虑到涉及皮肤损伤的细胞类型和细胞因子,犬 AD 的免疫发病机理很可能与人 AD 类似。

[0050] TARC 配体 (CCL22) 与 Th2 淋巴细胞上选择性表达的 CC 趋化因子受体 4 (CCR4) 的结合可诱导这些细胞向过敏性损伤选择性迁移。已有报道 TARC 及其受体 CCR4 在犬 AD 皮肤损伤中上调。既然 TSLP 是人 TARC 的强力诱导剂,我们假设 TSLP 可能在犬 AD 损伤中存在。因此在 AD 病犬的损伤皮肤上测试了抗人 TSLP 抗体。如图 4 所示,这些皮肤样品的免疫组织化学证实了损伤中存在与抗人 TSLP 抗体反应的抗原。然而,鼠和人 TSLP 基因的犬直向同源基因的鉴定工作特别困难,其原因如本文所公开的,在于哺乳动物中各物种的 TSLP 的核酸及氨基酸序列有高度差异。

[0051] 用本发明的一种 TSLP 和 / 或其一种或多种抗原片段免疫家犬,可降低内源 TSLP 的活性水平,并因此减轻、消除、和 / 或预防被免疫犬的一种或多种特异性症状,例如哮喘和 / 或遗传过敏性皮炎出现的症状。另外,犬 TSLP 蛋白可用作诱发抗犬 TSLP 抗体的抗原,这些抗体可用作家犬或其它哺乳动物的研究和 / 或诊断试剂。或者,在特定情况下,犬 TSLP 蛋白和 / 或编码犬 TSLP 的核酸可上调免疫损伤犬的免疫系统因子,例如通过造血细胞中 STAT 的活化或 TARC 的表达。

[0052] 为了更全面地了解本发明,提供以下定义。

[0053] 为描述方便而使用的单数术语绝非有意如此限制。因此,举例来说,提及一种组合物包含“一种多肽”,包括提及一种或多种这样的多肽。本文中使用的术语“大概”可与术语“大约”互换使用,表示数值与所述数值相差百分之二十以内,即一种包含“大概”50 个氨基酸残基的多肽可包含 40 到 60 个氨基酸残基。

[0054] 术语“结合组合物”系指与犬 TSLP 特异性结合的分子,例如在抗体 - 抗原反应中。特异性的内涵可大可小,例如仅限于一具体的实施方式、或限于相关的一组实施方式,例如犬 TSLP 和 / 或犬抗体。

[0055] 本文中使用的“犬”一词包括所有家犬,拉丁名 *Canis lupus familiaris* 或 *Canis familiaris*,除非另有说明。

[0056] 本文中使用的术语“多肽”可与术语“蛋白”和“肽”互换使用,系指包含 2 个或多个氨基酸由肽键连接而成的聚合体。本文中使用的“多肽”一词包括一种重要的片段或部分,并包含一段延长的氨基酸残基,其包含至少约 8 个氨基酸,通常至少约 12 个氨基酸,一般至少约 16 个氨基酸,优选至少约 20 个氨基酸,在特别优选的实施方式中,至少约 30 个氨基酸,例如 35、40、45、50 个等等。这种片段可在几乎所有位置上有开始和 / 或结束的末端,例如开始于氨基酸残基 1、2、3 等等,结束于 155、154、153 等等,包括所有实用的组合。

[0057] 多肽可任选缺少由基因或 mRNA 编码的某些氨基酸残基。举例来说,基因或 mRNA 可编码多肽 N 端的氨基酸残基序列 (即信号序列),该序列被切除掉,因此不是最终蛋白的一部分。

[0058] 本文中如果一段氨基酸序列与另一段氨基酸序列完全相同,则这两段氨基酸序列 100% “同源”,和 / 或仅因下文定义的中性或保守替换而不同。因此,如果一段氨基酸序列与另一端氨基酸序列约 80% 相同,则这两段氨基酸序列约 80% “同源”,和 / 或仅因中性或保守替换而不同。

[0059] 序列中的氨基酸残基通常可被功能相同的氨基酸残基替换,导致保守的氨基酸替

换。这种改变定义了本文中使用的术语“保守替换”。举例来说,序列中的一个或多个氨基酸残基可被另一个具有同样极性、相同功能的氨基酸替换,导致沉默改变。序列中氨基酸的替换者可选自该氨基酸所属种类中的其它成员。举例来说,非极性(疏水)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、和甲硫氨酸。含有芳香环结构的氨基酸有苯丙氨酸、色氨酸、和酪氨酸。中性极性的氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、和谷氨酰胺。带正电荷(碱性)的氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、和组氨酸。带负电荷(酸性)的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。这种改变不会影响聚丙烯酰胺凝胶电泳测定的表观分子量或者等电点。

[0060] 特别优选的保守替换有:赖氨酸替换精氨酸及相反,如此可保留一个正电荷;谷氨酸替换天冬氨酸及相反,如此可保留一个负电荷;丝氨酸替换苏氨酸,如此可保留一个自由羟基;以及谷氨酰胺替换天冬酰胺,如此可保留一个自由氨基。氨基酸也可分为下述类似组:(1) 脯氨酸、丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸、和苏氨酸;(2) 谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、天冬氨酸;(3) 组氨酸、赖氨酸、和精氨酸;(4) 半胱氨酸;(5) 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸;以及(6) 苯丙氨酸、酪氨酸、和色氨酸。

[0061] 在一相关的实施方式中,两种高度同源的 DNA 序列可通过其自身同源性或其所编码氨基酸的同源性进行鉴定。这种序列比较可用序列数据库的标准软件进行。在一具体的实施方式中,两种高度同源的 DNA 序列编码的氨基酸序列有约 80% 的同一性,优选有约 90% 的同一性,更优选有约 95% 的同一性。更具体地所,两种高度同源的氨基酸序列有约 80% 的同一性,优选约 90% 的同一性,更优选约 95% 的同一性。

[0062] 如本文中使用的,确定蛋白和 DNA 序列的同一性百分比可使用软件鉴定,例如 Accelrys 公司(Burlington, Massachusetts)出售的 MacVector v9,和 Clustal W 算法,应用默认的排列参数和默认的同源性参数。参见 Thompson, 等人.1994. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680。用于 Dos、Macintosh、和 Unix 平台的 ClustalW 可从例如欧洲分子生物学实验室(EMBL)、欧洲生物信息学研究所免费下载。本下载链接位于 <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>。这些和其它可用的程序还可以使用相同的或相似的默认参数来确定序列相似性。

[0063] “多核苷酸”或“核酸分子”系指包含核苷酸的分子,其包括但不限于 RNA、cDNA、基因组 DNA、甚至人工 DNA 序列。包括任何本领域已知的 DNA 和 RNA 的碱基类似物的核酸分子也可包含在上述术语中。

[0064] 本发明提供了可与编码本发明的 TSLP 蛋白的核苷酸序列杂交的核酸。当在合适的温度和溶液离子强度条件下,该核酸分子的单链形式可与另一核酸分子退火,一核酸分子“可杂交”于另一核酸分子,例如 cDNA、基因组 DNA、或 RNA, [参见 Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor L. I. (2000)]。

[0065] 高度严格的杂交条件对应于最高的 T_m , 例如 50% 甲酰胺、5X 或 6X SSC。杂交需要包含互补序列的两种核酸,虽然依赖于杂交的严格性,碱基错配仍然可能。合适的核酸杂交严格性依赖于核酸的长度和互补的程度,本领域熟知的变量。两种核苷酸序列的相似度或同源性越高,包含这些序列的核酸的杂交体的 T_m 值越高。核酸杂交的相对稳定性(相当于较高的 T_m) 以下述顺序递减:RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA。对于长度超过 100 个核苷酸

的杂交体,已经得到计算 T_m 的公式 (equations for calculating T_m have been derived strength) [参见 Sambrook and Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor L. I. (2000)]. 对于较短核酸即寡核苷酸的杂交, 错配的位置更为重要, 而寡核苷酸的长度决定了其特异性。

[0066] 可杂交的核酸的最小长度优选为至少约 12 个核苷酸; 更优选至少约 18 个核苷酸; 甚至更优选长度为至少约 24 个核苷酸; 最优选至少约 36 个核苷酸。在一特定的实施方式中, “标准杂交条件” 一词系指 T_m 55°C, 并应用上述条件。在另一特定的实施方式中, 严格的条件系指杂交和洗涤条件中分别为 T_m 65°C。

[0067] DNA “编码序列” 或者某具体蛋白或多肽的“编码序列”, 系指在合适的调控因子控制下, 可在体内或体外转录并翻译生成多肽的 DNA 序列。

[0068] 编码序列的范围由位于 5' 端的起始密码子和位于 3' 端的翻译终止密码子确定。编码序列可以包括但不限于原核序列、真核 mRNA 的 cDNA、真核 (例如哺乳动物) DNA 的基因组 DNA 序列、甚至合成 DNA 序列。转录终止序列通常位于编码序列的 3' 端。

[0069] “可操作的连接” 系指多因子的排列, 其中各组分被配置以执行其正常功能。因此, 可操作地与编码序列连接的调控因子能够影响编码序列的表达。调控因子并不需要与编码序列相连续, 只要它们起指示其表达的功能。因此, 举例来说, 未翻译的已转录序列可以存在于启动子和编码序列之间, 此时启动子仍可被认为与编码序列“可操作地连接”。

[0070] 本文中使用的“异源核苷酸序列” 系指一种核苷酸序列, 其通过重组方法添加至本发明的核苷酸序列, 从而形成非自然界天然形成的核酸。这种核酸可编码融合 (例如嵌合) 蛋白。因此异源核苷酸序列可编码包含调控和 / 或结构特性的多肽和 / 或蛋白。在另一此类实施方式中, 所述异源核苷酸序列可编码蛋白或多肽, 其可作为在重组核酸表达后可检测本发明的核苷酸序列编码的蛋白或多肽的工具。在另一实施方式中, 所述异源核苷酸序列可作为检测本发明的核苷酸序列的工具。异源核苷酸序列可包含非编码序列, 其包括限制性酶切位点、调控位点、启动子等等。

[0071] 本文中使用的术语“融合蛋白” 和“融合肽” 可互换使用并包含下列各词: “嵌合蛋白和 / 或嵌合肽”、以及融合“内含肽蛋白 / 肽”。融合蛋白包含本发明的一种犬 TSLP 蛋白的至少一部分, 其通过肽键与另一蛋白的至少一部分连接, 例如非犬 TSLP 蛋白的至少一部分, 和 / 或包含犬 TSLP 蛋白的两个或多个非连续部分的组合, 例如表位, 其在犬 TSLP 多肽中并不天然地处于相邻位置 (例如, 一种 10 个氨基酸残基的融合肽, 其包含由肽键连接的 SEQ ID NO: 2 的氨基酸残基 71-75 和 101-105)。在优选的实施方式中, 犬 TSLP 蛋白的各部分是有功能的, 例如保持抗原性。融合蛋白还可包含标记蛋白、或有助于本发明的犬 TSLP 蛋白的分离和 / 或纯化的蛋白 (例如 FLAG 标签, 参见下述实施例)、和 / 或抗原性。非犬 TSLP 序列可以氨基端或羧基端与犬 TSLP 序列连接。

[0072] 编码本发明的融合蛋白的重组 DNA 分子, 举例来说, 可包含编码非犬 TSLP 蛋白的至少一部分的一段序列, 其插入犬 TSLP 编码序列中, 并可进一步编码特定的蛋白酶, 例如凝血酶或 Xa 因子的酶切位点, 该位点优选位于或接近于犬 TSLP 序列和非犬 TSLP 序列的结合部。在一特定的实施方式中, 融合蛋白在原核细胞中表达。通过使用与犬 TSLP 融合的蛋白和 / 或标签特异性的亲和柱, 这种融合蛋白可用于分离本发明的犬 TSLP (参见下述实施例)。纯化的犬 TSLP, 举例来说, 可通过使用蛋白水解酶或上述酶切位点从融合蛋白中释放

出来。

[0073] “载体”或“复制载体”为一种复制子，例如质粒、病毒、噬菌体、或粘粒，另一 DNA 片段可附加或整合其中，以进行附加片段的复制。所述术语还包括一种复制子，其包括所整合或附加的感兴趣 DNA 片段。

[0074] 本发明中可使用的载体包括细菌质粒、病毒、噬菌体、可整合的 DNA 片段、以及其它可帮助核酸分子整合进宿主基因组的载体。质粒是最普遍使用的载体，但是所有其它具有同等功能的或本领域已知的载体都适用于本发明。[参见例如 Pouwels 等人, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985 及其补充, Elsevier, N.Y., 以及 Rodriguez 等人 (eds.), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, 1988, Butterworth, Boston, MA.]

