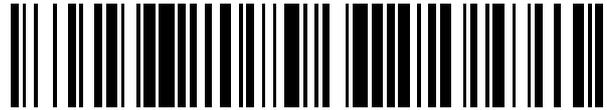


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 655**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2007 E 07867705 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2104683**

54 Título: **Proteína linfopoyetina estromal tímica canina y usos de la misma**

30 Prioridad:

14.12.2006 US 875135 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.09.2016

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL BV (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**MATTSON, JEANINE D.;
GORMAN, DANIEL M.;
DE WAAL MALEFYT, RENE y
MORSEY, MOHAMAD A.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 582 655 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteína linfopoyetina estromal tímica canina y usos de la misma

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la proteína linfopoyetina estromal tímica canina ("TSLP, acrónimo inglés de *thymic stromal lymphopoietin protein*" canina), a moléculas de ácido nucleico, a vectores y a células hospedadoras que codifican la TSLP canina, y a métodos para preparar y usar la TSLP canina.

10

10 **Antecedentes de la invención**

Los animales, incluyendo a los seres humanos, que padecen trastornos mediados por reagina, tales como enfermedades atópicas, tienen una tendencia hereditaria a desarrollar reacciones alérgicas inmediatas que implican anticuerpos IgE. Múltiples factores genéticos contribuyen a la expresión del fenotipo resultante visto en dichos animales. La hipersensibilidad inmediata observada en enfermedades atópicas resulta de exposición a alérgenos específicos, tales como el ácaro del polvo doméstico (*Dermatophagoides pteronyssinus*), polen, moho y caspa. No resulta sorprendente que los individuos que tienen una enfermedad atópica tienen más probabilidad de padecer asma, dermatitis atópica, así como otros trastornos relacionados con la liberación de IgE endógeno.

20

También se producen enfermedades atópicas tales como dermatitis alérgica, asma y similares, en las especies caninas, incluyendo en perros domésticos. Dichos perros comienzan generalmente a mostrar señales de atopia entre uno y tres años de edad. Debido a la naturaleza hereditaria de la enfermedad, varias razas, incluyendo Golden retriever, la mayoría de los terrier, Setter Irlandeses, Lhasa apsos, Dálmatas, bulldogs y perros ovejeros ingleses tienen una mayor tendencia a ser atópicos, aunque se sabe que otros tipos de perros, incluyendo razas mixtas, también padecen esta afección. La incidencia de al menos un tipo particular de atopia, dermatitis atópica, está aumentando significativamente tanto en seres humanos como en caninos.

25

Los caninos atópicos habitualmente frotarán, lamerán, masticarán, morderán o rascarán sus pies, hocico, oídos, axilas o ingle, dando como resultado pérdida de pelo, enrojecimiento y engrosamiento de la piel. En algunos casos varias afecciones cutáneas se combinan para provocar que un animal tenga picores cuando una única alergia por sí sola no habría dado como resultado dichos picores. Estos problemas agravantes pueden deberse a alérgenos transportados por el aire (pólenes, etc.), alérgenos en el alimento y alérgenos de parásitos (pulgas, etc.). Las infecciones bacterianas y/o por levadura de la piel también pueden aumentar la sensación de picor.

35

Un medio sencillo para aliviar los síntomas molestos de la atopia es evitar el alérgeno o los alérgenos incitantes. Desafortunadamente, dicha evitación es generalmente poco práctica. Hasta la fecha, los practicantes veterinarios han tratado la dermatitis atópica canina administrando antihistamínicos orales, agentes antiinflamatorios corticosteroides orales o tópicos, otros supresores del sistema inmunitario, tales como ciclosporina o tacrolimus, suplementos de ácidos grasos e inmunoterapia específica de alérgeno (que requiere la inyección del antígeno identificado). Sin embargo, ninguno de estos tratamientos funciona en todos los casos. Además, dichos tratamientos son costosos y/o dan lugar a efectos secundarios significativos. Por lo tanto, existe una necesidad prolongada de enfoques más seguros, más eficaces y más económico para tratar o suprimir los síntomas de dermatitis atópica canina.

45

La respuesta inmunitaria de mamífero se basa en una serie de interacciones celulares complejas, que se denomina "red inmunitaria". Gran parte de la respuesta inmunitaria gira en torno a las interacciones de tipo red de linfocitos, macrófagos, granulocitos y otras células, con proteínas solubles denominadas citocinas que desempeñan un papel crítico en la mediación/el control/la regulación de estas interacciones celulares. Por lo tanto, las citocinas y células inmunitarias actúan para mediar mecanismos fisiológicos específicos o rutas que conducen a los diversos trastornos inflamatorios.

50

La inflamación alérgica es el resultado de una cascada inmunológica compleja que conduce linfocitos T a producir citocinas derivadas de TH2 desreguladas tales como IL-4, IL-5 e IL-13. Estas citocinas, a su vez, desencadenan hiperreactividad bronquial, producción de IgE, eosinofilia y producción de moco (véase, por ejemplo, Busse y Lemanske, Jr. (2001) N. Engl. J. Med. 344: 350-62; Holgate (2000) Br. Med. J. 320: 231-234; y Renauld (2001) J. Clin. Pathol. 54: 577-589).

55

La proteína Linfopoyetina estromal tímica (TSLP) es una citocina de tipo IL-7 que se identificó inicialmente en ratones como un factor que apoyaba: (i) el desarrollo *in vitro* de linfocitos B IgM⁺ de superficie y (ii) proliferación de linfocitos B y T (Friend *et al.*, 1994 Exp Hematology 22: 321-328, véase también, Levin *et al.*, 1999, J. Immunol 162: 677 - 683). Se sabe ahora que la TSLP se une a un receptor celular que comprende la subunidad IL-7R-alfa y una subunidad receptora única denominada TSLP-R. Esta interacción desencadena la transducción de señal mediante activación de STAT o expresión de Quimiocina Regulada por Activación y Timo (TARC) en una célula hematopoyética, tal como una célula de linaje mielóide tal como un monocito, o una célula dendrítica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos del mismo propietario que la presente n.º 6.890.734).

60

65

La TSLP también puede desempeñar un papel importante en ratones en la patogénesis de enfermedades alérgicas tales como dermatitis atópica y asma. Por ejemplo, los ratones transgénicos en los que se indujo específicamente la expresión del gen de TSLP en la piel muestran características inmunológicas y clínicas de dermatitis atópica tales como lesiones eczematosas que contienen infiltrados celulares dérmicos inflamatorios, un aumento drástico de linfocitos T CD4⁺ Th₂ que expresan receptores buscadores de piel y niveles en suero elevados de IgE. Además, los pulmones de ratones que expresan un transgén de TSLP específico de pulmón muestran características inmunológicas y clínicas de asma incluyendo infiltración masiva de leucocitos, hiperplasia de células caliciformes, fibrosis subepitelial, un aumento en las citocinas de T auxiliares de tipo 2 y niveles aumentados de IgE.

Sims *et al.* obtuvieron la secuencia de ADNc de TSLP murina empleando clonación de expresión, pero fueron incapaces de clonar el homólogo humano con sondas de hibridación basadas en la TSLP murina (Sims *et al.* 2000, J exp Med, 192: 671 - 680). Posteriormente, el homólogo humano se identificó mediante análisis de EST detallado. Se descubrió que la secuencia de nucleótidos de TSLP humana tenía solamente 43 % de homología con la secuencia de ratón correspondiente.

La TSLP humana, su secuencia proteica y métodos para la producción de hTSLP se describen en el documento WO 2000/029581.

Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de proporcionar nuevos tratamientos más prácticos para trastornos atópicos en caninos, incluyendo dermatitis atópica y sus manifestaciones clínicas asociadas. Además, existe la necesidad de aislar factores que estén implicados en la cascada inmunológica que conduce a trastornos atópicos en caninos que podrían conducir al desarrollo de dichos tratamientos.

La cita de cualquier referencia en el presente documento no debería interpretarse como una admisión de que dicha referencia está disponible como "técnica anterior" a la presente solicitud.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona tratamientos nuevos y más prácticos para trastornos atópicos en caninos, incluyendo dermatitis atópica y sus manifestaciones clínicas asociadas. En consecuencia, la presente invención proporciona nuevas proteínas de proteína linfopoyetina estromal tímica (TSLP) aisladas y/o recombinantes que están implicadas en la cascada inmunológica que conduce a trastornos atópicos. La presente invención proporciona además fragmentos antigénicos de dichas proteínas TSLP. En un aspecto particular de la presente invención, la proteína TSLP es una proteína TSLP canina.

Por lo tanto la presente invención proporciona una proteína TSLP que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 80 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, excluyendo la secuencia señal de 28 restos de aminoácidos, que cuando la proteína se administra a un sujeto canino como una vacuna, los anticuerpos que se unen a la proteína TSLP canina que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 son detectables en los sueros caninos resultantes obtenidos del sujeto canino vacunado. En una realización relacionada, la proteína TSLP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 80 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, excluyendo la secuencia señal de 28 restos de aminoácidos; y reacciona de forma cruzada con un anticuerpo inducido contra la TSLP canina que comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 2.

La presente invención proporciona además una proteína TSLP que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 80 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (excluyendo la secuencia señal de 28 restos de aminoácidos) que se une a un anticuerpo monoclonal de TSLP canino específico de epítipo.

En una realización más particular, la proteína TSLP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, excluyendo la secuencia señal de 28 restos de aminoácidos. En otra realización más, la proteína TSLP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 95 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, excluyendo la secuencia señal de 28 restos de aminoácidos.

En una realización específica de la presente invención, la proteína TSLP es la proteína TSLP canina que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En otra realización, la proteína TSLP es la proteína TSLP canina madura que comprende los restos de aminoácidos 29-155 de SEQ ID NO: 2.

También se proporcionan fragmentos antigénicos de las proteínas TSLP de la presente invención. Dichos fragmentos antigénicos incluyen los que comprenden uno o más epítopos definidos individualmente por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8-101. En una realización particular, un fragmento antigénico de la presente invención comprende uno o más epítopos que comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, 31, 32 o 34. En otra realización, los fragmentos antigénicos pueden tener una secuencia de aminoácidos contenida dentro del solapamiento de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, 31, 32 o 34, es decir, NPPDCLARIERLTLHRIRGCAS (SEQ ID NO: 118). En una realización particular, un fragmento antigénico de la proteína TSLP canina es capaz de unirse con un anticuerpo monoclonal anti TSLP humana. Los fragmentos

antigénicos de la secuencia de aminoácidos de NPPDCLARIERLTLHRIGCAS (SEQ ID NO: 118) pueden variar en tamaño de aproximadamente 5 a aproximadamente 21 restos de aminoácidos.

También se describen vacunas que pueden incluir una cantidad eficaz de cualquier proteína TSLP de la presente invención, uno o más fragmentos antigénicos de la misma, o combinaciones de dicha proteína o dichas proteínas de longitud completa y uno o más de dichos fragmentos. En una realización particular, una vacuna contiene uno o más fragmentos antigénicos de la proteína TSLP canina que comprende de 5 a 22 aminoácidos contiguos de los restos de aminoácidos 71-92 de SEQ ID NO: 2 (identificados en el presente documento como SEQ ID NO: 118). Los ejemplos de dichos fragmentos antigénicos incluyen los epítomos desvelados en el presente documento que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34. Todas las vacunas de la presente invención pueden comprender además un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Una vacuna como se describe puede emplearse en un método para inducir anticuerpos anti TSLP canina. Uno de dichos métodos comprende inmunizar un mamífero con una cantidad eficaz de la vacuna. Este método incluye opcionalmente un método para regular negativamente la actividad de TSLP en un canino y/o un método para tratar o prevenir síntomas alérgicos en un canino atópico que comprende inmunizar al canino con una cantidad eficaz de la vacuna. Los síntomas alérgicos aliviados pueden incluir dermatitis alérgica, asma y similares.

Puede administrarse una vacuna como se describe por una vía tal como: inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intradérmica, administración oral, administración intranasal, escarificación y combinaciones de las mismas.

La presente invención proporciona además una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína TSLP de la presente invención o un fragmento antigénico de la misma. En dicha realización, la molécula de ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En una realización particular de este tipo, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. También son parte de la presente invención fragmentos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 de aproximadamente 18 nucleótidos contiguos, aproximadamente 24 nucleótidos contiguos, aproximadamente 36 nucleótidos contiguos, aproximadamente 45 nucleótidos contiguos, aproximadamente 66 nucleótidos contiguos o más. También se proporcionan por la presente invención ácidos nucleicos de aproximadamente 18 nucleótidos, aproximadamente 24 nucleótidos, aproximadamente 36 nucleótidos, aproximadamente 45 nucleótidos, aproximadamente 66 nucleótidos, o más, incluyendo ácidos nucleicos que codifican proteínas TSLP de longitud completa, que hibridan con SEQ ID NO: 1 en condiciones de hibridación rigurosas. Todas las moléculas de ácido nucleico y fragmentos de las mismas de la presente invención pueden comprender además una secuencia de nucleótidos heteróloga.

La presente invención también proporciona un vector de expresión que incluye las moléculas de ácido nucleico previamente indicadas y/o fragmentos de las mismas. Además, la presente invención proporciona células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión. La célula hospedadora es opcionalmente una célula hospedadora procarionota o una eucariota. En una realización, la célula hospedadora procarionota es una *Escherichia coli*. En una realización particular de este tipo, la célula hospedadora es *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS que contiene el gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor de lacUV5 inducible por isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG).

La presente invención proporciona además vectores virales recombinantes y/o vectores de ADN desnudos que comprenden una de las moléculas de ácido nucleico anteriormente indicadas que codifican una TSLP canina, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, y/o fragmento de la misma. Dichos vectores pueden usarse, por ejemplo, en vacunas que son adecuadas para administración a un canino que tenga dermatitis atópica.

La presente invención también proporciona métodos para producir una proteína TSLP de la presente invención. Uno de dichos métodos comprende cultivar una célula hospedadora de la presente invención en un medio de cultivo adecuado. Este método puede incluir además la etapa de aislar y/o purificar la proteína TSLP de la célula hospedadora cultivada o el medio de cultivo. La proteína TSLP aislada y/o purificada resultante o un fragmento antigénico de la misma también es parte de la presente invención.

Anticuerpos anti TSLP inducidos en un sistema de hibridoma por una vacuna de la presente invención, también son parte de la presente invención. En una realización de este tipo se emplea un mamífero o en un sistema de hibridoma de mamífero. En una realización particular, los anticuerpos se aíslan y/o purifican. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. De acuerdo con la invención un anticuerpo monoclonal inducido en una especie no canina puede modificarse técnicamente opcionalmente para caninizarse, de modo que sea mínimamente antigénico cuando se inyecte en un sujeto canino. En ciertas realizaciones preferidas, los dominios de unión de cualquier anticuerpo de acuerdo con la invención se convierten opcionalmente en fragmentos de unión más pequeños que el anticuerpo original, por ejemplo, mediante escisión y/o como una proteína de unión Fv, Fab y F(ab')₂ recombinante. También se incluyen en la invención proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de anticuerpos de cadena pesada de origen natural (por ejemplo, nanobodies®).

Además, en la presente invención también se incluyen sustitutos de anticuerpos que tienen una alta afinidad por TSLP y baja inmunogenicidad (por ejemplo, avímeros preparados a partir de partes de unión del receptor de TSLP). Los anticuerpos/avímeros anti TSLP canina de la invención pueden emplearse fácilmente en un método de tratamiento de síntomas alérgicos en un canino atópico que comprende administrar una cantidad eficaz de ese anticuerpo anti TSLP canino.

La presente descripción también describe una vacuna que comprende una cantidad eficaz de un inmunógeno no TSLP en combinación con una cantidad eficaz de proteína TSLP de la presente invención, uno o más fragmentos antigénicos de la misma, o combinaciones de la proteína de longitud completa y uno o más de dichos fragmentos. En una realización particular de este tipo, la proteína TSLP es una proteína TSLP canina. En una realización más particular, la proteína TSLP canina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

La presente invención proporciona adicionalmente métodos de diagnóstico que emplean la proteína TSLP canina de la invención, fragmentos de la misma y/o anticuerpos inducidos por TSLP canina y fragmentos de la misma. En una realización, la presente invención proporciona un método para diagnosticar dermatitis atópica en un canino que comprende obtener una muestra epidérmica del canino y determinar la presencia de la proteína TSLP canina en la muestra epidérmica.

Estos y otros aspectos de la presente invención se apreciarán mejor por referencia a las siguientes Figuras y la Descripción Detallada.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 ilustra análisis por SDS-PAGE de proteína del sistema de síntesis de proteínas sin células eucariota que expresa proteína TSLP canina. Carril 1: patrón proteico; Carril 2: proteína total; Carril 3: proteína soluble; Carril 4: proteína insoluble. Las bandas proteicas de TSLP están indicadas por flechas.

La FIGURA 2A ilustra análisis de transferencia de Western de proteína del sistema de síntesis de proteínas sin células eucariota que expresa proteína TSLP canina. La proteína se hizo reaccionar con Ab anti His (C Term)/AP de Invitrogen Carril 1: patrón proteico; Carril 2: proteína total; Carril 3: proteína soluble; Carril 4: proteína insoluble. Se detectó proteína TSLP canina en proteína total y proteína insoluble (como se indica por las flechas).

La FIGURA 2B ilustra el análisis de transferencia de Western de proteína del sistema de síntesis de proteínas sin células eucariota que expresa proteína TSLP canina. La proteína se hizo reaccionar con anticuerpos monoclonales de rata específicos para TSLP humana. Carril 1: patrón proteico; Carril 2: proteína total; Carril 3: proteína soluble; Carril 4: proteína insoluble (como se indica por flechas).

La FIGURA 3A ilustra la expresión y purificación de TSLP de células hospedadoras de *E. coli*, y muestra una banda de aproximadamente 61 kd que está presente en la fracción de *E. coli* soluble que representa una fusión entre TSLP canina y la proteína GST compañera de fusión y un marcador de 6 restos de histidina. "M" indica el patrón proteico (el mismo en todas las FIGURAS 3A-3D). El carril 1 y carril 2 son fracciones solubles de *E. coli* B121 (DE3) pLysS que contiene el plásmido 1265-93B sin y con inducción por IPTG, respectivamente. La flecha indica la banda proteica de fusión de GST-TSLP-His (la misma en todas las FIGURAS 3A-3D).

La FIGURA 3B muestra que la proteína de fusión marcada con GST-TSLP-His puede purificarse por resina de glutatión Sepharose 4B. Los carriles 1 a 3 representan diferentes fracciones de elución de resina de glutatión Sepharose 4B.

La FIGURA 3C muestra que la proteína de fusión de carril B puede purificarse adicionalmente usando resina de Ni-NTA. Esta figura ilustra la repurificación de proteína de fusión de GST-TSLP-His después de purificación de glutatión Sepharose 4B por resina Ni-NTA. El carril 1 es el flujo continuo, el carril 2 es la elución de resina Ni-NTA.

La FIGURA 3D ilustra una transferencia de Western de proteína de fusión de GST-TSLP-His y confirma que la proteína de fusión se reconoce por un anticuerpo anti-GST (GE Health Care Cat n.º 27457701).

La FIGURA 4 ilustra la tinción con FITC de una sección de un bloque incluido en parafina de tejido cutáneo lesional obtenido de perro n.º 10197 al que se diagnosticó dermatitis atópica. La sección se hizo reaccionar con anticuerpos policlonales anti TSLP humana de conejo y la reacción se visualizó con estreptavidina-FITC (fluoresceín isotiocianato). La intensidad de fluorescencia (áreas luminosas) indica unión de anticuerpos policlonales anti TSLP humana de conejo con TSLP presente en el tejido.

La FIGURA 5A ilustra tinción con inmunoperoxidasa de una sección de un bloque incluido en parafina de un tejido cutáneo lesional obtenido de un perro al que se diagnosticó dermatitis atópica. En esta sección, hay una tinción difusa [áreas oscuras] de área epidérmica de muestra de ensayo cutánea por anticuerpo monoclonal anti

TSLP humana de rata.

La FIGURA 5B ilustra una sección de control. La sección fue de un bloque incluido en parafina de tejido cutáneo lesional obtenido de un perro al que se diagnosticó dermatitis atópica que se trató solamente con un control tamponado con fosfato.

La FIGURA 6 ilustra el mapeo de epítomos de proteína TSLP canina con anticuerpo monoclonal anti TSLP humana de rata. Son picos de particular interés de los números de epítomo 22-26 (SEQ ID NO 29-33). Los epítomos 22-26 también se procesaron con derivatización N terminal (pico 55 y superior), para confirmar que el epítomo de unión no requiere el resto N terminal.

La FIGURA 7 ilustra una comparación de perro (SEQ ID NO: 32) y el análogo humano de epítomo 25 (SEQ ID NO: 3) de la secuencia peptídica de TSLP.

La FIGURA 8A ilustra la secuencia de ADN del gen de TSLP canino (SEQ ID NO: 1).

La FIGURA 8B ilustra el polipéptido de TSLP predicho expresado por la secuencia de ADN ilustrada por la FIGURA 8A (SEQ ID NO: 2). El asterisco marca el extremo N terminal de la secuencia señal inicial (restos 1-28) y los restos subrayados 71-92 (SEQ ID NO: 118) representa el dominio del que se determinaron los epítomos solapantes 22-26 de la Tabla 2.

Descripción detallada de la invención

La dermatitis atópica ("AD") es una enfermedad inflamatoria alérgica mediada por Th2. Esta enfermedad se manifiesta con muchas características clínicas similares en pacientes humanos y caninos. Es probable que la inmunopatogénesis de AD en perros sea comparable con AD en seres humanos con respecto a tipos celulares y citocinas implicadas en las lesiones cutáneas.

La unión del ligando de TARC (CCL22) con el receptor de quimiocina CC 4 (CCR4), que se expresa selectivamente en linfocitos Th2, induce migración selectiva de estas células a lesiones alérgicas. Se ha indicado que TARC y su receptor CCR4 están regulados positivamente en lesiones de piel con AD canina. Ya que TSLP es un fuerte inductor de TARC en seres humanos, se ha planteado la hipótesis de que TSLP podría estar presente en las lesiones de AD canina. Los anticuerpos inducidos contra TSLP humana se ensayaron por lo tanto en piel lesional de pacientes caninos con AD. La inmunohistoquímica de estas muestras cutáneas confirmó la presencia de antígeno reactivo con el anticuerpo anti-TSLP humana en las lesiones, como se ilustra en la FIGURA 4. Sin embargo, la tarea de identificar un ortólogo canino a los genes que codifican TSLP murina y humana demostró ser particularmente difícil debido al alto grado de divergencia de las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de TSLP en especies de mamífero, como se desvela en el presente documento.

La inmunización de un perro doméstico con una TSLP de la presente invención y/o uno o más fragmentos antigénicos de la misma, debería actuar para reducir los niveles de actividad TSLP endógena y por lo tanto, moderar, eliminar y/o prevenir uno o más síntomas atópicos, tales como los que surgen en asma y/o dermatitis atópica, en el perro inmunizado. Además, la proteína TSLP canina puede usarse como un inmunógeno para inducir anticuerpos anti TSLP canina para su uso como un reactivo de investigación y/o de diagnóstico en perros domésticos, o en otra especie de mamífero. Como alternativa, en casos particulares, la proteína TSLP canina y/o ácidos nucleicos que codifican la TSLP canina pueden actuar para regular positivamente elementos del sistema inmunitario de caninos con alteración del sistema inmunitario, por ejemplo, mediante activación de STAT o expresión de TARC, por ejemplo, en células hematopoyéticas.

Para apreciar más completamente la presente invención, se proporcionan las siguientes definiciones.

El uso de términos singulares por conveniencia en la descripción no pretende en ningún modo ser limitante de este modo. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a una composición que comprende "un polipéptido" incluye referencia a uno o más de dichos polipéptidos. Como se usa en el presente documento el término "aproximadamente" se usa indistintamente con la expresión "alrededor de" y significa que un valor está en un intervalo del veinte por ciento del valor indicado, es decir, un péptido que contiene "aproximadamente" 50 restos de aminoácidos puede contener entre 40 y 60 restos de aminoácidos.

La expresión "composición de unión" se refiere a moléculas que se unen con especificidad a TSLP canina, por ejemplo, en una interacción anticuerpo-antígeno. La especificidad puede ser más o menos inclusiva, por ejemplo, específica de una realización particular, o de grupos de realizaciones relacionadas, por ejemplo, TSLP canina y/o anticuerpos caninos.

Como se usa en el presente documento, el término "canino" incluye todos los perros domésticos, *Canis lupus familiaris* o *Canis familiaris*, a no ser que se indique de otro modo.