[0075] 当 DNA 和载体末端都包含合适的限制性酶切位点时，编码新的犬 TSLP 蛋白的 DNA 可以容易地插入载体。如果不能做到，可能需要修饰 DNA 和 / 或载体的末端，方法为消化掉限制性内切酶裂解产生的单链 DNA 突出端以产生钝末端，或者用合适的 DNA 聚合酶填补单链末端以达到同样的结果。或者，例如通过在末端上连接核苷酸序列（连接子）来产生所需位点。这种连接子可包含特定的确定所需限制性酶切位点的寡核苷酸序列。限制性酶切位点还可通过聚合酶链反应 (PCR) 产生。参见，例如 Saiki 等人, *Science* 239 :487 (1988)。如果需要，裂解过的载体和 DNA 片段也可用同聚物加尾修饰。

[0076] 本发明中使用的重组表达载体一般为自我复制的 DNA 或 RNA 结构，其包含编码本发明的犬 TSLP 蛋白和 / 或其抗原片段的核酸，该核酸通常可操作地与合适的基因调控因子连接，这些因子能在合适的宿主细胞中调控核酸的表达。基因调控因子可包括原核启动子系统或真核启动子表达控制系统，一般包括转录启动子、可选的控制转录开始的操纵子、提高 mRNA 表达水平的转录增强子、编码合适的核糖体结合位点的序列、以及终止转录和翻译的序列。表达载体还可包含复制起点，其允许载体独立于宿主细胞进行复制。

[0077] 编码新的犬 TSLP 蛋白的核酸表达可通过常规方法在原核或真核细胞中进行。

[0078] “宿主细胞”系指临时性或永久性包含或能够包含、并表达外源核酸分子的细胞。当这种外源 DNA 已被引入细胞膜内，则该细胞已被外源 DNA“转化”。外源 DNA 可整合或不整合（共价结合）入构成细胞基因组的染色体 DNA。举例来说，在原核生物和酵母中，所述外源 DNA 可保持在游离因子上，例如质粒。对真核细胞来说，稳定的转化细胞是其中外源 DNA 整合到染色体中，因此可以通过染色体复制遗传到子细胞中的细胞。这种稳定性表现在真核细胞可以建立细胞系或克隆的能力，其包含一群含有外源 DNA 的子细胞。

[0079] 原核生物包括革兰氏阴性和阳性生物，例如 *E. coli* 和枯草杆菌 (*B. subtilis*)。真核细胞包括来源于动物细胞的已建立的组织培养细胞系，可来自非哺乳动物如昆虫细胞和鸟类，和来自哺乳动物如人、灵长动物、以及啮齿动物。

[0080] 原核宿主-载体系统包括用于很多不同物种的多种载体。用于扩增 DNA 的载体包括 pBR322 及其多种衍生物，或 pET42b(+) 表达载体 (Novagen)。

[0081] 通常使用的原核表达调控序列包含启动子，其包括源自 β -内酰胺酶 (β -lactamase) 和乳糖启动子系统的启动子 [Chang 等人, *Nature*, 198 :1056 (1977)], 例如 pUC 系列，源自色氨酸 (*trp*) 启动子系统的启动子 [Goeddel 等人, *Nucleic Acids Res.* 8 :4057 (1980)], 例如 pBR322-*trp*，源自 lambda PL 启动子系统的启动子 [Shimatake

等人, Nature, 292 :128(1981)], lambda-pP 或 pR 启动子 (pOTS), 阿拉伯糖诱导的启动子 (InVitrogen), tac 启动子 [De Boer 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 292 :128(1983)], Ipp 启动子 (pIN 系列); 或者杂交启动子, 例如 ptac (pDR540)。许多包含这种调控序列的其它表达载体是本领域已知的, 并有商业出售。[也参见 Brosius 等人, "Expression Vectors Employing Lambda-, trp-, lac-, and Ipp-derived Promoters", in Rodriguez and Denhardt (eds.) Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, 1988, Butterworth, Boston, pp. 205-236]。

[0082] 适用于 E. coli 的等效的载体, 其可用于其它原核生物, 也可用来表达本发明的 TSLP 蛋白。

[0083] 酵母以及高等真核组织培养细胞也能用作重组生产的宿主, 用来生产新的犬 TSLP 蛋白、和 / 或抗犬 TSLP 抗体、和 / 或这些抗体的片段。虽然可以使用任何高等真核组织培养细胞系, 包括昆虫杆状病毒表达系统, 但哺乳动物细胞是优选的。此类细胞的转化或转染以及增殖已经成为常规例行程序。有用的细胞系实例包括人子宫颈癌传代细胞 (HeLa 细胞)、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系、幼大鼠肾 (BRK) 细胞系、昆虫细胞系 (例如 SF9), 鸟类细胞系 (例如 DF-11)、Madin-darby 牛肾 (MDBK) 细胞、Madin-Darby 犬肾 (MDCK) 细胞系、非洲绿猴肾异倍体细胞 (Vero 细胞)、HEK-293 细胞系以及猴 (COS) 细胞系。

[0084] 用于此类细胞系的表达载体通常包括, 举例来说, 复制起点、启动子、翻译起始点、RNA 剪切位点 (如果使用基因组 DNA)、多腺苷酸位点、以及转录终止点。这些载体通常还包含选择基因或扩增基因。合适的表达载体可以是包含启动子的质粒、病毒、或逆转录病毒, 其启动子来源于, 例如腺病毒、SV40、细小病毒、牛痘病毒、或巨细胞病毒。合适的表达载体的典型实例包括 **pCR[®]3.1**、pCDNA1、pCD [Okayama 等人, Mol. Cell Biol. 5 :1136(1985)]、pMC1neo Poly-A [Thomas 等人, Cell 51 :503(1987)]、pUC19、pREP8、pSVSPORT 及其衍生物、以及杆状病毒载体, 例如 pAC 373 或 pAC 610。

[0085] 表达以后, 新的犬 TSLP 可根据本领域的标准程序进行纯化, 包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱色谱等等 (参见 R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N. Y. (1982))。药用中优选的是至少约 90% 到 95% 同质化的几乎完全纯的组合物, 最优选的是 98% 到 99% 或更高的同质化。纯化可以是部分的, 或直至所需的同质化。如果犬 TSLP 用于治疗, 该蛋白几乎完全不能含有内毒素。用结合抗 TSLP 抗体的纯化柱或结合 TSLP 受体的纯化柱选择性纯化表达的 TSLP, 是获取高纯度犬 TSLP 蛋白的可用策略。

[0086] 纯化的方法本领域熟知。举例来说, 纯化核酸可用沉淀、色谱、超速离心以及其它方法。纯化蛋白和多肽以及肽可用多种方法, 其包括但不限于, 制备圆盘凝胶电泳、等电子聚焦、高效液相色谱 (HPLC)、反向 HPLC、凝胶过滤、离子交换与分配色谱、沉淀与盐析色谱、提取与反流分布。在某些方面, 优选在重组系统中生产多肽, 使蛋白包含有助于纯化的额外序列标签, 例如但不限于, 多组氨酸序列、或特异性与抗体结合的序列, 例如 **FLAG[®]** 和 GST。如此则多肽可在合适的固相基质上用色谱从宿主细胞的粗裂解液中纯化。或者, 多肽的抗体或其结合片段可用作纯化试剂。

[0087] 溶剂和电解质通常为用来保持生物活性的生物相容缓冲液, 并通常近似于生理水溶剂。通常溶剂的 pH 为中性, 通常在 5 到 10 之间, 优选约 7.5。某些情况下, 要加入一种或多种去污剂, 通常是温和的不导致变性的, 例如 CHS (胆甾醇半琥珀酸酯) 或 CHAPS (3-[3-胆

固醇氨丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸),或者浓度足够低以免严重影响所述蛋白的结构或生理特性。在其它情况下,强烈的表面活性剂可用来进行强烈变性。

[0088] 另一选择是,来源于 E. coli 或其它细菌的异源功能蛋白可通过强变性剂增溶和随后重新折叠的方法从包涵体中分离。本领域已知的变性剂包括,简单举例来说,尿素、硫氰酸钾、盐酸胍 (“GuHCl”)、碘酸钾、和 / 或碘化钠,以及这些试剂的组合。优选 GuHCl 被用作还原剂,例如浓度约 6 到 8M,在碱性条件下,例如约 pH8。或者使用另一种还原剂,二硫苏糖醇 (“DTT”),可以单独使用或与 GuHCl 组合使用。如果使用 DTT,其浓度范围,简单举例来说,从约 50mM 到约 0.5mM DTT。本领域已熟知,在增溶步骤中必须有还原剂来切断或变性二硫键。一种典型的还原缓冲液为:0.1M Tris(三羟甲基氨基甲烷)pH8.0,6M 胍,2mM EDTA(乙二胺四乙酸),和 0.3M DTE(二硫赤藓醇)。

[0089] 通常在氧化剂存在下将变性与还原的蛋白稀释(例如 100 倍)到重新折叠缓冲液可完成复性。可以使用任何合适的本领域已知的氧化剂,只要其允许理想产量的正确折叠。举例来说,还原和氧化形式的低分子量硫醇试剂可以进行氧化和重新折叠,如 Saxena, 等人,1970, Biochemistry 9:5015-5021 中所述,该文合并到本文中作为参考,并特别如 Buchner, 等人(引文同上)所述。通常将变性与还原的蛋白稀释(例如 100 倍)到重新折叠缓冲液可完成复性。一种典型的重新折叠缓冲液为:Tris HCl 100mM, pH10.0, 25mMEDTA, NaCl 0.1M, GSSG 551mg/L, 0.5M 精氨酸。GSSG 为氧化形式的谷胱甘肽。

[0090] 多肽的大小和结构通常应处于相当稳定的状态,并且通常不处于变性的状态。多肽可与其它多肽在四级结构中结合,例如可增加溶解度,或与脂类或去污剂结合。

[0091] 几乎完全纯,例如描述蛋白的上下文中,通常表示该蛋白不含其它污染的蛋白、核酸、或其它源于有机物来源的其它生物制品。纯度可通过标准方法测定,通常依据重量,普通的至少约 40% 纯,一般至少约 50% 纯,经常至少 60% 纯,通常至少 80% 纯,优选至少 90% 纯,在最优选的实施方式中至少 95% 纯。通常添加载体或赋形剂。纯度可通过下列方法评估:色谱、凝胶电泳、免疫测定、成分分析、生物测定、以及其它本领域已知的方法。从功能方面看,根据本发明的分离的犬 TSLP 蛋白与其它物质充分分离,包括前体犬 TSLP 蛋白和 / 或成熟的犬 TSLP 蛋白,因此能够诱发犬 TSLP 蛋白特异性的免疫应答。

[0092] 多肽或片段的可溶性取决于环境和多肽本身。很多参数影响多肽可溶性,包括温度、电解质环境、多肽大小和分子特性、以及溶剂的性质。通常所用多肽的温度在约 4°C 到约 65°C 之间。一般温度高于约 18°C。进行诊断时,温度一般为室温或更高,但是低于方法中各成分的变性温度。进行治疗时,温度一般为体温,通常约 36°C 到 40°C(例如狗约 39°C),在某些情况下温度可能在原位或体外升高或降低。

[0093] 本文中使用的具体蛋白的“抗原片段”一词,系指该蛋白的一种片段(包括仅比全长蛋白少一个氨基酸的大片段),其具有抗原性,即能够特异性地与免疫系统的抗原识别分子反应,例如免疫球蛋白(抗体)或 T 细胞抗原受体。举例来说,本发明的犬 TSLP 的抗原片段是犬 TSLP 的具有抗原性的片段。只要这种片段与用于免疫的载体分子结合后能用来产生 TSLP 蛋白的抗体,其不须具有自身免疫原性,即在无载体的情况下诱发免疫应答。