Como se usa en el presente documento, el término “polipéptido” se usa indistintamente con los términos “proteína” y “péptido” e indica un polímero que comprende dos o más aminoácidos conectados por enlaces peptídicos. El término “polipéptido” como se usa en el presente documento incluye un fragmento o segmento significativo, y abarca un tramo de restos de aminoácidos de al menos aproximadamente 8 aminoácidos, generalmente al menos aproximadamente 12 aminoácidos, normalmente al menos aproximadamente 16 aminoácidos, preferentemente al menos aproximadamente 20 aminoácidos y, en realizaciones particularmente preferidas, al menos aproximadamente 30 o más aminoácidos, por ejemplo, 35, 40, 45, 50, etc. Dichos fragmentos pueden tener extremos que comienzan y/o terminan en prácticamente todas las posiciones, por ejemplo, que comienzan en los restos 1, 2, 3, etc., y que terminan en, por ejemplo, 155, 154, 153, etc., en todas las combinaciones prácticas.

Opcionalmente, un polipéptido puede carecer de ciertos restos de aminoácidos que se codifican por un gen o por un ARNm. Por ejemplo, un gen o molécula de ARNm puede codificar una secuencia de restos de aminoácidos en el extremo N terminal de un polipéptido (es decir, una secuencia señal) que se escinde de y, por lo tanto, puede no ser parte de la proteína final.

Como se usa en el presente documento una secuencia de aminoácidos es 100 % “homóloga” de una segunda secuencia de aminoácidos si las dos secuencias de aminoácidos son idénticas, y/o difieren solamente en sustituciones neutras o conservativas como se define posteriormente. En consecuencia, una secuencia de aminoácidos es aproximadamente 80 % “homóloga” de una segunda secuencia de aminoácidos, si aproximadamente el 80 % de las dos secuencias de aminoácidos son idénticas, y/o difieren solamente en sustituciones neutras o conservativas.

Con frecuencia pueden sustituirse con restos de aminoácidos funcionalmente equivalentes restos dentro de las secuencias dando como resultado una sustitución de aminoácidos conservativa. Dichas alteraciones definen la expresión “una sustitución conservativa” como se usa en el presente documento. Por ejemplo, uno o más restos de aminoácidos dentro de la secuencia pueden sustituirse por otro aminoácido de una polaridad similar, que actúa como un equivalente funcional, dando como resultado una alteración silenciosa. Las sustituciones para un aminoácido dentro de la secuencia pueden seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos que contienen estructuras de anillos aromáticos son fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. No se esperará que dichas alteraciones afecten al peso molecular aparente como se determina por electroforesis en gel de poliacrilamida, o punto isoeléctrico.

Son sustituciones conservativas particularmente preferidas: Lys por Arg y viceversa de modo que pueda mantenerse una carga positiva; Glu por Asp y viceversa de modo que pueda mantenerse una carga negativa; Thr por Ser de modo que pueda mantenerse un -OH libre y Asn por Gln de modo que pueda mantenerse un NH₂ libre. Los aminoácidos también pueden colocarse en los siguientes grupos similares: (1) prolina, alanina, glicina, serina y treonina; (2) glutamina, asparagina, ácido glutámico y ácido aspártico; (3) histidina, lisina y arginina; (4) cisteína; (5) valina, leucina, isoleucina, metionina; y (6) fenilalanina, tirosina y triptófano.

En una realización relacionada, pueden identificarse dos secuencias de ADN altamente homólogas por su propia homología, o la homología de los aminoácidos que codifican. Dicha comparación de las secuencias puede realizarse software convencional disponible en bancos de datos de secuencias. En una realización particular dos secuencias de ADN altamente homólogas codifican secuencias de aminoácidos que tiene aproximadamente 80 % de identidad, más preferentemente aproximadamente 90 % y aún más preferentemente aproximadamente 95 % de identidad. Más particularmente, dos secuencias de aminoácidos altamente homólogas tienen aproximadamente 80 % de identidad, aún más preferentemente aproximadamente 90 % de identidad y aún más preferentemente aproximadamente 95 % de identidad.

Como se usa en el presente documento, el porcentaje de identidad de secuencia de proteína y ADN puede determinarse usando software tal como MacVector v9 disponible en el mercado de Accelrys (Burlington, Massachusetts) y el algoritmo Clustal W con los parámetros de alineamiento por defecto y parámetros por defecto para identidad. Véase, por ejemplo, Thompson, *et al.*, 1994. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680. ClustalW puede descargarse libremente para plataformas Dos, Macintosh y Unix de, por ejemplo, EMBL, el Instituto de Bioinformática Europeo. El presente enlace de descarga se encuentra en <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. Estos y otros programas disponibles también pueden usarse para determinar la similitud de secuencia usando parámetros por defecto iguales o análogos.

Un “polinucleótido” o una “molécula de ácido nucleico” es una molécula que comprende nucleótidos incluyendo, pero sin limitación, ARN, ADNc, ADN genómico e incluso secuencias de ADN sintético. También se contempla que las expresiones abarcan moléculas de ácido nucleicos que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos en la técnica de ADN y ARN.

La presente invención proporciona ácidos nucleicos que hibridan como secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas TSLP de la presente invención. Una molécula de ácido nucleico es "hibridable" con otra molécula de ácido nucleico, tal como un ADNc, ADN genómico o ARN, cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede hibridar con la otra molécula de ácido nucleico en las condiciones apropiadas de temperatura y potencia iónica en solución [véase Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor L. I. (2000)].

Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad corresponden a la T_m mayor, por ejemplo, formamida al 50 %, SSC 5X o 6X. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, son posibles desapareamientos entre bases. La rigurosidad apropiada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación, variables bien conocidas en la técnica. Cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de T_m para híbridos de ácidos nucleicos que tengan esas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a mayor T_m) de hibridaciones de ácido nucleico se reduce en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han derivado ecuaciones para calcular T_m [véase Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor L. I. (2000)]. Para hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de desapareamiento se hace más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad.

Preferentemente una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable es de al menos aproximadamente 12 nucleótidos; más preferentemente al menos aproximadamente 18 nucleótidos; aún más preferentemente la longitud es de al menos aproximadamente 24 nucleótidos; y más preferentemente al menos aproximadamente 36 nucleótidos. En una realización específica, la expresión "condiciones de hibridación convencionales" se refiere a una T_m de 55 °C, y utiliza condiciones como las expuestas anteriormente. En otra realización específica las condiciones rigurosas significan que la T_m es 65 °C para condiciones tanto de hibridación y como de lavado, respectivamente.

Una "secuencia codificante" de ADN o una "secuencia que codifica" una proteína o un péptido particular, es una secuencia de ADN que se transcribe y traduce a un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de elementos reguladores apropiados.

Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de partida en el extremo 5' y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificante puede incluir, pero sin limitación, secuencias procariotas, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, de mamífero), e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una secuencia de terminación de la transcripción se localizará habitualmente 3' de la secuencia codificante.

"Unido operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes descritos de este modo se configuran para realizar su función habitual. Por lo tanto, los elementos de control unidos operativamente con una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. No es necesario que los elementos de control sean contiguos con la secuencia codificante, siempre que actúen para dirigir la expresión de la misma. Por lo tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias no traducidas pero transcritas entre un promotor y la secuencia codificante y el promotor aún puede considerarse "unido operativamente" a la secuencia codificante.

Una "secuencia de nucleótidos heteróloga" como se usa en el presente documento es una secuencia de nucleótidos que se añade a una secuencia de nucleótidos de la presente invención por métodos recombinantes para formar un ácido nucleico que no se forma de forma natural en la naturaleza. Dichos ácidos nucleicos pueden codificar proteínas de fusión (por ejemplo, quiméricas). Por lo tanto la secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar péptidos y/o proteínas que contienen propiedades reguladoras y/o estructurales. En otra de dichas realizaciones la secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar una proteína o un péptido que actúa como un medio para detectar la proteína o el péptido codificado por la secuencia de nucleótidos de la presente invención después de expresarse el ácido nucleico recombinante. En otra realización más la secuencia de nucleótidos heteróloga puede actuar como un medio para detectar una secuencia de nucleótidos de la presente invención. Una secuencia de nucleótidos heteróloga puede comprender secuencias no codificantes incluyendo sitios de restricción, sitios reguladores, promotores y similares.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "proteína de fusión" y "péptido de fusión" se usan indistintamente y abarcan "proteínas quiméricas y/o péptidos quiméricos" y "proteínas/péptidos de proteína de fusión". Una proteína de fusión comprende al menos una parte de una proteína TSLP canina de la presente invención unida mediante un enlace peptídico con al menos una parte de otra proteína, por ejemplo una proteína TSLP no canina, y/o comprende una combinación de dos o más partes no contiguas de la proteína TSLP canina, por ejemplo, epítomos, que no aparecen de forma natural en orden secuencial adyacente en el polipéptido de TSLP canino (por ejemplo, un péptido de fusión de diez restos de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos 71-75 y 101-105 de SEQ ID NO: 2 combinado en un enlace peptídico). En realizaciones preferidas la parte o las partes de la proteína TSLP canina es funcional, por ejemplo, conserva su antigenicidad. Las proteínas de fusión también pueden

comprender una proteína marcadora, o una proteína que ayuda en el aislamiento y/o la purificación (por ejemplo, un marcador FLAG, véase ejemplos posteriores) y/o antigenicidad de una proteína TSLP canina de la presente invención. Las secuencias de TSLP no canina pueden ser amino o carboxilo terminales de las secuencias de TSLP caninas.

5 Una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína de fusión de la presente invención, por ejemplo, puede comprender una secuencia codificante de al menos una parte de una proteína TSLP no canina unida en fase con la secuencia codificante de TSLP canina, y puede codificar además un sitio de escisión para una proteasa específica, por ejemplo, trombina o Factor Xa, preferentemente en o cerca del punto de unión entre la secuencia de TSLP canina y la secuencia de TSLP no canina. En una realización específica, la proteína de fusión se expresa en una célula procariota. Dicha proteína de fusión puede usarse para aislar la TSLP canina de la presente invención, mediante el uso de una columna de afinidad que es específica para la proteína y/o un marcador fusionado con la TSLP canina (véase Ejemplos posteriores). La TSLP canina purificada, por ejemplo, puede después liberarse de la proteína de fusión mediante el uso de una enzima proteolítica y un sitio de escisión tal como se ha hecho referencia anteriormente.

20 Un "vector" o "vector de replicación" es un replicón, tal como un plásmido, virus, fago o cósmido, al que puede unirse o incorporarse otro segmento de ADN para provocar la replicación del segmento unido. La expresión también incluye un replicón que incluye el segmento de ADN de interés incorporado o unido.

25 Los vectores que pueden usarse en la presente invención incluyen plásmidos microbianos, virus, bacteriófagos, fragmentos de ADN integrables y otros vehículos que pueden facilitar la integración de los ácidos nucleicos en el genoma del hospedador. Los plásmidos son el vector más habitualmente usado, pero todos los otros vectores que cumplen una función equivalente y que son o se han hecho conocidos en la técnica son adecuados para su uso en el presente documento. [Véase, por ejemplo, Pouwels *et al.*, Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985 y Suplementos, Elsevier, N. Y., y Rodriguez *et al.* (eds.), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, 1988, Butterworth, Boston, MA].

30 La inserción de ADN que codifica la proteína TSLP canina de la invención en un vector se consigue fácilmente cuando los extremos tanto del ADN como del vector comprenden sitios de restricción compatibles. Si esto no puede realizarse, puede ser necesario modificar los extremos del ADN y/o el vector digiriendo salientes de ADN monocatenarios generados por escisión por endonucleasa de restricción para producir extremos romos, o conseguir el mismo resultado rellenando los extremos monocatenarios con una ADN polimerasa apropiada. Como alternativa, pueden producirse sitios deseados, por ejemplo, ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) en los extremos. Dichos enlazadores pueden comprender secuencias oligonucleotídicas específicas que definen sitios de restricción deseados. También pueden generarse sitios de restricción mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase, por ejemplo, Saiki *et al.*, Science 239: 487 (1988). También puede modificarse el vector escindido y los fragmentos de ADN, si se requiere, mediante formación de colas homopoliméricas.

40 Los vectores de expresión recombinantes usados en la presente invención son normalmente construcciones de ADN o ARN autorreplicativas que comprenden ácidos nucleicos que codifican una proteína TSLP canina de la presente invención y/o un fragmento antigénico de la misma, habitualmente unidos operativamente con elementos de control genético adecuados que son capaces de regular la expresión de los ácidos nucleicos en células hospedadoras compatibles. Los elementos de control genético pueden incluir un sistema promotor procariota o un sistema de control de la expresión promotor eucariota, y normalmente incluyen un promotor de la transcripción, un operador opcional para controlar la aparición de la transcripción, potenciadores de la transcripción para elevar el nivel de expresión de ARNm, una secuencia que codifica un sitio de unión a ribosomas adecuado y secuencias que terminan la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión también pueden contener un origen de replicación que permite que el vector se replique independientemente de la célula hospedadora.

50 La expresión de ácidos nucleicos que codifican la proteína TSLP canina de la invención puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales en células procariotas o eucariotas.

55 Una "célula hospedadora" es una célula que contiene, o es capaz de contener, y expresar, una molécula de ácido nucleico exógena, bien de forma transitoria o bien de forma permanente. Una célula se ha "transformado" por ADN exógeno cuando dicho ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. El ADN exógeno puede estar o no integrado (unido covalentemente) en ADN cromosómico que compone el genoma de la célula. En procariotas y levaduras, por ejemplo, el ADN exógeno puede mantenerse en un elemento episómico, tal como un plásmido. Con respecto a células eucariotas, una célula transformada de forma estable es una en la que el ADN exógeno se ha integrado en el cromosoma de modo que se herede por células hijas mediante replicación de cromosomas. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones comprendidos por una población de células descendientes que contienen el ADN exógeno.

65 Los procariotas incluyen organismos tanto gram positivos como gram negativos, por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*. Los eucariotas incluyen líneas celulares de cultivo tisular establecidas de células animales, tanto de origen distinto de mamífero, por ejemplo, células de insecto, como aves, y origen de mamífero, por ejemplo, ser humano, primates y

roedores.

Los sistemas de vector-hospedador procariota incluyen una amplia diversidad de vectores para muchas especies diferentes. Los vectores para amplificar el ADN incluyen pBR322 o muchos de sus derivados, o el vector de expresión pET42b(+) (Novagen).

Las secuencias de control de la expresión procariotas normalmente usadas incluyen promotores, incluyendo los derivados de los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang *et al.*, *Nature*, 198: 1056 (1977)], por ejemplo, serie pUC, el sistema promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 8: 4057 (1980)], por ejemplo, (pBR322-*trp*), el sistema de promotor P_L lambda [Shimatake *et al.*, *Nature*, 292: 128 (1981)], promotores lambda-pP o pR (pOTS), promotores inducibles por arabinosa (*InVitrogen*), el promotor de tac [De Boer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 292: 128 (1983)], promotor de *lpp* (la serie pIN); o promotores híbridos tales como p_{tac} (pDR540). En la técnica se conocen, y están disponibles en el comercio, numerosos otros vectores de expresión que contienen dichas secuencias de control. [Véase también, Brosius *et al.*, "Expression Vectors Employing Lambda-, *trp*-, *lac*-, and *lpp*-derived Promoters", en Rodriguez y Denhardt (eds.) *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, 1988, Butterworth, Boston, pp. 205-236].

Vectores genéricamente equivalentes a los apropiados para *E. coli*, que pueden usarse en otros procariotas, también pueden usarse para expresar las proteínas TSLP de la presente invención.

También se contemplan levaduras, así como células de cultivo tisular eucariotas superiores, como hospedadores para la producción recombinante de la proteína TSLP canina de la invención, y/o anticuerpos anti-TSLP canina y/o fragmentos de esos anticuerpos. Aunque podría usarse cualquier línea celular de cultivo tisular eucariota superior, incluyendo sistemas de expresión de baculovirus de insectos, se prefieren células de mamífero. La transformación o transfección y propagación de dichas células se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas celulares útiles incluyen células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), líneas celulares de riñón de cría de rata (BRK), líneas celulares de insecto (por ejemplo SF9), líneas celulares de aves (por ejemplo DF-11), células de riñón bovino Madin-Darby (MDBK), líneas celulares de riñón canino Madin-Darby (MDCK), células Vero, líneas celulares HEK-293 y líneas celulares de mono (COS).

Los vectores de expresión para dichas líneas celulares incluyen habitualmente, por ejemplo, un origen de replicación, un promotor, un sitio de inicio de la traducción, sitios de corte y empalme de ARN (si se usa ADN genómico), un sitio de poliadenilación y un sitio de terminación de la transcripción. Estos vectores también contienen habitualmente un gen de selección o gen de amplificación. Los vectores de expresión adecuados pueden ser plásmidos, virus o retrovirus que portan promotores derivados, por ejemplo, de fuentes tales como adenovirus, SV40, parvovirus, virus vaccinia o citomegalovirus. Los ejemplos representativos de vectores de expresión adecuados incluyen 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 y derivados de los mismos, y vectores de baculovirus, tales como pAC 373 o pAC 610.

Una vez expresada, la TSLP canina de la invención puede purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna y similares (véase, en general, R. Scopes, *PROTEIN PURIFICATION*, Springer-Verlag, N. Y. (1982)). Se prefieren composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90 a 95 % de homogeneidad, y se prefieren más para usos farmacéuticos de 98 a 99 % o más de homogeneidad. La purificación puede ser parcial, o hasta la homogeneidad según se desee. Si la TSLP canina va a usarse de forma terapéutica, la proteína debería estar sustancialmente libre de endotoxina. La purificación selectiva de TSLP expresada en una columna de anticuerpo anti TSLP unido, o en una columna de receptor de TSLP unido son estrategias disponibles para obtener proteína TSLP canina altamente purificada.

Se conocen bien en la técnica métodos para purificación. Por ejemplo, pueden purificarse ácidos nucleicos por precipitación, cromatografía, ultracentrifugación y otros medios. Pueden purificarse proteínas y polipéptidos, así como péptidos, por diversos métodos incluyendo, sin limitación, electroforesis en gel de disco preparatorio, isoelectroenfoque, HPLC, HPLC de fase inversa, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y partición, cromatografía por precipitación y precipitación de proteínas por adición de sal, extracción y distribución contracorriente. Para algunos fines, es preferible producir el polipéptido en un sistema recombinante en el que la proteína contiene un marcador de secuencia adicional que facilita la purificación, tal como, pero sin limitación, una secuencia de polihistidina o una secuencia que se une específicamente a un anticuerpo, tal como FLAG[®] y GST. El polipéptido puede purificarse después a partir de un lisado en bruto de la célula hospedadora por cromatografía en una matriz de fase sólida apropiada. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos, o fragmentos de unión de los mismos, producidos contra el polipéptido como reactivos de purificación.

El disolvente y los electrolitos serán habitualmente un tampón biológicamente compatible, de un tipo usado para conservación de actividades biológicas, y habitualmente se aproximará a un disolvente acuoso fisiológico. Habitualmente el disolvente tendrá un pH neutro, normalmente entre aproximadamente 5 y 10, y preferentemente aproximadamente 7,5. En algunas ocasiones, se añadirán uno o más detergentes, normalmente uno suave no

desnaturalizante, por ejemplo, CHS (coesterol hemisuccinato) o CHAPS (3- [3 colamidopropil] dimetilamonio]-1-propano sulfonato), o una concentración suficientemente baja para evitar la alteración significativa de las propiedades estructurales o fisiológicas de la proteína. En otros casos, puede usarse un detergente duro para efectuar desnaturalización significativa.

5 Como alternativa, pueden aislarse proteínas heterólogas funcionales de *E. coli* u otras bacterias a partir de cuerpos de inclusión por medio de solubilización usando desnaturalizantes fuertes y replegamiento posterior. Los desnaturalizantes conocidos en la técnica incluyen, simplemente como ejemplo, urea, tiocianato de potasio, guanidina HCl ("GuHCl"), yodato potásico y/o yoduro sódico y combinaciones de estos. Preferentemente, se emplea GuHCl como un agente reductor, por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 M de concentración, en condiciones alcalinas, por ejemplo, aproximadamente pH 8. Opcionalmente se emplea otro agente reductor, ditioneitol ("DTT"), bien solo o bien en combinación con GuHCl. Cuando se emplea DTT, la concentración varía, simplemente como ejemplo, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 0,5 mM de DTT. Durante la etapa de solubilización, como se conoce bien en la técnica, un agente reductor debe estar presente para separar o desnaturalizar los enlaces disulfuro. Un tampón reductor a modo de ejemplo es: Tris 0,1 M pH 8,0, guanidina 6 M, EDTA 2 mM y DTE 0,3 M (ditioeritritol).

20 La renaturalización se consigue normalmente mediante dilución (por ejemplo, 100 veces) de la proteína desnaturalizada y reducida en un tampón de replegamiento, en presencia de un agente oxidante. Puede emplearse cualquier agente oxidante adecuado conocido en la técnica, siempre que permita el replegamiento correcto en buenos rendimientos. Por ejemplo, puede proporcionarse oxidación y replegamiento por reactivos de tior de bajo peso molecular en forma reducida y oxidada, como se describe en Saxena, *et al.*, 1970, *Biochemistry* 9: 5015-5021, incorporada por referencia en el presente documento, y especialmente como se describe en Buchner, *et al.*, mencionado anteriormente. La renaturalización se consigue normalmente por dilución (por ejemplo, 100 veces) de la proteína desnaturalizada y reducida en un tampón de replegamiento. Un tampón de replegamiento a modo de ejemplo es: Tris HCl 100 mM, pH 10,0, EDTA 25 mM, NaCl 0,1 M, GSSG 551 mg/l, arginina 0,5 M. GSSG es la forma oxidada de glutatión.

30 El tamaño y la estructura del polipéptido deberían en general estar en un estado sustancialmente estable, y habitualmente no en un estado desnaturalizado. El polipéptido puede asociarse con otros polipéptidos en una estructura cuaternaria, por ejemplo, para conferir solubilidad, o asociarse con lípidos o detergentes.

35 Sustancialmente puro, por ejemplo, en un contexto de proteínas, normalmente significa que la proteína está libre de otras proteínas contaminantes, ácidos nucleicos u otros productos biológicos derivados del organismo fuente original. La pureza puede ensayarse mediante métodos convencionales, normalmente en peso, y habitualmente será al menos aproximadamente 40 % puro, generalmente al menos aproximadamente 50 % puro, con frecuencia al menos aproximadamente 60 % puro, normalmente al menos aproximadamente 80 % puro, preferentemente al menos aproximadamente 90 % puro y, en las realizaciones más preferidas, al menos aproximadamente 95 % puro. Se añadirán con frecuencia vehículos o excipientes. La pureza puede evaluarse por cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de composición, ensayo biológico y otros métodos conocidos en la técnica. Desde el punto de vista funcional, una proteína TSLP canina aislada de acuerdo con la invención es una suficientemente separada de otros materiales, incluyendo proteína TSLP precursora y/o proteína TSLP canina madura, para poder inducir una respuesta inmunitaria que sea específica para la proteína TSLP canina.

45 La solubilidad de un polipéptido o fragmento depende del ambiente y el polipéptido. Muchos parámetros afectan a la solubilidad del polipéptido, incluyendo temperatura, ambiente de electrolitos, tamaño y características moleculares del polipéptido y naturaleza del disolvente. Normalmente, la temperatura a la que se usa el polipéptido varía de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 65 °C. Habitualmente la temperatura es mayor de aproximadamente 18 °C. Para fines de diagnóstico, la temperatura será aproximadamente temperatura ambiente o más cálida, pero menor que la temperatura de desnaturalización de componentes en el ensayo. Para fines terapéuticos, la temperatura será habitualmente temperatura corporal, normalmente aproximadamente 36 °C a 40 °C (por ejemplo, aproximadamente 39 °C para un perro) aunque en ciertas situaciones la temperatura puede elevarse o reducirse in situ o *in vitro*.

55 Como se usa en el presente documento la expresión "fragmento antigénico" con respecto a una proteína particular es un fragmento de esa proteína (incluyendo fragmentos grandes que carecen de tan poco como un único aminoácido de la proteína de longitud completa) que es antigénico, es decir, capaz de interaccionar específicamente con una molécula de reconocimiento de antígenos del sistema inmunitario, tal como una inmunoglobulina (anticuerpo) o un receptor de antígeno de linfocitos T. Por ejemplo, un fragmento antigénico de la TSLP canina de la presente invención es un fragmento de la TSLP canina que es antigénico. No es necesario que dichos fragmentos sean en sí mismos inmunogénicos, es decir, capaces de inducir una respuesta inmunitaria sin un vehículo, siempre que puedan usarse para generar un anticuerpo para la proteína TSLP después de conjugar el fragmento con una molécula vehículo para inmunización. Preferentemente, sin embargo, un fragmento antigénico de la presente invención es inmunodominante para reconocimiento de anticuerpos y/o receptores de linfocitos T.