[0094] 在一具体的实施方式中,犬 TSLP 的抗原片段包含 5 到 150 个氨基酸残基。在一具体的实施方式中,犬 TSLP 的抗原片段包含多于 120 个氨基酸残基。在另一实施方式中,犬

TSLP 的抗原片段包含 10 到 120 个氨基酸残基。在另一实施方式中,犬 TSLP 的抗原片段包含 20 到 100 个氨基酸残基。在另一实施方式中,犬 TSLP 的抗原片段包含 25 到 75 个氨基酸残基。

[0095] 犬 TSLP 的抗原片段可从重组来源、天然来源中分离的蛋白、或化学合成得到。此外,抗原片段可从下列途径得到:犬 TSLP 或其片段的水解消化、重组表达、或者从头产生,例如通过肽合成。

[0096] 疫苗

[0097] 本发明进一步提供了疫苗,这些疫苗包含有效量的下列各项:本发明的 TSLP 蛋白、该蛋白的一种或多种抗原片段、或者上述全长蛋白与一种或多种上述片段的组合。举例来说,犬 TSLP 蛋白和 / 或其片段,如下述表 2 中所列举,可整合进任何蛋白或肽相容的疫苗组合物。此类疫苗组合物是本领域熟知的,可以但并不必须包括,例如生理上适合的缓冲液和生理盐水等等,以及药学上可接受的佐剂,例如 **CARBOPOL[®]** 或 **Emulsigen[®]**。

[0098] 必要时,疫苗组合物可用来在实验犬体内诱导内源性抗 TSLP 抗体,例如为了治疗与实验犬体内 TSLP 活性下调有关的疾病或病症的临床症状。另外,或与之相关的,本发明的疫苗也可用来诱发筛选和 / 或鉴定犬 TSLP 的抗血清,例如作为鉴定过量表达 TSLP 犬的试剂盒的成分。

[0099] 如下述表 2 中公开的 TSLP 肽及其变体可用作免疫原,可单独或以多种组合使用。此类肽可通过化学或重组 DNA 技术任选互相连接和 / 或与作为载体的大蛋白连接。载体可增强作为免疫应答目标的宿主动物对多肽的识别,并增加 TSLP 多肽的免疫原性。很多载体是本领域已知的,包括破伤风类毒素或无毒的破伤风毒素 C 片段、白喉类毒素、PhoP 蛋白、钥孔虫凝集素 (KLH)、 β 牛乳糖、源于 1 型牛疱疹病毒 (BHV-1) 的 gD 蛋白、源于狂犬病毒的 G 蛋白、源于犬瘟热病毒的 F 蛋白、以及合成载体,例如用已知的“通用”T 细胞表位聚合而成的载体。

[0100] 使用已知的算法,可用作免疫原的 TSLP 多肽可从下述表 2 中的多肽及其变体中选择出来,这些算法评估如下特性:天然 TSLP 蛋白的表面可达性、亲水性、原子迁移率、以及抗原性。表 2 中多肽及其变体的表位也可基于其与下列抗体的反应活性进行选择:与天然 TSLP 蛋白反应的抗体、特别是能够中和 TSLP 生物活性的抗体。此类抗原可包括用标准肽合成技术从本文所公开的序列中制备的合成肽,和 / 或或者从重组或天然 TSLP 蛋白得到的片段。

[0101] 本发明的药学上可接受的佐剂可从多种来源获得,其包括天然来源、重组来源和 / 或化学合成等等。作为佐剂的化合物实例包括但不限于,铝化合物、可代谢和不可代谢的油、嵌段共聚物、ISCOM' s (免疫刺激复合物)、维生素和矿物质 (包括但不限于:维生素 E、维生素 A、硒、以及维生素 B12)、和 Quil A (皂苷)、弗氏完全佐剂、以 **CARBOPOL[®]** 商标出售的丙烯酸与聚烯基醚或二乙烯基乙二醇交联的聚合物 (例如 **CARBOPOL[®] 941**)、以及在水乳胶中均匀分散的微米级油滴 (例如以商标 **Emulsigen[®]** 出售的)。另外一些佐剂的实施例有时候特指免疫刺激物,其包括细菌或真菌细胞壁成分 (例如脂多糖、脂蛋白、糖蛋白、胞壁肽、 β -1,3/1,6- 葡聚糖)、源于植物的多种复合糖 (例如多聚糖、乙酰化甘露聚糖)、源于动物的多种蛋白和多肽 (例如激素、细胞因子、共刺激因子)、以及源于病毒和

其它来源的新核酸分子（例如双链 RNA、CpG）。另外，上述各项的各种组合可提供佐剂作用，因此可构成本发明的佐剂。

[0102] 本发明的疫苗可通过以下任何途径施用：肌肉注射、皮下注射、静脉注射、皮内注射、口服、鼻腔给药、以及上述方法的组合。

[0103] 抗体

[0104] 本发明还包括与新的犬 TSLP 蛋白特异性结合的多克隆和单克隆 (mAb) 抗体。如本文中使用的，“抗体”一词系指免疫球蛋白和 / 或其片段。天然存在的免疫球蛋白包含实质上由免疫球蛋白基因编码的一个或多个多肽。已知的免疫球蛋白基因包括 kappa、lambda、alpha、gamma、delta、epsilon 和 mu 恒定区基因，以及大量免疫球蛋白可变区基因。根据本发明的抗体也包含抗体片段，即抗原结合片段，例如 Fv、Fa、和 F(ab')₂，改造的单链结合蛋白，参考 Huston 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. ,85,5879-5883(1988) 和 Bird 等人，Science,242,423-426(1988)（合并到本文中作为参考），以及双功能杂交抗体（参考 Lanzavecchia 等人，Eur. J. Immunol. 17,105(1987)）。参见 Hood 等人，Immunology,Benjamin,N. Y. ,2nd ed. (1984),Harlow and Lane,Antibodies. A Laboratory Manual, Cold SpringHarbor Laboratory(1988) 和 Hunkapiller and Hood, Nature,323,15-16(1986)，全部合并到本文中作为参考。

[0105] 举例来说，以标准方法用新的犬 TSLP 蛋白免疫的动物中产生的血清可直接使用，也可用标准方法从血清中分离出 IgG 组分，例如用血浆去除术或采用 IgG 特异性吸附剂的吸附色谱，例如固定化蛋白 A 或蛋白 G。或者，可制备单克隆抗体，和任选源于此类单抗的抗原结合片段或重组结合蛋白。此类单抗或其片段可用本领域已知的方法或者直接修饰来分别进行人源化或犬源化。

[0106] 如本文中使用的，一种“表位特异性的”犬 TSLP 抗体是一种抗犬 TSLP 的一种片段的抗体，该抗体包含一种表位，其包含一个或多个下列 5 氨基酸序列：SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33 和 SEQ ID NO :34；该抗体进一步结合一种蛋白，其包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列，和 / 或一种蛋白，其包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列，但不包括 28 个氨基酸残基的信号序列。在一具体的实施方式中，表位特异性的犬 TSLP 抗体是一种单克隆抗体。

[0107] 选择性结合本发明的犬 TSLP 蛋白的产自杂交瘤的单抗是用熟知的技术生产的。通常所述过程涉及永久细胞系与生产所需抗体的 B 淋巴细胞的融合。或者，也可使用产生永久抗体生产细胞系的非融合技术，例如病毒诱导转化 [Casali 等，Science 234 :476(1986)]。永久细胞系通常转化哺乳动物细胞，尤其是啮齿类、牛、和人源的骨髓瘤细胞。出于方便和可用性考虑，最经常使用的是大鼠和小鼠的骨髓瘤细胞。

[0108] 从注射抗原的哺乳动物中获得生产抗体的淋巴细胞的技术是熟知的。如果使用人源细胞通常使用外周血淋巴细胞 (PBLs)，或者使用非人哺乳动物来源的脾或淋巴结细胞。宿主动物被注射多剂量的纯化的抗原（人细胞在体外致敏），则该动物可产生所需的生产抗体细胞，以供收获用于与永久细胞系的融合。融合技术也是在本领域熟知的，通常涉及将细胞与融合剂混合，例如聚乙二醇。

[0109] 杂交瘤用标准程序选择，例如 HAT（次黄嘌呤 - 氨基嘌呤 - 胸腺嘧啶脱氧核苷）选择。分泌所需抗体的杂交瘤用标准免疫分析选择，例如蛋白印迹法、ELISA（酶联免疫吸附

法)、RIA(放射性免疫分析)等等。抗体用标准蛋白纯化技术从培养基中回收 [Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays(Elsevier, Amsterdam, 1985)]。

[0110] 很多参考文献可对应用上述技术提供指导 [Kohler 等人, 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)]。单克隆抗体还可用熟知的噬菌体文库系统生产。[参见 Huse, 等人, Science 246: 1275(1989); Ward, 等人, Nature, 341: 544(1989)]。

[0111] 如此生产的抗体, 无论多克隆还是单克隆, 可被用于, 例如用熟知的方法以固定形式结合于固体载体, 通过免疫亲和色谱纯化犬 TSLP 蛋白。

[0112] 未标记的或用标准方法标记的抗犬 TSLP 蛋白的抗体也可用作定性或定量检测犬 TSLP 蛋白的免疫分析的基础。具体使用的标记物取决于免疫分析的类型。可使用标记物的实例包括但不限于, 放射性同位素标记, 例如 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{14}C ; 荧光标记, 例如荧光素以及衍生物、若丹明及其衍生物、丹酰和伞形酮; 化学发光剂, 例如虫荧光素和邻苯二甲酰肼; 以及酶, 例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、溶菌酶、和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶。

[0113] 抗体可用上述标记物通过已知方法标记。举例来说, 用荧光剂、化学发光剂、或酶标记抗体时可使用偶联剂, 例如乙醛、碳二亚胺、双马来酰亚胺、亚氨酸酯、琥珀酰亚胺、双重氯化联苯胺等等。涉及的常规方法本领域熟知, 如下所述, 考例如 Immunoassay: A Practical Guide, 1987, Chan (Ed.), Academic Press, Inc., Orlando, FL。此类免疫分析可在, 例如, 受体纯化所得馏分中应用。

[0114] 本发明的抗体还可用于鉴定在表达克隆系统中表达犬 TSLP 蛋白的特定 cDNA 克隆。受体配基结合位点特异性的中和抗体还可用作阻断或下调犬 TSLP 蛋白功能的拮抗剂(抑制剂)。此类中和抗体可通过常规实验容易地鉴定。

[0115] 犬 TSLP 蛋白活性的拮抗可用完整的抗体分子、或熟知的抗原结合片段如 Fab、Fc、F(ab)₂、和 Fv 片段完成。此类片段的定义如上文所述, 或参考例如 Klein, Immunology (John Wiley, New York, 1982); Parham, Chapter 14, in Weir, ed. Immunochemistry, 第 4 版. (Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 1986)。抗体片段的使用和生产在下列文献描述: 例如 Fab 片段 [Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays(Elsevier, Amsterdam, 1985)], Fv 片段 [Hochman 等人, Biochemistry 12: 1130(1973); Sharon 等人, Biochemistry 15: 1591(1976); Ehrlich 等人, 美国专利第 4, 355, 023 号], 以及抗体半分子 (Auditor-Hargreaves, 美国专利第 4, 470, 925 号)。进一步描述基于已知的抗体重链和轻链可变区序列制备重组 Fv 片段的方法, 例如 Moore 等人 (U. S. Patent No. 4, 642, 334) 和 Plückthun [Bio/Technology 9: 545(1991)]。或者, 也可用标准方法化学合成。

[0116] 本发明还包含多克隆和单克隆抗独特型抗体, 其用上述抗体作为抗原来生产。这些抗体的作用在于其可以模拟配基的结构。

[0117] 产自非犬哺乳动物或非犬杂交瘤系统的抗体可任选进行改造, 以使其在注射给犬时几乎无抗原性, 即其可犬源化。改造产自动物的单克隆抗体以使其在治疗施用给人