65

En una realización particular un fragmento antigénico de la TSLP canina contiene entre 5 y 150 restos de aminoácidos. En una realización particular el fragmento antigénico de la TSLP canina contiene más de 120 restos de aminoácidos. En otra realización un fragmento antigénico de la TSLP canina contiene entre 10 y 120 restos de aminoácidos. En otra realización más el fragmento antigénico de la TSLP canina contiene entre 20 y 100 restos de aminoácidos. En otra realización más un fragmento antigénico de la TSLP canina contiene entre 25 y 75 restos de aminoácidos.

Un fragmento antigénico de la TSLP canina puede obtenerse a partir de una fuente recombinante, de una proteína aislada de fuentes naturales o mediante síntesis química. Además, puede obtenerse un fragmento antigénico después de la digestión proteolítica de la TSLP canina, o un fragmento de la misma, mediante expresión recombinante, o como alternativa, puede generarse de novo, por ejemplo, mediante síntesis peptídica.

Vacunas

La descripción describe además vacunas que incluyen una cantidad eficaz de una proteína TSLP de la presente invención, uno o más fragmentos antigénicos de la misma, o combinaciones de la proteína de longitud completa y uno o más de dichos fragmentos. Por ejemplo, pueden incorporarse proteínas TSLP caninas y/o fragmentos de las mismas, tales como las enumeradas en la Tabla 2, posterior, en cualquier composición de vacuna compatible con proteína o péptido. Dichas composiciones de vacuna se conocen bien en la técnica y pueden incluir, pero no incluyen necesariamente, por ejemplo, tampones fisiológicamente compatibles y solución salina y similares, así como adyuvantes farmacéuticamente aceptables tales como CARBOPOL® o Emulsigen®.

La composición de vacuna puede emplearse para inducir anticuerpos anti TSLP endógenos en un sujeto canino que lo necesite, por ejemplo, para tratar señales clínicas de una enfermedad o un trastorno que es sensible a la regulación negativa de la actividad de TSLP en un sujeto canino. Como alternativa, o junto con lo mismo, una vacuna como se ha descrito también puede usarse para inducir antisuero para explorar y/o identificar TSLP canina, por ejemplo, como una ayuda en un kit de ensayo para identificar caninos que sobreexpresan TSLP.

Pueden usarse péptidos de TSLP tales como los desvelados en la Tabla 2 posterior, y variantes de los mismos, como inmunógenos, bien individualmente o bien en diversas combinaciones. Dichos péptidos pueden unirse opcionalmente entre sí y/o con proteínas mayores conocidas como vehículos, mediante técnicas de ADN químicas o recombinantes. Los vehículos actúan para potenciar el reconocimiento de péptidos por animales hospedadores como diana de la respuesta inmunitaria y aumentar la inmunogenicidad de péptidos de TSLP. Se conocen en la técnica varios vehículos, e incluyen toxoide del tétanos o el fragmento C no tóxico de la toxina del tétanos, toxoide de la difteria, proteína PhoP, hemocianina de lapa californiana (KLH), beta galactosidasa, proteína gD del virus VHB-1, proteína G del virus de la rabia, proteína F del virus del moquillo y vehículos sintéticos tales como los producidos por polimerización de epítopos de linfocitos T "universales" conocidos.

Pueden seleccionarse péptidos de TSLP útiles como inmunógenos de los de la Tabla 2, y variantes de los mismos, usando algoritmos conocidos que evalúan atributos tales como accesibilidad a la superficie en la proteína TSLP nativa, hidrofilia, movilidad atómica y antigenicidad. También pueden seleccionarse epítopos de péptidos enumerados en la Tabla 2, y variantes de los mismos basándose en su reactividad con anticuerpos policlonales o monoclonales que reaccionan con proteínas TSLP nativas y especialmente los anticuerpos que son capaces de neutralizar la bioactividad de TSLP. Dichos antígenos pueden incluir péptidos sintéticos preparados a partir de las secuencias desveladas en el presente documento que emplean tecnología de síntesis peptídica convencional y/o como alternativa pueden ser fragmentos obtenidos de proteína TSLP recombinante o natural.

Pueden obtenerse adyuvantes farmacéuticamente aceptables de la presente invención a partir de cualquiera de varias fuentes incluyendo de fuentes naturales, fuentes recombinantes y/o sintetizarse químicamente, etc. Los ejemplos de compuestos químicos usados como adyuvantes incluyen, pero sin limitación, compuestos de aluminio, aceites metabolizables y no metabolizables, polímeros en bloque, ISCOM (complejos inmunoestimulantes), vitaminas y minerales (incluyendo pero sin limitación: vitamina E, vitamina A, selenio y vitamina B12), y Quil A (saponinas). Adyuvante completo de Freund, polímeros de ácido acrílico reticulados con polialquenoil éteres o divinilglicol, como se venden con la marca comercial CARBOPOL® (por ejemplo, CARBOPOL® 941) y gotas de aceite de tamaño micrométrico dispersadas uniformemente en emulsión de agua (por ejemplo, como se vende con la marca comercial Emulsigen®). Ejemplos adicionales de adyuvantes, que en ocasiones se han indicado específicamente como estimulantes inmunitarios, incluyen componentes de la pared celular bacteriana y fúngica (por ejemplo, lipopolisacáridos, lipoproteínas, glucoproteínas, muramilpéptidos, beta-1,3/1,6-glucanos), diversos carbohidratos complejos derivados de plantas (por ejemplo, glucanos, acemanano), diversas proteínas y péptidos derivados de animales (por ejemplo, hormonas, citocinas, factores coestimulantes) y nuevos ácidos nucleicos derivados de virus y otras fuentes (por ejemplo, ARN bicatenario, CpG). Además, cualquier variedad de combinaciones de las sustancias anteriormente mencionadas pueden proporcionar un efecto adyuvante, y por lo tanto, puede formar un adyuvante de la presente invención.

Las vacunas como se describen pueden administrarse por cualquier vía incluyendo: inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intradérmica, administración oral, administración intranasal

combinaciones de las mismas.

Anticuerpos

5 La presente invención también incluye anticuerpos policlonales y monoclonales (mAb) que se unen específicamente a la proteína TSLP canina de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina y/o fragmentos de la misma. Una inmunoglobulina de origen natural consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como los múltiples genes de región variable de inmunoglobulina. Un anticuerpo o anticuerpos de acuerdo con la invención también abarcan fragmentos de anticuerpo, es decir, fragmentos de unión a antígeno, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab')₂, proteínas de unión monocatenarias modificadas técnicamente, por ejemplo, Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-5883 (1988) y Bird *et al.*, Science, 242, 423-426 (1988), así como anticuerpos híbridos bifuncionales (por ejemplo, Lanzavecchia *et al.*, Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). Véase, en general, Hood *et al.*, Immunology, Benjamin, N. Y., 2ª ed. (1984), Harlow y Lane, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) y Hunkapiller y Hood, Nature, 323, 15-16 (1986).

Por ejemplo, puede usarse directamente suero producido de animales inmunizados por la proteína TSLP canina de la invención, usando métodos convencionales, o la fracción de IgG puede separarse del suero usando métodos convencionales, tales como plasmaféresis o cromatografía de adsorción con adsorbentes específicos de IgG, tales como proteína A o proteína G inmovilizada. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos monoclonales y, opcionalmente, fragmentos de unión a antígeno o proteínas de unión recombinantes derivadas de dichos mAb. Dichos mAb o fragmentos de los mismos pueden opcionalmente humanizarse, o caninizarse por métodos conocidos en la técnica o modificaciones directas de los mismos, respectivamente.

25 Como se usa en el presente documento, un anticuerpo de TSLP canina "específico de epítipo" es un anticuerpo que se induce contra un fragmento de TSLP canina que comprende un epítipo que comprende una o más de las siguientes cinco secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34; y que se une además a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y/o una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, excluyendo la secuencia señal de 28 restos de aminoácidos. En una realización particular, el anticuerpo de TSLP canino específico de epítipo es un anticuerpo monoclonal.

Se producen hibridomas que producen mAb que se unen selectivamente a la proteína TSLP canina de la invención por técnicas bien conocidas. Habitualmente, el proceso implica la fusión de una línea celular inmortalizante con un linfocito B que produce el anticuerpo deseado. Como alternativa, pueden usarse técnicas distintas de fusión para generar líneas celulares productoras de anticuerpos inmortales, por ejemplo, transformación inducida por virus [Casali *et al.*, Science 234: 476 (1986)]. Las líneas celulares inmortalizantes son habitualmente células mamíferas transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Más frecuentemente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o de ratón por conveniencia y disponibilidad.

Se conocen bien técnicas para obtener linfocitos productores de anticuerpos de mamíferos a los que se han inyectado antígenos. En general, se usan linfocitos de sangre periférica (PBL) si se emplean células de origen humano, o se usan células del bazo o ganglios linfáticos a partir de fuentes de mamíferos no humanos. Se inyecta a un animal hospedador dosis repetidas del antígeno purificado (se sensibilizan células humanas *in vitro*) y se permite que el animal genere las células productoras de anticuerpos deseadas antes de recogerse para fusión con la línea celular inmortalizante. También se conocen bien en este campo técnicas para fusión y, en general, implican mezclar las células con un agente de fusión, tal como polietilenglicol.

Se seleccionan hibridomas por procedimientos convencionales, tales como selección de HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina). Las que secretan el anticuerpo deseado se seleccionan usando inmunoensayos convencionales, tales como transferencia de Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo) o similares. Se recuperan anticuerpos del medio usando técnicas de purificación de proteínas convencionales [Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Ámsterdam, 1985)].

55 Están disponibles muchas referencias para proporcionar orientación en la aplicación de las técnicas anteriores [Kohler *et al.*, Hybridoma Techniques (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1980); Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Ámsterdam, 1985); Campbell, Monoclonal Antibody Technology (Elsevier, Ámsterdam, 1984); Hurrell, Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications (CRC Press, Boca Raton, FL, 1982)]. También pueden producirse anticuerpos monoclonales usando sistemas de bibliotecas de fagos bien conocidos [véase, por ejemplo, Huse, *et al.*, Science 246: 1275 (1989); Ward, *et al.*, Nature, 341: 544 (1989)].

Pueden usarse anticuerpos producidos de este modo, bien policlonales o bien monoclonales, por ejemplo, en una forma inmovilizada unida a un soporte sólido por métodos bien conocidos para purificar la proteína TSLP canina por cromatografía de inmunoafinidad.

También pueden usarse anticuerpos contra la proteína TSLP canina, no marcada o marcada por métodos convencionales, como la base de inmunoensayos para detectar o cuantificar proteína TSLP canina. El marcador particular usado dependerá del tipo de inmunoensayo. Los ejemplos de marcadores que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, radiomarcadores, tales como ^{32}P , ^{125}I , ^3H y ^{14}C ; marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo y umbeliferona; quimioluminiscentes, tales como luciferina y 2,3-dihidroftalazinadionas; y enzimas, tales como peroxidasa de rábano rústico, fosfatasa alcalina, lisozima y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Los anticuerpos pueden marcarse con dichos marcadores por métodos conocidos. Por ejemplo, pueden usarse agentes de acoplamiento tales como aldehídos, carbodiimidas, dimaleimida, imidatos, succinimidas, benzadina de bisdiazotizado y similares para marcar los anticuerpos con marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes o enzimáticos. Los métodos generales implicados se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Immunoassay: A Practical Guide*, 1987, Chan (Ed.), Academic Press, Inc., Orlando, FL. Dichos inmunoensayos pueden llevarse a cabo, por ejemplo, en fracciones obtenidas durante la purificación de los receptores.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse para identificar clones de ADNc particulares que expresan proteína TSLP canina en sistemas de clonación de expresión. También pueden usarse anticuerpos neutralizantes específicos para el sitio de unión a ligando de un receptor como antagonistas (inhibidores) para bloquear o regular negativamente la función de proteínas TSLP caninas. Dichos anticuerpos neutralizantes pueden identificarse fácilmente mediante experimentación rutinaria.

Puede conseguirse antagonismo de la actividad de la proteína TSLP canina usando moléculas de anticuerpos completas, o fragmentos de unión a antígeno bien conocidos tales como fragmentos Fab, Fc, F(ab)₂ y Fv. Pueden encontrarse definiciones de dichos fragmentos como se ha descrito anteriormente en el presente documento, o, por ejemplo, en Klein, *Immunology* (John Wiley, Nueva York, 1982); Parham, Capítulo 14, en Weir, ed. *Immunochemistry*, 4ª Ed. (Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 1986). El uso y la generación de fragmentos de anticuerpos también se ha descrito, por ejemplo: fragmentos Fab [Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays* (Elsevier, Ámsterdam, 1985)], fragmentos Fv [Hochman *et al.*, *Biochemistry* 12: 1130 (1973); Sharon *et al.*, *Biochemistry* 15: 1591 (1976); Ehrlich *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.355.023] y medias moléculas de anticuerpo (Auditor-Hargreaves, Patente de Estados Unidos n.º 4.470.925). Se han descrito adicionalmente métodos para realizar fragmentos Fv recombinantes basándose en secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de anticuerpo conocidas, por ejemplo, en Moore *et al.* (Patente de Estados Unidos n.º 4.642.334) y en Plückerthun [*Bio/Technology* 9: 545 (1991)]. Como alternativa, pueden sintetizarse químicamente por métodos convencionales.

La presente invención también abarca anticuerpos antiidiotípicos, tanto policlonales como monoclonales, que se producen usando los anticuerpos anteriormente descritos como antígenos. Estos anticuerpos son útiles por que pueden imitar las estructuras de los ligandos.

Pueden obtenerse técnicamente anticuerpos generados a partir de mamíferos no caninos o sistemas de hibridoma no caninos para hacerlos sustancialmente no antigénicos cuando se inyectan en caninos, es decir, pueden caninizarse. El proceso de modificación de un anticuerpo monoclonal de un animal para hacerlo menos inmunogénico para administración terapéutica a seres humanos (humanización) se ha buscado energicamente y se ha descrito en varias publicaciones [por ejemplo, *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)]. Como alternativa, los anticuerpos monoclonales de mamíferos no caninos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón, se quimerizan con anticuerpos caninos o secuencias de los mismos para conseguir anticuerpos que se vean por el hospedador receptor como menos inmunogénicos que los anticuerpos monoclonales murinos convencionales. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 5.593.861, "Dog-Mouse Heterohybridoma and Gene Fragment Coding for Constant Region of Canine Immunoglobulins", que se incorpora en el presente documento por referencia.

Además, Wasserman y Capra, [*Biochem.* 16: 3160 (1977)] determinaron la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de una cadena pesada tanto de IgM canino como de IgA canino. Estos trabajadores determinaron adicionalmente la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa de un IgA canino [Wasserman y Capra, *Immunochem.* 15: 303 (1978)]. McCumber y Capra, [*Mol. Immunol.* 16: 565 (1979)] desvelan la secuencia de aminoácidos completa de una cadena mu canina. Tang *et al.*, [*Vet. Immunology Immunopathology* 80: 259 (2001)], desvelan un ADNc de cadena *gamma* de IgG-A canino sencillo y cuatro secuencias proteicas de cadena gamma de IgG-A canino. Tang *et al.*, mencionado anteriormente, describen además amplificación por PCR de una biblioteca de ADNc de bazo canino con un cebador oligonucleotídico degradado diseñado a partir de las regiones conservadas de IgG humanos, de ratón, de cerdo y bovinos. Además, Krah, *et al.* [Publicación de Estados Unidos n.º 20040181039, publicada el 16 de septiembre de 2004 e incorporada por referencia en el presente documento] describen en detalle un proceso para caninizar anticuerpos no caninos.

Aislamiento del gen de TSLP canina

A. Intentos iniciales

5 Los intentos iniciales de identificar TSLP canina se basaron en alineamientos de secuencias de secuencias de ADNc de TSLP clonada humana y de ratón con las secuencias de ADNc de TSLP de Rata, Chimpancé y Rhesus que se ensamblaron a partir de BLAT (base de datos genómica pública de la Universidad de California, Santa Cruz). La TSLP de chimpancé es 100 % idéntica a la TSLP humana en el nivel de aminoácidos, mientras que la TSLP de Rhesus tiene más de 90 % de homología con la TSLP humana (12/151 restos diferentes) en la proteína madura. Sin embargo, la proteína TSLP humana y de primate no humano y secuencias de ADNc son altamente divergentes de las secuencias de TSLP murinas. Las secuencias de ADNc de TSLP humana y de ratón comprenden solamente 43 % de homología, lo que no permite clonar mediante hibridación entre especies de baja rigurosidad entre estas especies. Además, la secuencia de TSLP de rata mostró 39/121 cambios en la secuencia de restos de aminoácidos de la proteína madura en comparación con TSLP de ratón lo que indica que incluso entre especies murinas estrechamente relacionadas las secuencias de TSLP han divergido significativamente.

Desafortunadamente, como se desvela en el presente documento, la secuencia de TSLP canina también ha demostrado ser divergente de todas las secuencias murinas diversas y las de primates similares. Por lo tanto, la obtención de TSLP canina mediante hibridación entre especies de baja rigurosidad no ha tenido éxito. De hecho, los cebadores diseñados en un intento de clonar el ortólogo de TSLP canino en estrategias de PCR anidada empleando la información de secuencia de ser humano, ratón, rata y mono no consiguieron identificar siquiera una única banda que correspondiera a TSLP canina.

B. Aislamiento con éxito del gen de TSLP canina

25 La búsqueda de la base de datos genómica canina ensamblada entonces disponible (derivada de la secuenciación aleatoria de genoma completo; puesto a disposición del público por la Universidad de California, Santa Cruz) con la secuencia de TSLP humana condujo a la identificación parcial del exón 1 y 4 de la TSLP canina. Brevemente, se identificaron varios aciertos de homología de secuencia significativa en esta búsqueda inicial (véase "aciertos" 1-6, a continuación). Sus secuencias se recogieron y usaron como consultas para extender y ensamblar una secuencia electrónica parcial del gen de la TSLP canina.

Acierto 1

35 Puntuación = 60,8 bits (146), Expectativa = 1e-08
 Identidades = 33/58 (56 %), Positivos = 39/58 (67 %), Huecos = 1/58 (1 %)

Consulta: 7 LYVLSVS-FRKIFILQLVGLVLTVDFTNCFEIKAKAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEF 63
 L + SVS FRKIF+LQLVGLVLTYY+F +CDFEKI+ Y I + L YM G F
 Objeto: 26 LIICSVSVFRKIFVLQLVGLVLTYNFIDCFEKIRWKYQEVYQALEKYM DGVSE*TF 199

40 SEQ ID NO: 102; TSLP humana
 SEQ ID NO: 103; >gi|36323560|gb|AACN010632090.1| Canis familiaris ctg19866851299046, longitud de secuencia aleatoria de genoma completo = 1007

Acierto 2:

45 Puntuación = 59,7 bits (143), Expectativa = 3e-08
 Identidades = 30/42 (71 %), Positivos = 33/42 (78 %)
 Fase = -1

Consulta: 117 QINATQAMKRRKRKRVTTNKCLEQVSQLQGLWRRFNRPLLKQ 158 (SEQ ID NO: 104)
 QIN TQA KKR+KR VTTNKC EQV +L GLWRRF+R KQ
 Objeto: 588 QINNTQAKKRRKRKRGVTTNKCREQVAHLIGLWRRFRSRS*KQ 463 (SEQ ID NO: 105)

50 SEQ ID NO: 104 TSLP humana
 SEQ ID NO: 105 >gi|36314527|gb|AACN010674832.1 Canis familiaris ctg19866851282529, longitud de secuencia aleatoria de genoma completo = 963

Acierto 3

55 Puntuación = 42,0 bits (97), Expectativa = 0,006
 Identidades = 21/44 (47 %), Positivos = 27/44 (61 %)

Fase = -2

Consulta: 76 L TEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQIN 119 (SEQ ID NO: 106)
L I+ LT + GCAS A+E FA T AALA CPGY+ ++

Objeto: 369 LARIERLTLHRIRGCASGAREFAEGTVAALAAECPGYAAAPVS 238 (SEQ ID NO: 107)

5 SEQ ID NO: 106: TSLP humana
SEQ ID NO: 107 >gi|36442813|gb|AACN011084208.1| Canis familiaris ctg19866851499233, longitud de secuencia aleatoria de genoma completo = 370

Acierto 4

10 Puntuación = 38,9 bits (89), Expectativa = 0,047
Identidades = 15/32 (46 %), Positivos = 22/32 (68 %)
Fase de lectura = +1

Consulta: 87 TAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQI 118 (SEQ ID NO: 108)
T GC AKE A+ AL++WCPG+++TQ+

Objeto: 179 TPGCGICAKEAAAALGWFCALSVWCPGWAQTQV 273 (SEQ ID NO: 109)

15 SEQ ID NO: 108: TSLP humana
SEQ ID NO: 109 >gi|36211043|gb|AACN010354273.1| Canis familiaris ctg19866851087147, longitud de secuencia aleatoria de genoma completo = 1369

20 Acierto 5

Puntuación = 42,0 bits (97), Expectativa = 0,006
Identidades = 21/44 (47 %), Positivos = 27/44 (61 %)
25 Fase de lectura = -2

Consulta: 76 L TEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQIN 119 (SEQ ID NO: 110)
L I+ LT + GCAS A+E FA T AALA CPGY+ ++

Objeto: 369 LARIERLTLHRIRGCASGAREFAEGTVAALAAECPGYAAAPVS 238 (SEQ ID NO: 111)

30 SEQ ID NO: 110: TSLP humana
SEQ ID NO: x111 >gi|36211043|gb|AACN010354273.1| Canis familiaris ctg19866851087147, longitud de secuencia aleatoria de genoma completo = 1369

Acierto 6

35 Puntuación = 38,9 bits (89), Expectativa = 0,047
Identidades = 15/32 (46 %), Positivos = 22/32 (68 %)
Fase = +1

Consulta: 87 TAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQI 118 (SEQ ID NO: 112)
T GC AKE A+ AL++WCPG+++TQ+

Objeto: 178 TPGCGICAKEAAAALGWFCALSVWCPGWAQTQV 273 (SEQ ID NO: 113)

40 SEQ ID NO: 112: TSLP humana
SEQ ID NO: 113: >gi|36211043|gb|AACN010354273.1| Canis familiaris ctg19866851087147, longitud de secuencia aleatoria de genoma completo = 1369

45 Una comparación de esta secuencia construida electrónicamente con TSLP humana, de mono, de rata y de ratón demostró los límites de intrón/exón conservados e identidad de secuencia sustancial, lo que conduce a la identificación de esta secuencia como parte del ortólogo canino de TSLP. Se diseñaron posteriormente cebadores de PCR basándose en este descubrimiento y se usaron para amplificar los segmentos ausentes del gen. Se obtuvieron dos clones parciales solapantes por PCR anidada doble a partir de una biblioteca de ADNc de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activado canino. Los intentos adicionales de descubrir el ADNc de TSLP canina completa por PCR anidada o intentando extender secuencias hacia los extremos 5' o 3' no tuvieron éxito. Sin embargo, los ciclos por iteraciones de búsquedas en base de datos usando la información de secuencia extendida a partir de estos clones en los datos de secuencias aleatorios de genoma completo canino (misma

50

referencia. Universidad de California Santa Cruz) combinados con ensamblaje manual de la secuencia de ADN sin procesar de esta biblioteca condujo al ensamblaje electrónico del ADNc de TSLP canina de longitud completa. Después se sintetizó un clon físico de esta secuencia de ADNc usando un sintetizador de ADN, *in vitro*.

5 En conclusión, usando técnicas de clonación molecular actuales y del estado de la técnica no fue posible derivar la secuencia de TSLP canina directamente a partir de las secuencias humanas, de ratón, de rata o de mono. Solamente búsquedas en base de datos por iteraciones sofisticadas usando genes de TSLP humanos, de ratón, de rata y NHP ensamblados, con el uso de asignaciones de límites de intrón/exón e identidad de secuencia en bases de datos genómicas, combinadas con técnicas de clonación de PCR molecular, condujeron a la identificación del gen que codificaba TSLP canina.

Una vez obtenida, la TSLP canina mostró 58/132 cambios en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína TSLP humana madura (61 % de identidad) y 83/129 cambios en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína TSLP de ratón madura (33 % de identidad) (véase posteriormente).