时降低免疫原性（人源化）的方法已被积极探索，并在很多文献中描述 [例如 *Antibody Engineering: A practical Guide*, Carl A. K. Borrebaeck ed. W. H. Freeman and Company, 1992; Reichman, L. 等人, " Reshaping human antibodies for therapy", *Nature* **332**: 323-327 (1988)]。或者，产自非犬哺乳动物的单克隆抗体，例如小鼠单克隆抗体，可与犬抗体或其序列产生嵌合抗体，其对受体宿主来说，比标准鼠单克隆抗体的免疫原性降低。参见例如，美国专利第 5, 593, 861 号，“犬 - 小鼠异源杂交瘤和编码犬免疫球蛋白恒定区的基因片段”，合并到本文中作为参考。

[0118] 另外，Wasserman 和 Capra [Biochem. **16**:3160 (1977)] 确定了犬 IgM 和犬 IgA 重链可变区的氨基酸序列。他们进一步确定了犬 IgA kappa 轻链的氨基酸序列 [Wasserman and Capra, *Immunochem.* **15**:303 (1978)]。McCumber 和 Capra [Mol. Immunol. **16**:565 (1979)] 公开了犬 mu 链的氨基酸全序列。Tang 等人 [Vet. Immunology Immunopathology **80**:259 (2001)] 公开了一种犬 IgG-A gamma 链 cDNA 和 4 种犬 IgG-A gamma 链蛋白序列。Tang 等人（引文同上）进一步描述了犬脾 cDNA 文库的 PCR 扩增，其使用了根据人、小鼠、猪、和牛 IgG 保守区设计的变性寡核苷酸引物。此外，Krah 等人（美国专利公开号 20040181039，公开于 2004 年 9 月 16 日，合并到本文中作为参考）详细描述了非犬抗体犬源化的一种过程。

[0119] 犬 TSLP 基因的分离

[0120] A. 初步尝试

[0121] 鉴定犬 TSLP 的初步尝试基于克隆的人和小鼠 cDNA 序列与大鼠、黑猩猩、和恒河猴 cDNA 序列的序列比较，这些序列从 BLAT（公共基因组数据库，加利福尼亚大学圣克鲁兹分校）收集。黑猩猩 TSLP 与人 TSLP 在氨基酸水平上 100% 相同，而恒河猴 TSLP 在成熟蛋白上与人 TSLP 超过 90% 同源性（12/151 氨基酸残基差异）。然而，人和非人灵长类动物 TSLP 蛋白和 cDNA 序列与鼠 TSLP 序列有很大差异。人和小鼠 TSLP cDNA 序列只有 43% 同源性，不能通过这些物种之间的低严格性跨种杂交进行克隆。此外，与小鼠 TSLP 比较，大鼠 TSLP 序列在成熟蛋白的氨基酸序列中有 39/121 差异，提示甚至在近缘的鼠类物种之间，TSLP 序列也有显著差异。

[0122] 遗憾的是，如本文所公开的，犬 TSLP 序列也与所有这些不同的鼠类和相似的灵长类序列有差异。因此，通过低严格性跨种杂交获得犬 TSLP 是不成功的。实际上，根据人、小鼠、大鼠、和猴序列信息设计的尝试用巢式 PCR 策略克隆犬 TSLP 直向同源基因的引物没能确定甚至一条与犬 TSLP 对应的条带。

[0123] B. 成功分离犬 TSLP 基因

[0124] 用人 TSLP 序列搜索可供收集的犬基因组数据库（源于全基因组鸟枪测序；由加利福尼亚大学圣克鲁兹分校提供给公众）部分确定了犬 TSLP 外显子 1 和 4。简单地说，在此初步搜索中确定了多个显著序列同源性的搜索结果（参加下述“搜索结果”1-6）。其序列被集中并用作查询条件来延伸和组装犬 TSLP 基因的部分电子序列。

[0125] 搜索结果 1

[0126] 评分 = 60.8 字节 (146), 期望值 = 1e-08

[0127] 同一性 = 33/58 (56%), 阳性 = 39/58 (67%), 缺口 = 1/58 (1%)

[0128] Query :7 LYVLSVS-FRKIFILQLVGLVLTVDFTNCFEIKAAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEF

63

- [0129] L + SVS FRKIF+LQLVGLVLTy+F +CDFEKI+Y I + L YM G F
- [0130] Sbjct :26 LIICSVSVFRKIFVLQLVGLVLTYNFIDCDFEKIRWKYQEVIYQALEKYMDGVSE * TF
199
- [0131] SEQ ID NO :102 :人 TSLP
- [0132] SEQ ID NO :103 > gi|36323560|gb|AACN010632090.1 | 家犬
- [0133] ctg19866851299046,全基因组鸟枪序列长度 = 1007
- [0134] 搜索结果 2
- [0135] 评分 = 59.7 字节 (143),期望值 = 3e-08
- [0136] 同一性 = 30/42(71%),阳性 = 33/42(78%)
- [0137] 框 = -1
- [0138] Query :117 QINATQAMKKRRKRKVTTNKCLEQVSQLQGLWRRFNRPLLKQ 158 (SEQ ID NO :
104)
- [0139] QIN TQA KKR+KR VTTNKC EQV +L GLWRRF+R KQ
- [0140] Sbjct :588 QINNTQAKKKRKRKRGVTTNKCREQVAHLIGLWRRFSRIS * KQ 463 (SEQ ID NO :
105)
- [0141] SEQ ID NO :104 :人 TSLP
- [0142] SEQ ID NO :105 > gi|36314527|gb|AACN010674832.1 家犬
- [0143] ctg19866851282529,全基因组鸟枪序列长度 = 963
- [0144] 搜索结果 3
- [0145] 评分 = 42.0 字节 (97),期望值 = 0.006
- [0146] 同一性 = 21/44(47%),阳性 = 27/44(61%)
- [0147] 框 = -2
- [0148] Query :76 LTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQIN 119 (SEQ ID
NO :106)
- [0149] L I+ LT + GCAS A+E FA T AALA CPGY+ ++
- [0150] Sbjct :369 LARIERLTLHRIRGCASGAREFAEGTVAALAAECPGYAAAAPVS 238 (SEQ ID
NO :107)
- [0151] SEQ ID NO :106 :人 TSLP
- [0152] SEQ ID NO :107 > gi|36442813|gb|AACN011084208.1 | 家犬
- [0153] ctg19866851499233,全基因组鸟枪序列长度 = 370
- [0154] 搜索结果 4
- [0155] 评分 = 38.9 字节 (89),期望值 = 0.047
- [0156] 同一性 = 15/32(46%),阳性 = 22/32(68%)
- [0157] 阅读框 = +1
- [0158] Query :87 TAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQI 118 (SEQ ID NO :108)
- [0159] T GC AKE A+ AL++WCPG+++TQ+
- [0160] Sbjct :178 TPGCGICAKEAAAALGWFCALSVWCPGWAQTQV 273 (SEQ ID NO :109)
- [0161] SEQ ID NO :108 :人 TSLP
- [0162] SEQ ID NO :109 > gi|36211043|gb|AACN010354273.1 | 家犬

- [0163] ctg19866851087147,全基因组鸟枪序列长度 = 1369
- [0164] 搜索结果 5
- [0165] 评分 = 42.0 字节 (97),期望值 = 0.006
- [0166] 同一性 = 21/44(47%),阳性 = 27/44(61%)
- [0167] 阅读框 = -2
- [0168] Query :76 LTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQIN 119 (SEQ ID NO :110)
- [0169] L I+ LT + GCAS A+E FA T AALA CPGY+ ++
- [0170] Sbjct :369 LARIERLTLHRIRGCASGAREFAEGTVAALAAECPGYAAAPVS 238 (SEQ ID NO :111)
- [0171] SEQ ID NO :110 :人 TSLP
- [0172] SEQ ID NO :111 > gi|36211043|gb|AACN010354273.1|家犬
- [0173] ctg19866851087147,全基因组鸟枪序列长度 = 1369
- [0174] 搜索结果 6
- [0175] 评分 = 38.9 字节 (89),期望值 = 0.047
- [0176] 同一性 = 15/32(46%),阳性 = 22/32(68%)
- [0177] 框 = +1
- [0178] Query :87 TAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQI 118 (SEQ ID NO :112)
- [0179] T GC AKE A+ AL++WCPG+++TQ+
- [0180] Sbjct :178 TPGCGICAKEGWFCALSVWCPGWAQTQV 273 (SEQ ID NO :113)
- [0181] SEQ ID NO :112 :人 TSLP
- [0182] SEQ ID NO :113 > gi|36211043|gb|AACN010354273.1|家犬
- [0183] ctg19866851087147,全基因组鸟枪序列长度 = 1369
- [0184] 这个电子构建的序列与人、猴、大鼠、和小鼠 TSLP 的比较显示保守的内含子 / 外显子边界和基本的序列同一性,确定此序列为犬 TSLP 直向同源基因的一部分。基于此发现随后设计 PCR 引物并用于扩增该基因的缺失部分。通过双重巢式 PCR 从犬活化的外周血单核细胞 (PBMC) cDNA 文库中获得 2 个部分重叠的克隆。通过巢式 PCR 获得完整犬 TSLP cDNA 的进一步尝试或向 5' 或 3' 端延伸序列的尝试都没有成功。然而,用这些克隆中的延伸序列信息在犬全基因组鸟枪序列数据 (加利福尼亚大学圣克鲁兹分校) 中进行反复的数据库搜索,结合从此数据库中人工组装原始 DNA 序列,得到电子组装的全长犬 TSLP cDNA。在体外用 DNA 合成仪合成此 cDNA 序列的实际克隆。
- [0185] 综上所述,用现有的和最新的分子克隆技术不可能直接从人、小鼠、大鼠、或猴序列中得到犬 TSLP 序列。只有用收集的人、小鼠、大鼠、和非人灵长类 (NHP) TSLP 基因进行复杂的反复的数据库搜索,利用基因组数据库中的内含子 / 外显子边界分配和序列同一性,结合分子 PCR 克隆技术,才能确定编码犬 TSLP 的基因。
- [0186] 一旦得到,所述犬 TSLP 与成熟的人 TSLP 蛋白的氨基酸序列相比较有 58/132 的差异 (61% 同一性),与成熟的小鼠 TSLP 蛋白的氨基酸序列相比较有 83/129 的差异 (33% 同一性) (参见下述)。
- [0187] 家犬与人 TSLP 成熟蛋白序列比较

- [0188] TSLP_CF(家犬) 长度 141 (1..141)
- [0189] TSLP_H(人) 长度 145 (1..145)
- [0190] 评分 = 167 字节 (423), 期望值 = 1e-40
- [0191] 同一性 = 85/139 (61%), 阳性 = 101/139 (72%)
- [0192] Query :1 RKIFVLQLVGLVLTYNFIDCFEKIRWKYQEVIIYQALEKYMDGTRSTEFSHPVYCANPP
D 60
- [0193] RKIF+LQLVGLVLTYP+F +CDFEKI+ Y I + L YM GT+STEF++V C+N P
- [0194] Sbjct :1 RKIFILQLVGLVLTYPDFTNCFEKIKAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEFNNTVSCSNRP
H 60
- [0195] Query :61 CLARIERLTLHRIRGCASGAREFAEGTVAALAAECPGYAAAPINNTQAKKKRKKRGVT
T 120
- [0196] CL I+ LT + GCAS A+E FA T AALA CPGY+ IN TQA KKR+KR VTT
- [0197] Sbjct :61 CLTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKKRRRKRKVT
T 120
- [0198] Query :121 NKCREQVAHLIGLWRRFSR 139 (SEQ ID NO :114)
- [0199] NKC EQV+ L GLWRRF+R
- [0200] Sbjct :121 NKCLEQVSQQLGLWRRFN 139 (SEQ ID NO :115)
- [0201] SEQ ID NO :114 :家犬 TSLP
- [0202] SEQ ID NO :115 :人 TSLP
- [0203] 家犬与鼠 TSLP 成熟蛋白序列比较
- [0204] TSLP_CF(家犬) 长度 141 (1..141)
- [0205] TSLP_M(鼠) 长度 136 (1..136)
- [0206] 评分 = 72.0 字节 (175), 期望值 = 7e-12
- [0207] 同一性 = 46/138 (33%), 阳性 = 67/138 (48%), 缺口 = 8/138 (5%)
- [0208] Query :1 RKIFVLQ-LVGLVLTYNFIDCFEKIRWKYQEVIIYQALEKYMDGTRSTEFSHPVYCANP
P 59
- [0209] R +F+LQ LV + LTYNF +C+F I Y +I+ L + G + + C + P
- [0210] Sbjct :1 RSLFILQVLVRMGLTYNFSNCNFTSITKIYCNIIFHDLTGDLKGAKFEQIED---
- [0211] CESKP 57
- [0212] Query :60 DCLARIERLTLHRIRGCASGAREFAEGTVAALAAECPGYAAAPINNTQAKKKRKKRGV
T 119
- [0213] CL +IE TL+ I GC S + FA T AL CPGY N+ + ++
- [0214] Sbjct :58 ACLLKIEYYTLNPIPGCPSLPDKTFARRTREALNDHCPGYPETERNDGTQEMAQE-----
V 113
- [0215] Query :120 TNKCREQVAHLIGLWRRF 137 (SEQ ID NO :116)
- [0216] N C Q + ++ LW F
- [0217] Sbjct :114 QNICLNQTSQILRLWYSF 131 (SEQ ID NO :117)
- [0218] SEQ ID NO :116 :家犬 TSLP
- [0219] SEQ ID NO :117 :鼠 TSLP