15 **Comparación de secuencias entre proteína TSLP madura de *Canis familiaris* y humana**

TSLP_CF (*Canis familiaris*) Longitud 141 (1 .. 141)

20 TSLP_H (Humana) Longitud 145 (1 .. 145)

Puntuación = 167 bits (423), Expectativa = 1e-40
 Identities = 85/139 (61 %), Positivos = 101/139 (72 %)

Consulta: 1 RKIFVLQLVGLVLTYNFIDCDFEKIRWKYQEVIIYQALEKYMDGTRSTEFSHPVYCANPPD 60
 RKIF+LQLVGLVLT+Y+F +CDFEKI+ Y I + L YM GT+STEF++ V C+N P

Objeto: 1 RKIFILQLVGLVLTVDFTNCDFEKIKAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEFNNTVSCSNRPH 60

Consulta: 61 CLARIERLTLHRIRGCASGAREFAEAGTVAALAAECPGYAAAPINNTQAKKKRKRKRVTT 120
 CL I+ LT + GCAS A+E FA T AALA CPGY+ IN TQA KKR+KR VTT

Objeto: 61 CLTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKKRRKRKRVTT 120

Consulta: 121 NKCREQVAHLIGLWRRFSR 139 (SEQ ID NO: 114)
 NKC EQV+ L GLWRRF+R

Objeto: 121 NKCLEQVSQLQGLWRRFNR 139 (SEQ ID NO: 115)

25

SEQ ID NO: 114: TSLP de *Canis familiaris*
 SEQ ID NO: 115: TSLP humana

30 **Comparación de secuencias entre proteína TSLP madura de *Canis familiaris* y murina**

TSLP_CF Longitud 141 (1 .. 141)

TSLP_M Longitud 136 (1 .. 136)

35

Puntuación = 72,0 bits (175), Expectativa = 7e-12
 Identities = 46/138 (33 %), Positivos = 67/138 (48 %), Huecos = 8/138 (5 %)

Consulta: 1 RKIFVLQ-LVGLVLTYNFIDCDFEKIRWKYQEVIIYQALEKYMDGTRSTEFSHPVYCANPP 59
 R +F+LQ LV + LTYNF +C+F I Y +I+ L + G + + C + P

Objeto: 1 RSLFILQVLVRMGLTYNFSNCFNFTSITKIYCNIIFHDLTGDLKGAKEQIED---
 CESKP 57

Consulta: 60 DCLARIERLTLHRIRGCASGAREFAAEGTVAALAAECPGYAAAPINNTQAKKKRKKRGVT 119
 CL +IE TL+ I GC S + FA T AL CPGY N+ + ++

Objeto: 58 ACLLKIEYYTLNPIPGCPSLPDKTFARRTREALNDHCPGYFPETERNDGTQEMAQE---V 113

Consulta: 120 TNKCREQVAHLIGLWRRF 137 (SEQ ID NO: 116)
 N C Q + ++ LW F

Objeto: 114 QNICLNQTSQILRLWYSF 131 (SEQ ID NO: 117)

SEQ ID NO: 116: TSLP de *Canis familiaris*
 SEQ ID NO: 117: TSLP de ratón

5

Por lo tanto, superando las dificultades previamente indicadas, la presente invención proporciona ahora secuencias de ADN que codifican TSLP canina y la proteína TSLP canina codificada. La proteína TSLP canina y ciertos fragmentos de la misma son antígenos útiles, por ejemplo, inmunógenos, para inducir anticuerpos para diversos epítomos en la proteína, epítomos tanto lineales como conformacionales. El ADN que codifica TSLP canina también es útil para proporcionar vectores y células hospedadoras para producir proteína TSLP para inmunización y/o como un reactivo de investigación, así como proporcionar vacunas basadas en ADN para inducir anticuerpos anti TSLP, bien como ADN "desnudo" o bien en forma de un plásmido o vector de virus animal adecuado para expresar TSLP en las células de un animal vacunado.

10

15 La secuencia génica de TSLP canina obtenida de este modo se ilustra en la FIGURA 8A (SEQ ID NO: 1) y la proteína TSLP expresada predicha se ilustra en la FIGURA 8B (SEQ ID NO: 2). Los restos 1-28 representan la secuencia señal, y los restos 29 a 155 representan la proteína madura.

20

Ensayo para identificar proteínas TSLP homólogas

La presente invención también proporciona proteínas TSLP que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene 80 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, excluyendo la secuencia señal de 28 restos de aminoácidos, que cuando se administran a un canino como una vacuna, inducen anticuerpos que se unen a la proteína TSLP canina que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. También se proporcionan fragmentos antigénicos de dichas proteínas TSLP.

25

De hecho, un modo de demostrar que una proteína TSLP potencial es una TSLP de la presente invención es ensayar si dicha proteína puede generar anticuerpos que se unan con TSLP canina que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Uno de dichos métodos es vacunar (por ejemplo, inyectar) perros con diversas dosis que varían de 5 a 500 µg de un antígeno de TSLP-GST potencial. Dichos antígenos pueden formularse en un adyuvante basado en hidróxido de aluminio tal como Rehydrogel. Se inyectan a los perros después por vía intramuscular tres veces: el día 0, día 21 y día 42. Se recogen muestras de suero de perros vacunados y de control (no inmunizados) los días 0, 21, 42 y 63.

30

La inducción de anticuerpos en perros vacunados con los antígenos puede evaluarse con un ensayo ELISA de la siguiente manera: se diluye proteína TSLP canina que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 hasta 5 µg/ml en tampón de recubrimiento (Bicarbonato Sódico pH 9,0) y se distribuye a 100 µl/pocillo de placas de 96 pocillos (Pierce). Las placas se incuban a 4 °C durante una noche. A continuación las placas se lavan tres veces con solución salina tamponada con fosfato que contiene Tween-20 (PBST) 0,05 %. Después, se añaden 200 µl de tampón de bloqueo (leche desnatada al 2 % en PBST) a cada pocillo y las placas se incuban a temperatura ambiente durante 60 minutos. Las placas se lavan después tres veces con PBST. A continuación, se añaden 100 µl/pocillo de dilución 1:100 de los antisueros de perro de ensayo a la fila superior de los pocillos apropiados. Las muestras de suero se diluyen después 10 veces a la posición de placa apropiada. Después de la incubación de las placas a temperatura ambiente durante 60 minutos, las placas se lavan tres veces con PBST.

40

45

A continuación, se añaden a cada pocillo 100 µl/pocillo de una dilución 1:20.000 de un IgG de cabra anti perro conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (Bethyl Laboratories). Después las placas se incuban a temperatura ambiente durante 60 minutos. A continuación las placas se lavan tres veces con PBST y después se añaden a todos los pocillos 100 µl/pocillo de sustrato de TMB (3,3',5,5' tetrametil bencidina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Se permite que la reacción de color se revele durante 10-20 minutos a temperatura ambiente antes de detenerla añadiendo 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 0,18 M.

La densidad óptica (D.O.) de todos los pocillos se determina a la longitud de onda de 450 nm usando un lector de placas de ELISA (Thermo Max; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las muestras de suero obtenidas de caninos a los que se ha inyectado los antígenos de TSLP potenciales se consideran detectables y por lo tanto los antígenos se identifican como proteínas TSLP de la presente invención cuando el ensayo produce un valor D.O. igual a o mayor de tres veces el fondo producido por muestras de suero obtenidas de los perros antes de la inmunización. De forma similar, pueden determinarse títulos de anticuerpos relativos para los antígenos de TSLP basándose en la mayor dilución en suero produciendo un valor D.O. igual a o mayor de tres veces el fondo producido por muestras de suero obtenidas de perros antes de la inmunización con los antígenos.

Anticuerpos para epítomos específicos de proteína TSLP canina

Pueden inducirse anticuerpos para diversos epítomos de las proteínas TSLP caninas, incluyendo variantes de especie, polimórficas o alélicas, y fragmentos de las mismas, tanto en sus formas de origen natural como en sus formas recombinantes. Adicionalmente, pueden inducirse anticuerpos para TSLP caninas en sus formas activas o en sus formas inactivas, incluyendo versiones nativas o desnaturalizadas. También se contemplan anticuerpos antiidiotípicos.

Pueden inducirse anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión y versiones monocatenarias, contra fragmentos predeterminados de los antígenos por inmunización de animales con TSLP canina y/o fragmentos de la misma, junto con adyuvantes convencionales en la técnica y/o conjugarse con proteínas inmunogénicas. Los animales inmunizados de este modo pueden ser caninos que se inmunizan para regular negativamente la actividad de TSLP canina.

Un hospedador apropiado, por ejemplo, una cepa endogámica de ratones tales como Balb/c, se inmuniza con la proteína seleccionada, normalmente usando un adyuvante convencional, y un protocolo de inmunización de ratón convencional (véase Harlow y Lane, misma referencia, mencionado anteriormente). Puede administrarse un adyuvante al animal diana antes, en combinación con o después de la administración de la vacuna.

Como alternativa, un péptido sintético derivado de las secuencias desveladas en el presente documento y conjugado con una proteína vehículo puede usarse como un inmunógeno. Se recogen sueros policlonales y se titulan frente a la proteína inmunógeno en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo de fase sólida con el inmunógeno inmovilizado en un soporte sólido. Se seleccionan antisueros policlonales con un título de 1×10^4 o mayor y se ensayan con respecto a su reactividad cruzada frente a otros miembros de la familia IL-7, por ejemplo, IL-7 de roedor, usando un inmunoensayo de unión competitiva tal como el descrito en Harlow y Lane, misma referencia, mencionado anteriormente, en las páginas 570-573. Preferentemente se usa al menos otro miembro de la familia IL-7 en esta determinación junto con, por ejemplo, la IL-7 de primate. Los miembros de la familia IL-7 pueden producirse como proteínas recombinantes y aislarse usando biología molecular convencional y técnicas de química de proteínas como se describe en el presente documento.

Pueden usarse inmunoensayos en el formato de unión competitiva para las determinaciones de reactividad cruzada. Por ejemplo, la proteína de SEQ ID NO: 2 puede inmovilizarse en un soporte sólido. Las proteínas añadidas al ensayo compiten con la unión de los antisueros con el antígeno inmovilizado. La capacidad de las proteínas anteriores para competir con la unión de los antisueros con la proteína inmovilizada se compara con la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. El porcentaje de reactividad cruzada para las proteínas anteriores se calcula empleando cálculos convencionales. Los antisueros con menos de 10 % de reactividad cruzada con cada una de las proteínas enumeradas anteriormente se seleccionan y se agrupan. Los anticuerpos de reacción cruzada se retiran después de los antisueros agrupados por inmunoabsorción con las proteínas anteriormente enumeradas.

Los antisueros inmunoabsorbidos y agrupados se usan después en un inmunoensayo de unión competitiva como se ha descrito anteriormente para comparar una segunda proteína con la proteína inmunógeno (por ejemplo, la proteína de tipo IL-7 de SEQ ID NO: 2). Para realizar esta comparación, las dos proteínas se ensayan cada una en un amplia serie de concentraciones y se determina la cantidad de cada proteína requerida para inhibir el 50 % de la unión de los antisueros con la proteína inmovilizada. Si la cantidad de la segunda proteína requerida es menos del doble de la cantidad de proteína de la proteína o las proteínas seleccionadas que se requiere, entonces se dice que la segunda proteína se une específicamente a un anticuerpo generado para el inmunógeno.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o no neutralizantes, pueden explorarse con respecto a la capacidad para unirse con los

antígenos sin inhibir la unión con un receptor. Como anticuerpos neutralizantes, pueden ser útiles en ensayos de unión competitiva. También serán útiles en la detección o cuantificación de proteína TSLP canina o sus receptores. [Véase, por ejemplo, Chan (ed. 1987) *Immunology: A Practical Guide*, Academic Press, Orlando, Fla.; Price y Newman (eds. 1991) *Principles and Practice of Immunoassay*, Stockton Press, N.Y.; y Ngo (ed. 1988) *Nonisotopic Immunoassay*, Plenum Press, N.Y.] Absorciones cruzadas, agotamientos u otros medios proporcionarán preparaciones de selectividad definida, por ejemplo, especificidades de especie, únicas o compartidas. Estos pueden formar la base de ensayos que identificarán diversos grupos de antígenos.

Además, los anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión a antígeno, de la presente invención pueden ser antagonistas potentes que se unen al antígeno e inhiben la unión funcional, por ejemplo, con un receptor que puede inducir una respuesta biológica. Además, estos anticuerpos pueden conjugarse con fármacos u otros agentes terapéuticos, bien directa o bien indirectamente por medio de un enlazador, y pueden efectuar dirección farmacológica.