[0220] 因此,通过克服前述困难,本发明现在提供编码犬 TSLP 的 DNA 序列及其编码的犬 TSLP 蛋白。犬 TSLP 蛋白及其某些片段可作为有用的抗原,例如免疫原,用于产生针对该蛋白的多种表位的抗体,包括直链的和构象的表位。编码犬 TSLP 的 DNA 有助于提供载体和宿主细胞,其生产用于免疫和 / 或用作研究试剂的 TSLP 蛋白,还有助于提供用于产生抗 TSLP 抗体的基于 DNA 的疫苗,可以是适于在被免疫动物的细胞中表达 TSLP 的“裸”DNA 或质粒形式或动物病毒载体。

[0221] 如此得到的犬 TSLP 基因序列如图 8A(SEQ ID NO :1) 所示,预测的表达的 TSLP 蛋白如图 8B(SEQ ID NO :2) 所示。氨基酸残基 1-28 表示信号序列,氨基酸残基 29-155 表示成熟蛋白。

[0222] 鉴定同源 TSLP 蛋白的测定方法

[0223] 本发明还提供了 TSLP 蛋白,其包含一段氨基酸序列,该序列与 SEQ IDNO :2 的氨基酸序列有 80% 或更高的同一性,不包括其 28 个氨基酸残基的信号序列,而当该蛋白作为疫苗施用于犬时,可产生与犬 TSLP 蛋白结合的抗体,其中犬 TSLP 蛋白包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。本发明还提供了此类 TSLP 蛋白的抗原片段。

[0224] 实际上,证明假定的 TSLP 蛋白是本发明的 TSLP 的一种方法是测试该假定蛋白能否产生与犬 TSLP 结合的抗体,其中犬 TSLP 包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。一种此类方法是用不同剂量 (5-500 μ g) 的假定 TSLP-GST 抗原接种 (例如注射) 犬。此类抗原可在基于氢氧化铝的佐剂中配制,例如吸附凝胶。然后对所述犬肌肉注射 3 次:第 0 天、第 21 天、和第 42 天。在第 0、21、42、和 63 天采集接种犬和对照 (未免疫) 犬的血清样品。

[0225] 抗原接种过的犬体内的抗体诱导可通过下述 ELISA 测定方法评估:将包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的犬 TSLP 蛋白在包被缓冲液 (碳酸氢钠 pH9.0) 中稀释到 5 μ g/ml,在 96 孔板 (Pierce) 中每孔加入 100 μ l。4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。然后用含有 0.05% 吐温 -20 (Tween-20) 的磷酸缓冲液 (PBST) 洗板 3 次。每孔加入 200 μ l 封闭液 (PBST 中 2% 脱脂牛奶),室温孵育 60 分钟。用 PBST 洗板 3 次。然后,在最上排合适的孔中每孔加入 100 μ l 1 : 100 稀释的测试犬抗血清。血清样品稀释 10 倍加入板上合适的位置。室温孵育 60 分钟后,用 PBST 洗板 3 次。

[0226] 然后,每孔加入 100 μ l 1 : 20,000 稀释的辣根过氧化物酶结合的羊抗犬 IgG (Bethyl Laboratories)。室温孵育 60 分钟。然后用 PBST 洗板 3 次,每孔加入 100 μ l TMB 底物 (3,3',5,5' 四甲基苯胺, Sigma Chemical 公司, St. Louis, MO)。用 10-20 分钟在室温下进行颜色反应,其后每孔加入 50 μ l 0.18M 硫酸终止。

[0227] 用 ELISA 酶标仪 (Thermo Max ;Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 在 450nm 波长测定了所有孔的光密度 (O. D.)。取自注射了假定 TSLP 抗原的犬的血清样品被认为是可检测的,因此,如果其产生的 O. D. 值等于或大于取自免疫之前的犬血清样品产生的本底值的 3 倍,该抗原可鉴定为本发明的 TSLP 蛋白。类似地,相关抗体对 TSLP 抗原的效价可基于最高血清稀释倍数来确定,在此稀释倍数下,其产生的 O. D. 值等于或大于取自免疫之前的犬血清样品产生的本底值的 3 倍。

[0228] 犬 TSLP 蛋白特异性表位的抗体

[0229] 抗体可针对天然形式和重组形式的犬 TSLP 蛋白及其片段的多种表位产生,包括物种、多态性、或等位基因变异。另外,抗体可针对犬 TSLP 的活化形式或非活化形式,包括

天然或变性形式产生。抗独特型抗体也在预期之中。

[0230] 抗原预定片段的抗体,包括结合片段和单链形式,可通过用犬 TSLP 和 / 或其片段,和本领域标准的佐剂,和 / 或与免疫原性蛋白结合免疫动物产生。如此免疫的动物可以是下调犬 TSLP 活性而免疫的犬。

[0231] 合适的宿主,例如纯系小鼠如 Balb/c,可用所选蛋白免疫,通常使用标准佐剂和标准小鼠免疫程序(参见 Harlow and Lane,引文同上)。对目标动物施用佐剂可在施用疫苗之前、同时、或之后。

[0232] 或者,源于本文公开的序列的合成肽,并与载体蛋白结合也可用作免疫原。采集多克隆血清并通过免疫分析测定其对免疫原蛋白的效价,例如利用固定于固体载体的免疫原的固相免疫分析。选择效价为 1×10^4 或更高的多克隆抗血清并测试其与其它 IL-7 家族成员例如啮齿类 IL-7 的交叉反应活性,测试方法为竞争性结合免疫分析,例如 Harlow and Lane,引文同上,第 570-573 页中所述的方法。优选至少一种其它 IL-7 家族成员与例如灵长类 IL-7 在此测定中共同使用。使用本文所述的标准分子生物学和蛋白化学技术,所述 IL-7 家族成员可生产为重组蛋白并分离。

[0233] 竞争性结合免疫分析可用于交叉反应活性测定。举例来说,SEQ ID NO :2 的蛋白可固定于固体载体。分析中加入的蛋白与抗血清 - 固定抗原结合相竞争。上述蛋白与抗血清 - 固定蛋白结合的竞争能力与包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的蛋白相比较。上述蛋白的交叉反应活性百分比可用标准算法计算。选择并汇集与上列各蛋白的交叉反应活性均小于 10% 的抗血清。交叉反应抗体通过与上列蛋白的免疫吸附从汇集的抗血清中分离出来。

[0234] 免疫吸附的且汇集的抗血清可用于上述的竞争性结合免疫分析中,进行另一蛋白与免疫原蛋白的比较(例如类似 IL-7 的 SEQ ID NO :2 蛋白)。为进行此比较,两种蛋白用宽范围浓度进行分析,测定了各蛋白抑制 50% 抗血清 - 固定蛋白结合所需的量。如果另一蛋白所需的量少于所选蛋白所需的量的 2 倍,另一蛋白可认为与免疫原生成的抗体特异性结合。

[0235] 本发明的抗体也可用于诊断应用。作为捕获或非中和抗体,可筛选其在抑制与受体结合的情况下与抗原结合的能力。作为中和抗体,其可用于竞争性结合分析。其还可用于定性或定量检测犬 TSLP 蛋白或其受体。[参见例如 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. ; 和 Ngo(ed. 1988) Nonisotopic Immunoassay, Plenum Press, N. Y.]。交叉吸附、去除、或其它方法可提供确定选择性的制剂,例如独有的或共有的物种特异性。这可作为鉴定多组抗原的测试的基础。

[0236] 另外,本发明的抗体,包括抗原结合片段,可作为强力拮抗剂,其与抗原结合并抑制可能诱发生物应答的功能性结合,例如与受体的结合。另外,上述抗体可直接或通过连接剂间接与药物或其它治疗剂结合,并可能影响药物靶向。

[0237] 源于本文公开的序列的合成肽与载体蛋白结合可用作免疫原。在任何情况下,抗原片段可与其它物质结合,特别是多肽,成为融合的或共价结合的多肽可用作免疫原。抗原及其片段可融合或与多种免疫原共价结合,例如钥孔虫戚血蓝蛋白、牛血清白蛋白、破伤风类毒素等等。制备多克隆抗血清的方法参见 Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1969 ; Landsteiner(1962) Specificity of Serological Reactions,

Dover Publications, New York; Williams, 等人 (1967) Methods in Immunology and Immunochemistry, 第 1 卷, Academic Press, New York; 和 Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, NY。

[0238] 在某些情况下, 需要从多种哺乳动物宿主, 例如小鼠、啮齿类、灵长类、人等, 制备单克隆抗体。制备此类单克隆抗体的技术描述可在下列文献中发现, 例如 Stites, 等人 (编辑) Basic and Clinical Immunology (第 4 版), Lange Medical Publications, Los Altos, Calif. 及其所引用的文献; Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press; Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (第 2 版), Academic Press, New York; 特别是 Kohler and Milstein (1975), *Nature* 256: 495-497, 其讨论了一种生产单克隆抗体的方法。

[0239] 其它适合的技术涉及淋巴细胞在体外接触抗原性多肽或者噬菌体或其它类似载体中抗体文库的一部分。[参见 Huse, 等人 (1989) “Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda,” *Science* 246: 1275-1281; 和 Ward, 等人 (1989) *Nature* 341: 544-546.]。本发明的多肽和抗体可直接使用或修饰后使用, 包括嵌合、犬源化、和 / 或人源化抗体。

[0240] 通常本发明的多肽和抗体通过连接提供可检测信号的其它物质进行标记。可通过共价或非共价结合完成这种连接。大量标记物和结合技术已经熟知并在科学和专利文献中被广泛报道。合适的标记物包括放射性核素、酶、底物、辅因子、抑制剂、荧光基、化学发光基、磁性粒子等等。指导使用此类标记物的专利包括美国专利第 3, 817, 837、3, 850, 752、3, 939, 350、3, 996, 345、4, 277, 437、4, 275, 149、和 4, 366, 241 号。还有, 重组或嵌合免疫球蛋白可以生产, 参见 Cabilly, 美国专利第 4, 816, 567 号; Moore, 等人, 美国专利第 4, 642, 334 号; 和 Queen, 等人 (1989) *Proc. Nat’ l Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033; 或在转基因小鼠中产生, 参见 Mendez, 等人 (1997) *Nature Genetics* 15: 146-156。上述文献合并到本文中作为参考。

[0241] 本发明的抗体也可用于分离蛋白的亲色谱。将抗体连接到固体载体上以制备色谱柱 (参见例如 Wilchek 等人 (1984) *Meth. Enzymol.* 104: 3-55)。或者, 与固体载体结合的抗原可用于纯化相应的抗体。

[0242] 各种犬 TSLP 的抗体也可用于产生抗独特型抗体。这将有助于检测或诊断与各个抗原表达有关的多种免疫疾病。

[0243] RNA 抑制

[0244] 在生产犬 TSLP 的细胞中干扰编码犬 TSLP 的 RNA 是另一种抑制 TSLP 生物活性的方法, 可治疗很多与 TSLP 相关的疾病, 例如遗传过敏性皮炎。为此目的, 化学合成的或在合适的运输载体, 例如质粒或病毒载体中克隆的双链 RNA 分子可被引入活跃生产 TSLP mRNA 的细胞, 其目的是降低编码 TSLP 的内源 mRNA 水平。上述 RNA 分子进入之后 (在外源进入的分子或者质粒或病毒载体进入细胞之后的 RNA 转录的情况下), 被 3 型核糖核酸酶蛋白的裂解活性处理成短核苷酸片段, 称为小分子干扰核糖核酸 (siRNA)。上述 siRNA 片段被整合进包含核酸酶的多蛋白复合物, 称为 RISC (RNA 诱导的沉默复合物), 其活化是由于 siRNA 双螺旋被 RNA 螺旋酶的活性解旋。此时单链的 siRNA 引导 RISC 复合物到其靶 mRNA, 然后该 mRNA 被裂解并随后被 RISC 的核酸内切活性降解。

[0245] 更具体地,包含 TSLP 基因或其片段的质粒被克隆进任何一种商业出售的真核质粒,其中 TSLP 基因或其片段的转录由合适的启动子驱动,例如 CMV 或 SV40 启动子。纯化的质粒 DNA (1-100ug) 被注射到皮肤损伤处或遗传过敏性皮炎特有的环绕皮肤损伤的区域。质粒 DNA 的注射可重复多次,其频率应足以引起 TSLP mRNA 显著减少。这种减少可通过以下途径评估:注射区域的皮肤活体组织检查、和测定 TSLP mRNA 水平,例如定量 PCR 方法。

[0246] 下列本发明的实施例提供了本发明的进一步了解,绝非意图限制本发明的有效范围。

实施例

[0247] 实施例 1

[0248] 犬 TSLP DNA 和蛋白序列

[0249] 通过在电子数据库中反复的数据挖掘和分子生物学方法鉴定了一种表达犬 TSLP 的犬基因,如上详述。

[0250] 结果

[0251] 犬 TSLP 基因序列如图 8A (SEQ ID NO :1) 所示,表达 TSLP 蛋白的预测蛋白如图 8B (SEQ ID NO :2) 所示。图 8B (SEQ ID NO :2) 中标注星号的氨基酸残基 1-28 表示信号序列,氨基酸残基 29-155 表示成熟蛋白。

[0252] 实施例 2

[0253] 犬 TSLP 的克隆与表达

[0254] 编码犬 TSLP 的 DNA 如本文所述鉴定,并用本领域的标准方法克隆进一种供体载体 pDONR221 (Invitrogen Gateway System)。在合作研究机构 DNA 2.0 中进行基因组组装并克隆进供体载体,从而构建一种质粒,称为 pDONR221. G03276,其包含已鉴定的基因组犬 TSLP 基因。使用 2 种引物从 pDONR221. G03276 中 PCR 扩增编码成熟(即不含信号序列)犬 TSLP 蛋白的 DNA,其中引物分别含有 Nco I 和 EcoR V 位点:

[0255] 引物

[0256] #1 :5' AATAATCCATGGCATAACAATTTTCATTGACTGTGAC-3' (SEQ IDNO :4);和

[0257] #2 :5' -AAAATAGATATCTGAAATGCGACTGAAACGACG-3' (SEQ ID NO :5).

[0258] Nco I 和 EcoR V 消化后,PCR 产物插入到载体 pIVEX 1.3WG (RocheApplied Sciences,商品编号 3728803) 的 Nco I 和 Sma I 位点。由此产生了一种质粒,其包含编码 C 端融合 6 个组氨酸残基(6 组氨酸标签)的成熟犬 TSLP 的基因。包含正确插入序列的质粒命名为 1265-93. D 质粒。1265-93. D 质粒用于表达 TSLP,使用的设备为 RTS Proteomaster Instrument (Roche AppliedSciences,商品编号 3064859),根据制造商的建议操作。如图 1 所示,在第 2 道和第 4 道有明显的 16kDa 条带(箭头所示)。蛋白质印迹实验(图 2A 和图 2B) 显示此条带与抗组氨酸标签抗体(图 2A) 和特异性抗人 TSLP 的大鼠单克隆抗体(图 2B) 特异性反应。

[0259] 实施例 3

[0260] 从宿主细胞中生产犬 TSLP

[0261] 为在 E. coli 中表达重组 TSLP 蛋白,PCR 扩增了编码 cTSLP 的核苷酸序列(即缺少编码信号序列的核苷酸),其中模板为质粒 1265-66C,正向引物和反向引物分别含有 NcoI

和 Hind III 位点：

[0262] 正向引物

[0263] 5' -AATAATCCATGGCATAACAATTTTCATTGACTGTGAC-3' (SEQ ID NO :6)

[0264] 反向引物

[0265] 5' -ACATAAAAAGCTTTGAAATGCGACTGAAACGACG-3' (SEQ ID NO :7)

[0266] NcoI 和 Hind III 消化后,PCR 产物插入到 pET42b(+) 表达载体 (Novagen) 的 NcoI/HindIII 位点。此过程产生一种质粒,其编码 N 端融合 GST 标签和 C 端融合 6 组氨酸标签的成熟 cTSLP。包含正确插入序列的质粒命名为 1265-93B。GST-TSLP-His 融合蛋白的表达在 E. coli BL21 (DE3) /pLysS 中进行,其包含 T7RNA 聚合酶基因,该基因受异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导的 lacUV5 启动子调控。含有质粒 1265-93B 的 E. coli 细胞在 30°C 生长,直到 O. D. 600 达到 0.6,再加入 0.5mM IPTG 诱导蛋白表达,并进一步 30°C 孵育 2 小时。SDS-PAGE 显示在可溶性 E. coli 馏分中有正确大小 (约 61kDa) 的蛋白条带 (箭头所示) (图 3A)。蛋白质印迹显示表达的蛋白与抗 GST 抗体反应 (图 3D)。GST-TSLP-His 蛋白可用谷胱甘肽琼脂糖 4B 树脂纯化 (图 3B)。用 Ni-NTA 树脂再次纯化后,大部分 GST-TSLP 蛋白包含在纯化柱流穿液中 (图 3C)。

[0267] 实施例 4

[0268] 犬 TSLP 的免疫荧光检测

[0269] 使用抗人 TSLP 蛋白的兔多克隆抗体,通过免疫组织化学 (“IHC”) 测定了犬 TSLP 蛋白在犬皮肤和扁桃体组织中的表达。免疫组织化学在石蜡包埋组织块上进行,样品取自注射盐水的正常犬皮肤,以及经诊断患有多种皮肤病的患犬皮肤,所患皮肤病包括遗传过敏性皮炎、皮肤红斑狼疮、多形红斑、和交界型大疱性表皮松解症。另外,在两只犬的冷冻扁桃体组织中测定了 TSLP 蛋白表达。通过 IHC 测定 TSLP 表达的程序如下所述：

[0270] I. 制备切片：

[0271] 1. 包埋皮肤样品的石蜡块切片成 5-7 微米厚度并置于载玻片上,载玻片已用多聚 L- 赖氨酸处理以促进粘合。

[0272] 2. 切片用二甲苯去除石蜡,用一系列乙醇溶液再水化。

[0273] 3. 抗体恢复在柠檬酸盐缓冲液中进行 [10mM 柠檬酸钠,其中含有 0.5ml/ 升 Tween-20,用实验室微波炉处理 25 分钟,达到 99-100°C]。此为恢复组织切片在石蜡包埋过程中被掩盖的抗原性的过程。

[0274] II. 免疫染色

[0275] 1. 切片在磷酸缓冲液 (PBS) 稀释的 10% 正常驴血清中室温孵育 1 小时以降低抗体的非特异性结合。

[0276] 2. 小心去除多余血清,切片用 PBS 稀释的兔抗体 (1 : 100) 覆盖,在潮湿箱中室温孵育 1 小时或 4°C 孵育过夜。

[0277] 3. 切片在 PBS 中漂洗 2 次,每次 5 分钟,其间小心摇动。

[0278] 4. 小心去除多余 PBS,切片用 PBS 1 : 5000 稀释的生物素标记的驴抗兔 IgG 抗体覆盖,在潮湿箱中室温处理 30 分钟。

[0279] 5. 切片在 PBS 中漂洗 2 次,每次 5 分钟,其间小心摇动。

[0280] 6. 去除多余的 PBS,切片在 5 微克 /ml 链霉亲和素 - 异硫氰酸荧光素 (链霉亲和

素-FITC) 结合的 PBS 中室温孵育 30 分钟。

[0281] 7. 切片在 PBS 中漂洗 2 次, 每次 5 分钟, 小心摇动。

[0282] 8. 切片用苏木精复染色 2-3 分钟。

[0283] 9. 在荧光显微镜下检查切片。

[0284] 10. 拍照合适的图像。

[0285] 11. 实验对照包括不加一级抗 TSLP 抗体、或用普通兔抗体替换一级抗 TSLP 抗体。

[0286] 以下表 1 总结了 IHC 实验结果

[0287] 表 1

[0288] 兔抗人 TSLP 的免疫组织化学

[0289] 实施于石蜡包埋皮肤组织块, 样品取自多种皮肤病的患犬

[0290]

疾病情况 (包埋块总数)	阳性包埋块	阴性包埋块
AD 损伤皮肤 (* n = 10)	8	2
注射 PBS 的正常皮肤 (n = 5)	1	4
交界型大疱性表皮松解症 (n = 2)	2	0
犬皮肤红斑狼疮 (n = 3)	0	3
多形红斑 (n = 3)	2	1
* n = 动物数量		

[0291] TSLP 表达在 80% AD 患犬皮肤组织中检出, 但仅在 20% 注射盐水的正常皮肤组织中检出。TSLP 还分别在 66% 多形红斑患犬和 100% 遗传性皮肤病交界型大疱性表皮松解症患犬皮肤组织中检出。在皮肤红斑狼疮患犬皮肤组织中无 TSLP 蛋白表达。在石蜡包埋的皮肤组织中, TSLP 表达在汗腺中检出。冷冻犬扁桃体组织中的 TSLP 表达在复层扁平上皮及其关联的唾液腺中检出。图 4 显示了犬皮肤样品阳性 IHC 染色的一个实例, 其代表取自诊断为遗传过敏性皮炎患犬的石蜡包埋皮肤组织样品。

[0292] 实施例 6

[0293] 犬 TSLP 免疫过氧化物酶检测

[0294] 使用免疫过氧化物酶染色作为检测方法, 通过免疫组织化学测定犬 TSLP 蛋白在由诊断为遗传过敏性皮炎患犬皮肤制备的石蜡包埋组织块中的表达。在此方法中, 表位特异性的大鼠抗人 TSLP 蛋白单克隆抗体被用作一级抗体。通过免疫过氧化物酶染色测定 TSLP 表达的程序如下所述:

[0295] 特殊试剂

[0296] 普通新生牛血清 : #N-4762Sigma

[0297] 石蜡包埋皮肤组织

[0298] 一级抗体 : 大鼠抗人 TSLP mAB 大鼠 IgG2a

- [0299] 二级抗体:兔抗大鼠 IgG(生物素标记):BA-4000 Vector Lab. Burlingame, CA
- [0300] 检测试剂:链霉亲和素-辣根过氧化物酶:#43-8323 Zymed Labs. San Francisco, CA
- [0301] 3-氨基-9-乙基卡巴唑(AEC)底物试剂盒:Biogenex #HK129-5K San Ramon, CA
- [0302] 1. 样品切片 4-6um。
- [0303] 2. 室温风干 10 分钟。
- [0304] 3. 丙酮固定 10 分钟。
- [0305] 4. PBS(0.01 磷酸缓冲液)漂洗 3 分钟。
- [0306] 5. 在含有 0.1%叠氮钠的 0.3%过氧化氢中淬灭 7-10 分钟。
- [0307] 6. PBS 漂洗 5 分钟。
- [0308] 7. 在保湿箱中用 1%普通新生牛血清封闭切片 20 分钟。
- [0309] 8. 沥干载玻片,加入 1 : 100 稀释的一级抗体,室温 2 小时。
- [0310] 9. 漂洗 5 分钟。
- [0311] 10. 加入二级抗体(1 : 400 稀释的兔抗大鼠 IgG),在保湿箱中室温 30 分钟。
- [0312] 11. 漂洗 5 分钟。
- [0313] 12. 沥干,加入检测试剂(1 : 400 稀释的链霉亲和素-辣根过氧化物酶),室温 30 分钟。
- [0314] 13. 漂洗 2 次,每次 5 分钟。
- [0315] 14. 加入 AEC, 2.5 分钟。根据所需染色深度和背景调整。
- [0316] 15. 苏木精复染色并制作标本。
- [0317] 使用表位特异性的犬 TSLP 抗体,通过 IHC 检测一组 AD 患犬的犬皮肤组织。图 5 所示结果提示此抗体可与和人 TSLP 具有相同表位的分子反应。犬 AD 皮肤样品在表皮增厚的慢性炎症区域染色强烈。这种表现与已知的人 AD 皮肤损伤中的 TSLP 表达位置一致,进一步表明在犬皮肤 AD 损伤中识别的分子是犬 TSLP。使用 PBS 或不同蛋白(淋巴细胞蛋白)特异性的不同大鼠单克隆抗体不能观察到染色。
- [0318] 实施例 7
- [0319] 犬 TSLP 的表位作图
- [0320] 为鉴定可在能够中和 TSLP 活性的疫苗中包含的犬 TSLP 表位,合成一组基于犬 TSLP 蛋白序列的相互重叠的肽,并测试其与抗人 TSLP 单克隆中和抗体反应的能力。为此目的,在 MIMOTOPES(Minneapolis, MN)的针上合成一组相互重叠的肽,各长 15 个氨基酸,相互错开 2 个氨基酸。上述肽的序列在表 2 中列出。合成的肽 1-57 带有酰胺化末端,结构为 NH₂-PEPTIDE-PIN。合成的肽 58-94(母肽 1-37 的重复)带有乙酰化末端,结构为 ACETYL-PEPTIDE-PIN。
- [0321] 根据制造商推荐的程序(Mimotopes, Minneapolis, MN),通过 ELISA 分析检测含表 2 中所列的肽的针(The pins carrying the peptide listed in Table 2)。如图 6 所示,25 号多肽(表位 25),其氨基酸序列为 NH₂-ARIERLTLHRIRGCA(SEQ ID NO:32),具有最高的抗 PAB100 单克隆抗体的反应活性。图 7 所示为该多肽序列与对应的假定人 TSLP 多肽序列的比较。
- [0322] 表 2

[0323] 用于表位作图的犬 TSLP 多肽

[0324] 表位号 SEQ ID 表位号 SEQ ID

[0325] NOs : NOs :

[0326]

1	YNFIDCDFEKIRWKY	8	48 AKKKRKKRGVTTNKC	55
2	FIDCDFEKIRWKYQE	9	49 KKKRKKRGVTTNKCRE	56
3	DCDFEKIRWKYQEV	10	50 RKKRGVTTNKCREQV	57
4	DFEKIRWKYQEVYQ	11	51 KRGVTTNKCREQVAH	58
5	EKIRWKYQEVYQAL	12	52 GVTTNKCREQVAHLI	59
6	IRWKYQEVYQALEK	13	53 TTNKCREQVAHLIGL	60
7	WKYQEVYQALEKYM	14	54 NKCREQVAHLIGLWR	61
8	YQEVYQALEKYMDG	15	55 CREQVAHLIGLWRRF	62
9	EVYQALEKYMDGTR	16	56 EQVAHLIGLWRRFSR	63
10	IYQALEKYMDGTRST	17	57 VAHLIGLWRRFSRIS	64
11	QALEKYMDGTRSTEF	18	58 YNFIDCDFEKIRWKY	65
12	LEKYMDGTRSTEFSH	19	59 FIDCDFEKIRWKYQE	66
13	KYMDGTRSTEFSPV	20	60 DCDFEKIRWKYQEV	67
14	MDGTRSTEFSPVYC	21	61 DFEKIRWKYQEVYQ	68
15	GTRSTEFSPVYCAN	22	62 EKIRWKYQEVYQAL	69
16	RSTEFSPVYCANPP	23	63 IRWKYQEVYQALEK	70
17	TEFSPVYCANPPDC	24	64 WKYQEVYQALEKYM	71
18	FSHPVYCANPPDCLA	25	65 YQEVYQALEKYMDG	72
19	HPVYCANPPDCLARI	26	66 EVYQALEKYMDGTR	73
20	VYCANPPDCLARIER	27	67 IYQALEKYMDGTRST	74
21	CANPPDCLARIERLT	28	68 QALEKYMDGTRSTEF	75

22 NPPDCLARIERLTLH	29	69 LEKYMDGTRSTEFSSH	76
23 PDCLARIERLTLHRI	30	70 KYMDGTRSTEFSHPV	77
24 CLARIERLTLHRIRG	31	71 MDGTRSTEFSHPVYC	78
25 ARIERLTLHRIRGCA	32	72 GTRSTEFSHPVYCAN	79
26 IERLTLHRIRGCASG	33	73 RSTEFSHPVYCANPP	80
27 RLTLHRIRGCASGAR	34	74 TEFSHPVYCANPPDC	81
28 TLHRIRGCASGAREA	35	75 FSHPVYCANPPDCLA	82
29 HRIRGCASGAREAFA	36	76 HPVYCANPPDCLARI	83
30 IRGCASGAREAFAEG	37	77 VYCANPPDCLARIER	84
31 GCASGAREAFAEGTV	38	78 CANPPDCLARIERLT	85
32 ASGAREAFAEGTVAA	39	79 NPPDCLARIERLTLH	86
33 GAREAFAEGTVAALA	40	80 PDCLARIERLTLHRI	87
34 REAFAEGTVAALAAE	41	81 CLARIERLTLHRIRG	88
35 AFAEGTVAALAAECP	42	82 ARIERLTLHRIRGCA	89
36 AEGTVAALAAECPGY	43	83 IERLTLHRIRGCASG	90
37 GTVAALAAECPGYAA	44	84 RLTLHRIRGCASGAR	91
38 VAALAAECPGYAAAP	45	85 TLHRIRGCASGAREA	92
39 ALAAECPGYAAAPIN	46	86 HRIRGCASGAREAFA	93
40 AAECPGYAAAPINNT	47	87 IRGCASGAREAFAEG	94

[0327]

41 ECPGYAAAPINNTQA	48	88 GCASGAREAFAEGTV	95
42 PGYAAAPINNTQAKK	49	89 ASGAREAFAEGTVAA	96
43 YAAAPINNTQAKKKR	50	90 GAREAFAEGTVAALA	97
44 AAPINNTQAKKKRKK	51	91 REAFAEGTVAALAAE	98

45 PINNTQAKKKRKKRG	52	92 AFAEGTVAALAAECP	99
46 NNTQAKKKRKKRGVT	53	93 AEGTVAALAAECPGY	100
47 TQAKKKRKKRGVTTN	54	94 GTVAALAAECPGYAA	101

[0328] 本发明的范围不受本文所述的具体实施方式的限制。实际上,根据前面所述,对本领域的技术人员而言,除本文所述之外的对本发明的多种改型是显而易见的。此类改型理应列入所附权利要求书的范围内。

[0329] 应进一步了解,为核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小、以及所有分子量或分子量数值都是近似的,仅为描述所用。

[0330] 本文引用了很多文献,其公开的全部内容结合到本文中作为参考。

序列表

<110> 先灵 - 普劳有限公司

<120> 犬胸腺基质淋巴细胞生成素蛋白及其应用

<130>AH06501W0

<150>60/875, 135

<151>2006-12-14

<160>118

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>468

<212>DNA

<213> 家犬

<400>1

atggtgcctg atgccctgct gagegtgctg agcgtgttct ttaggaagat cttcgtcttg	60
cagctggtag ggctggtgct aacctacaat ttcattgact gtgactttga gaagattaga	120
tggaagtatc aggaagtcat ttaccaagcc ctggagaaat acatggatgg gaccaggagc	180
acggagttca gccaccccgt gtactgcgcg aaccgcccg actgcctggc caggatcgag	240
cggtcacc c tgcaccgat ccgcggctgc gcgtcgggcg cccgggagge cttcgcggag	300
gggacggtcg ccgcgctcgc cgccgagtc cgggctacg ccgcagcgc gataaataat	360
accaggcaa agaagaaaag aaaaaaaga ggagtcacaa caaataaatg cggggaacaa	420
gtcgcacact taatagggt gtggcgtcgt ttcagtcgca tttcatag	468

<210>2

<211>155

<212>PRT

<213> 家犬

<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				
	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> 人

<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>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述 :合成引物

<400>4

aataatccat ggcatacaat ttcattgact gtgac

35

<210>5

- <211>33
 <212>DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述 :合成引物

 <400>5
 aaaatagata tctgaaatgc gactgaaacg acg 33
- <210>6
 <211>35
 <212>DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列描述 :合成引物

 <400>6
 aataatccat ggcataacaat ttcattgact gtgac 35
- <210>7
 <211>33
 <212>DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列描述 :合成引物

 <400>7
 acataaaagc tttgaaatgc gactgaaacg acg 33
- <210>8
 <211>15
 <212>PRT
 <213> 家犬

 <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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬			
<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> 家犬			
<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> 家犬			
<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> 家犬			
<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<400>39

<211>15

<212>PRT

<213> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<400>87

Pro Asp Cys Leu Ala Arg Ile Glu Arg Leu Thr Leu His Arg Ile

<212>PRT

<213> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<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> 家犬

<400>96

<211>15

<212>PRT

<213> 家犬

<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> 人

<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> 家犬

<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> 人

<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
 20 25 30
 Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln
 35 40

<210>105

<211>39

<212>PRT

<213> 家犬

<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> 人

<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> 家犬

<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> 人

<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> 家犬

<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> 人

<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> 家犬

<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> 人

<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> 家犬

<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> 家犬

<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
 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> 人

<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> 家犬

<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> 小鼠

<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
 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> 家犬

<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

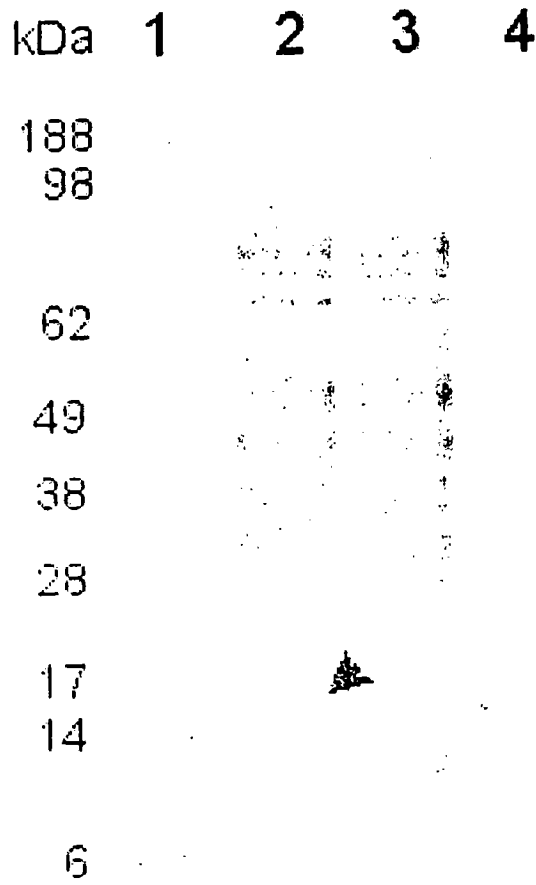


图 1

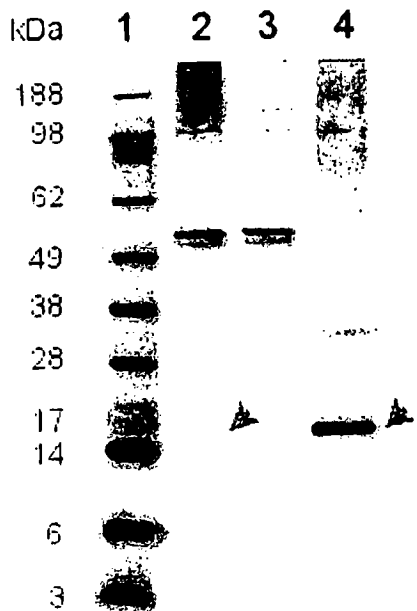


图 2A

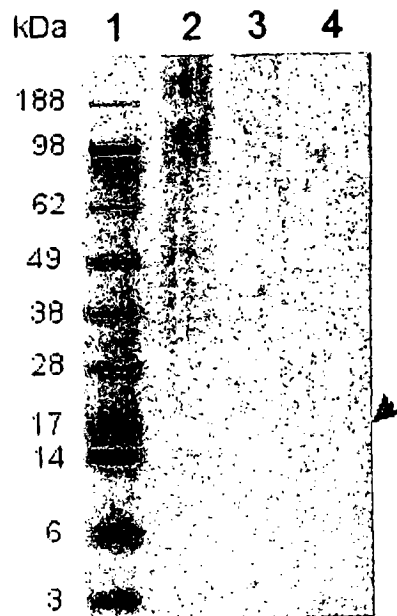


图 2B

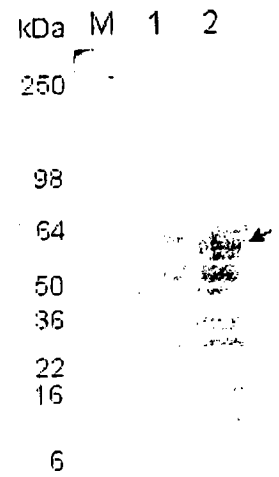


图 3A

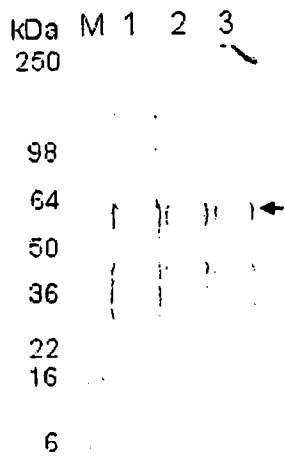


图 3B

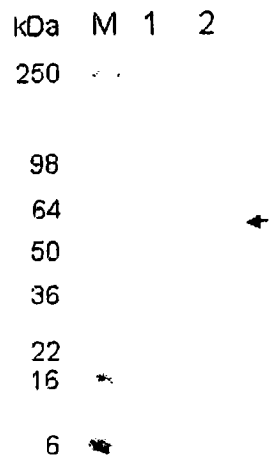


图 3C

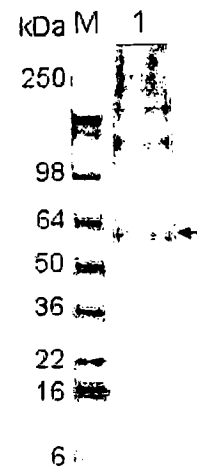


图 3D

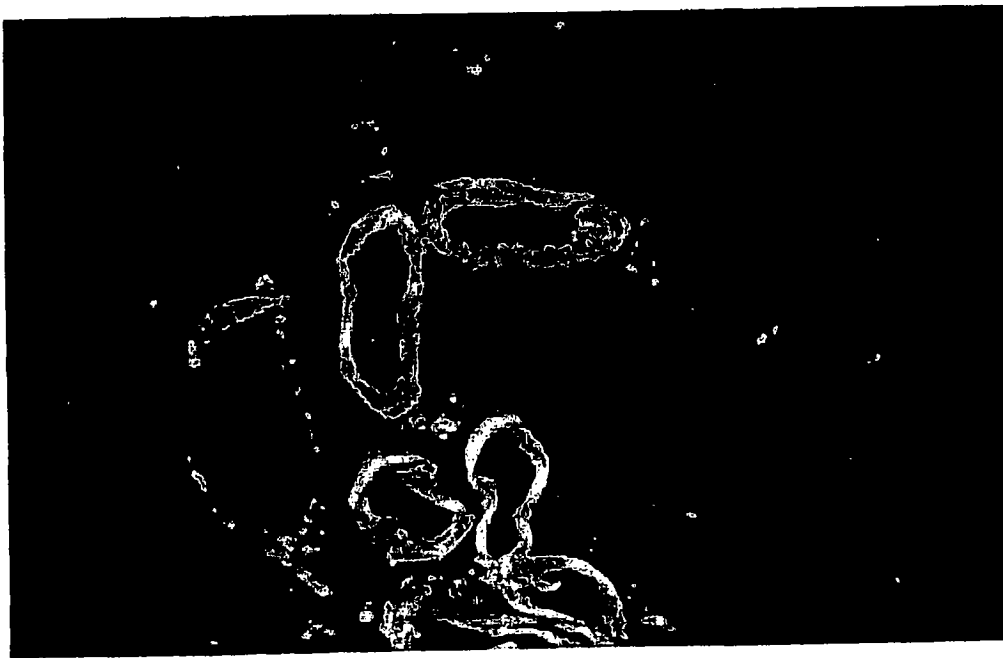


图 4

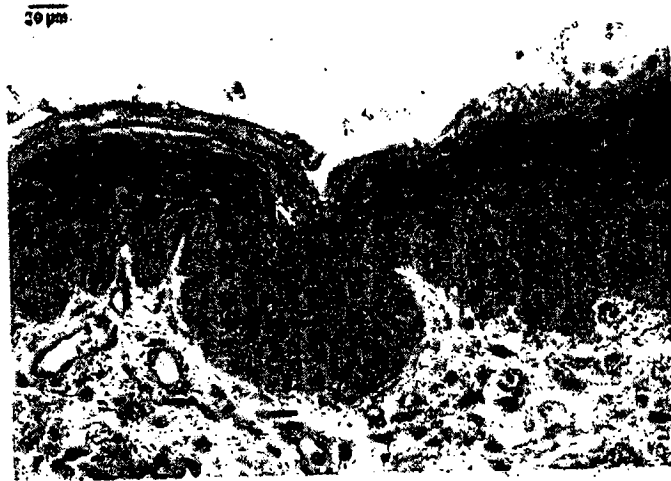


图 5A

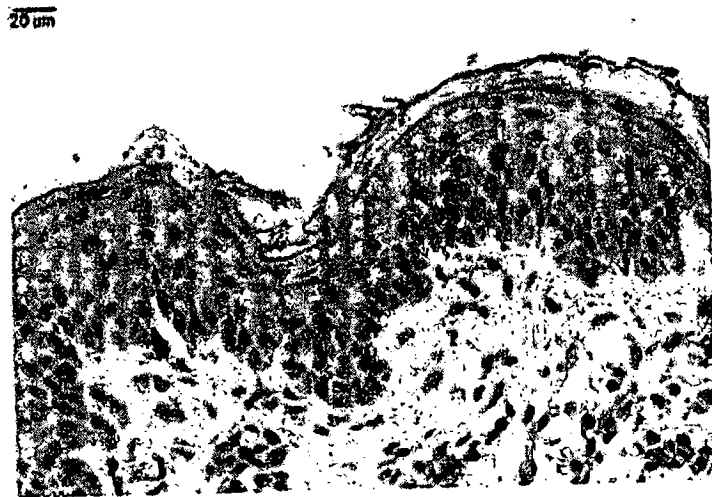


图 5B

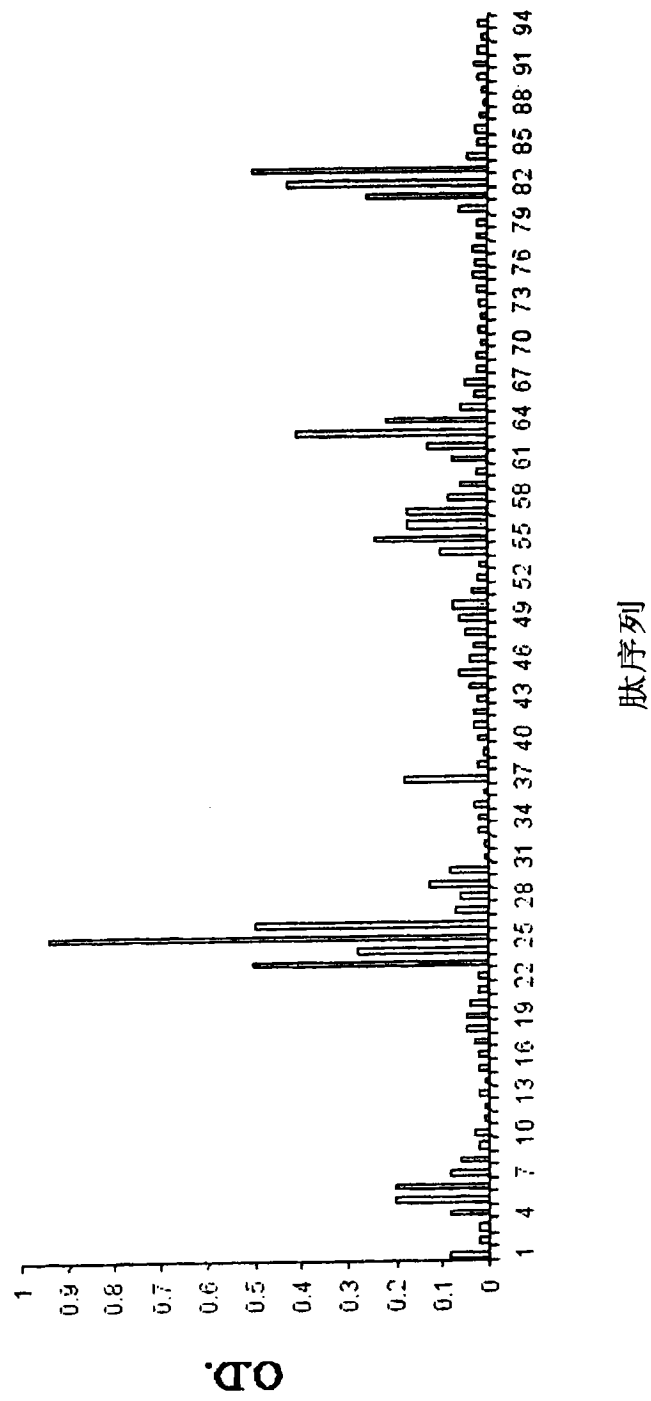


图 6

犬 : ARIERLTLHRIRGCA
人 : TEIQSLTFNPTAGCA

图 7

5' -
ATGGTGCCTGATGCCCTGCTGAGCGTGCTGAGCGTGTTCTTTAGGAAGAT
CTTCGTCTTGACAGCTGGTAGGGCTGGTGCTAACCTACAATTTCAATTGACT
GTGACTTTGAGAAGATTAGATGGAAGTATCAGGAAGTCATTTACCAAGCC
CTGGAGAAATACATGGATGGGACCAGGAGCACGGAGTTCAGCCACCCCGT
GTACTGCGCGAACCCGCCGACTGCCTGGCCAGGATCGAGCGGCTCACCC
TGCACCGCATCCGCGGCTGCGCGTCGGGCGCCCGGGAGGCCTTCGCCGAG
GGGACGGTCGCCGCGCTCGCCGCCGAGTGCCCGGGCTACGCCGAGCGCC
GATAAATAATACCCAGGCAAAGAAGAAAAGAAAAAAAAGAGGAGTCACAA
CAAATAAATGCCGGAACAAGTCGCACACTTAATAGGGCTGTGGCGTCGT
TTCAGTCGCATTTCATAG - 3'

图 8A

*

MVPDALLSVLSVFFRKIFVLQLVGLVLTYNFIDCDFEKIRWKYQEVIIYQA
LEKYMDGTRSTEF~~SHPVYCANPPDCLARIERLTLHRIRGCASGAREAF~~AE
GTVAALAAECPGYAAAPINNTQAKKKRKKRGVTTNKCREQVAHLIGLWRR
FSRIS

图 8B