Un péptido sintético derivado de las secuencias desveladas en el presente documento y conjugado con una proteína vehículo puede usarse como un inmunógeno. En cualquier caso, pueden unirse fragmentos de antígenos con otros materiales, particularmente polipéptidos, como polipéptidos fusionados o unidos covalentemente para usar como inmunógenos. Puede fusionarse o unirse covalentemente un antígeno y sus fragmentos con diversos inmunógenos, tales como hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero bovino, toxoide del tétanos, etc. Véase *Microbiology*. Hoeber Medical Division, Harper y Row, 1969; Landsteiner (1962) *Specificity of Serological Reactions*, Dover Publications, Nueva York; Williams, *et al.* (1967) *Methods in Immunology and Immunochemistry*, vol. 1, Academic Press, Nueva York; y Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press, NY, para descripciones de métodos de preparación de antisueros policlonales.

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales de diversos hospedadores de mamífero, tales como ratones, roedores, primates, seres humanos, etc. Puede encontrarse descripción de técnicas para preparar dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo en Stites, *et al.* (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4ª ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, Calif., y referencias citadas en la misma; Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed.), Academic Press, Nueva York; y particularmente en Kohler y Milstein (1975) en *Nature* 256: 495-497, que analiza un método para generar anticuerpos monoclonales.

Otras técnicas adecuadas implican la exposición *in vitro* de linfocitos a los polipéptidos antigénicos o como alternativa a la selección de bibliotecas de anticuerpos en vectores de fagos o similares. [Véase, Huse, *et al.* (1989) "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda", *Science* 246: 1275-1281; y Ward, *et al.* (1989) *Nature* 341: 544-546]. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden usarse con o sin modificación, incluyendo anticuerpos quiméricos, caninizados y/o humanizados.

Frecuentemente, los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se marcarán uniendo una sustancia que proporciona una señal detectable. Dicha unión puede realizarse bien de forma covalente o bien de forma no covalente. Se conoce una amplia diversidad de marcadores y técnicas de conjugación y se han presentado extensivamente en la bibliografía tanto científica como de patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, y similares. Las patentes que enseñan el uso de dichos marcadores incluyen patentes de Estados Unidos n.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Además, pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes o quiméricas, véase Cabilly, Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Moore, *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.642.334; y Queen, *et al.* (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033; o realizarse en ratones transgénicos, véase Mendez, *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15: 146-156. Estas referencias se incorporan en el presente documento por referencia.

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para cromatografía de afinidad en el aislamiento de la proteína. Pueden prepararse columnas en las que los anticuerpos se unen a un soporte sólido, (véase, por ejemplo, Wilchek *et al.* (1984) *Meth. Enzymol.* 104: 3-55). Como alternativa pueden usarse antígenos unidos a un soporte sólido para purificar los anticuerpos correspondientes.

Los anticuerpos inducidos contra cada TSLP canina también serán útiles para inducir anticuerpos antiidiotípicos. Estos serán útiles en la detección o el diagnóstico de diversas afecciones inmunológicas relacionadas con la expresión de los antígenos respectivos.

60 Inhibición de ARN

La interferencia con ARN que codifica TSLP canina en células que producen TSLP canina es un medio adicional para inhibir la actividad biológica de TSLP y en consecuencia tratar varios trastornos asociados con TSLP tales como dermatitis atópica. Para este fin, pueden introducirse moléculas de ARN bicatenarias sintetizadas químicamente o clonadas dentro de vectores de suministro apropiados tales como plásmidos o vectores virales en células que producen de forma activa ARNm de TSLP con el objetivo de reducir los niveles de ARNm endógenos

que codifican TSLP. Después de la entrada de estas moléculas de ARN (en el caso de moléculas suministradas de forma exógena o transcripción de ARN después de la entrada de plásmidos o vectores virales en células deseadas), se procesan mediante la actividad de escisión de una proteína de tipo ribonucleasa III en fragmentos de nucleótidos cortos que se denominan ARNip. Estos fragmentos de ARNip se incorporan después en un complejo multiproteico que contiene nucleasa denominado RISC (complejo silenciador inducido por ARN), que se activa como resultado del desenrollamiento de la doble cadena de ARNip mediante la actividad de una ARN helicasa. La cadena de ARNip ahora monocatenaria guía el complejo RISC a su ARNm diana, que después se escinde y posteriormente se degrada por la actividad endonucleolítica de RISC.

Más particularmente, se clonan plásmidos que contienen el gen de TSLP o fragmento del mismo en uno cualquiera de varios plásmidos eucariotas disponibles en el mercado en los que la transcripción del gen de TSLP o sus fragmentos está conducida por un promotor apropiado, por ejemplo, el promotor de CMV o SV40. Después se inyecta ADN plasmídico purificado (1-100 µg) en lesiones cutáneas o en áreas circundantes a las lesiones cutáneas características de la dermatitis atópica. La inyección de ADN plasmídico puede después repetirse con una frecuencia necesaria para provocar una reducción significativa en ARNm de TSLP. Esta reducción puede evaluarse obteniendo biopsias cutáneas de áreas afectadas y determinando el nivel de ARNm de TSLP por métodos tales como PCR cuantitativa.

Los siguientes ejemplos preparatorios de la presente invención sirven para proporcionar una apreciación adicional de la invención, pero no se pretende de ningún modo restringir el alcance efectivo de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Las secuencias de ADN y proteínas de TSLP canina

Se identificó un gen canino que expresaba TSLP canina mediante un proceso por iteraciones que empleaba extracción de datos en bases de datos electrónicas y métodos de biología molecular, como se ha descrito en detalle anteriormente.

Resultados

La secuencia génica de TSLP canina se ilustra por la FIGURA 8A (SEQ ID NO: 1), y la proteína predicha expresada proteína TSLP se ilustra en la FIGURA 8B (SEQ ID NO: 2). Los restos 1-28 de la FIGURA 8B (SEQ ID NO: 2) marcados por el asterisco, representan la secuencia señal, y los restos 29 a 155 representan la proteína madura.

Ejemplo 2

Clonación y expresión de TSLP canina

El ADN que codifica TSLP canina se identificó como se ha descrito en el presente documento y se clonó en un vector donante de métodos convencionales en la técnica pDONR221 (*Invitrogen Gateway System*). Se realizó ensamblaje génico y clonación en el vector donante en una organización de investigación por contrato denominada DNA 2.0, y dio como resultado la construcción de un plásmido denominado pDONR221.G03276 que contiene el gen de TSLP canino genómico identificado. Se amplificó por PCR ADN que codificaba proteína TSLP canina madura (es decir sin secuencia señal) a partir de pDONR221.G03276 usando dos cebadores que contenían sitios NcoI y EcoRV, respectivamente:

Cebadores

n.º 1: 5' AATAATCCATGGCATAACAATTTTCATTGACTGTGAC-3' (SEQ ID NO: 4); y
n.º 2: 5'-AAAATAGATATCTGAAATGCGACTGAAACGACG-3' (SEQ ID NO: 5).

Después de digestión con NcoI y EcoRV, los productos de PCR se insertaron en sitios NcoI y SmaI del vector pIVEX 1.3 WG (Roche Applied Sciences, Cat n.º 3728803). Esto dio como resultado un plásmido que contenía el gen que codifica la TSLP canina madura fusionada con seis restos de His en el extremo C terminal ("marcador His6"). El plásmido que contenía secuencias correctas de los insertos se denominó plásmido 1265-93.D. Se usó el plásmido 1265-93.D para expresar TSLP en el Instrumento RTS Proteomaster de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Roche Applied Sciences, Cat n.º 3064859). Como se muestra en la FIGURA 1, resultó evidente una banda de 16 kDa en los carriles 2 y 4 (flechas). Los experimentos de transferencia de Western (FIGURA 2A y 2B) muestran que esta banda reaccionó específicamente con anticuerpo anti marcador de His (FIGURA 2A) y un anticuerpo monoclonal de rata específico para TSLP humana (FIGURA 2B).

Ejemplo 3**Producción de TSLP canina a partir de células hospedadoras**

5 Para expresar la proteína TSLP recombinante en *E. coli*, la secuencia de nucleótidos que codificaba cTSLP (es decir, TSLP que carecía de nucleótidos que codificaban la secuencia señal) se amplificó mediante PCR usando el plásmido 1265-66C como un molde junto con un cebador directo y cebadores inversos que contienen sitio NcoI y Hind III, respectivamente.

10 Cebador directo
5'-AATAATCCATGGCATAACAATTTTCATTGACTGTGAC-3' (SEQ ID NO: 6)
Cebador Inverso
5'-ACATAAAAGCTTTGAAATGCGACTGAAACGACG-3' (SEQ ID NO: 7)

15 Después de digestión con Nco I y Hind III, los productos de PCR se insertaron en sitios NcoI/HindIII de vector de expresión pET42b(+) (Novagen). Este proceso produjo un plásmido que codifica la cTSLP madura fusionada con el marcador de GST en el extremo N terminal y un marcador 6xHis en el extremo C terminal. El plásmido que contiene secuencias correctas del inserto se denominó 1265-93B. La expresión de la proteína de fusión de GST-TSLP-His se llevó a cabo en *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS que contiene el gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor LacUV5 inducible por isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG). Se cultivaron células *E. coli* que portaban el plásmido 1265-93B a 30 °C hasta una D.O. 600 de 0,6 y después se indujo expresión proteica mediante la adición de IPTG 0,5 mM e incubación adicional a 30 °C durante 2 horas. SDS-PAGE presenta una banda proteica (flecha) con el tamaño correcto (~ 61 kDa) presente en la fracción de *E. coli* soluble (FIGURA 3A). La transferencia de Western muestra que la proteína expresada reacciona con anticuerpo anti GST (FIGURA 3D). La proteína GST-TSLP-His puede purificarse por resina de glutatión Sepharose 4B (FIGURA 3B). Después de purificación adicional por la resina Ni-NTA, la mayoría de la proteína GST-TSLP estaba contenida en el flujo continuo de la columna (FIGURA 3C).

Ejemplo 4**30 Detección inmunofluorescente de TSLP canina**

La expresión de proteína TSLP canina en tejidos cutáneos y de las amígdalas caninas se determinó por inmunohistoquímica ("IHC") usando anticuerpos policlonales de conejo inducidos contra proteína TSLP humana. Se llevó a cabo inmunohistoquímica en bloques de tejido incluidos en parafina obtenidos de piel de perro normal a la que se inyectó solución salina así como piel de perros diagnosticados con diversas enfermedades cutáneas incluyendo dermatitis atópica, lupus eritematoso cutáneo, eritema multiforme y epidermolisis ampollosa juntural. Adicionalmente, se determinó la expresión de proteína TSLP en tejidos de amígdalas congelados a partir de dos perros. El procedimiento para determinar la expresión de TSLP por IHC es el siguiente:

40 I. Preparación de secciones:

1. Se seccionaron bloques de parafina con muestras cutáneas incluidas a un grosor de 5-7 micrómetros y se montaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina para promover la adhesión.
2. Se desparafinizaron secciones con xileno y se rehidrataron con soluciones de etanol en serie.
3. Se llevó a cabo recuperación de antígeno en tampón de citrato [Tween-20 que contenía citrato sódico 10 mM a una concentración de 0,5 ml/litro durante 25 minutos usando microondas de laboratorio para alcanzar aproximadamente 99-100 °C]. Este es un proceso que recupera la antigenicidad de secciones tisulares que se enmascaran durante el proceso de inclusión en parafina.

II. Inmuntinción:

1. Se incubaron secciones en suero de burro normal al 10 % diluido en solución de tampón fosfato (PBS) durante 1 h a temperatura ambiente para reducir la unión no específica del anticuerpo.
2. Se retiró suavemente el suero en exceso, y las secciones se cubrieron con anticuerpo de conejo (1:100) diluido en PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora o durante una noche a 4 °C en una cámara de humedad.
3. Después se aclararon secciones dos veces durante 5 minutos en PBS, con agitación suave.
4. Se retiró suavemente el PBS en exceso y las secciones se cubrieron con anticuerpo IgG de burro anti conejo biotinilado diluido 1:5000 en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente en la cámara de humedad.

5. Las secciones se aclararon después dos veces durante 5 minutos en PBS, con agitación suave.
6. Se retiró el PBS en exceso y las secciones se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en conjugado de estreptavidina-fluoresceín isotiocianato (estreptavidina-FITC) en PBS a una concentración de 5 microgramos/ml.
7. Las secciones se aclararon después dos veces durante 5 minutos en PBS, agitando suavemente.
8. Las secciones se contratiñeron después con hematoxilina durante 2-3 min.
9. Las secciones se examinaron después bajo el microscopio fluorescente.
10. Se fotografiaron imágenes pertinentes.
11. Los controles experimentales incluyeron la omisión de los anticuerpos primarios anti TSLP, o reemplazo del anticuerpo anti TSLP primario con anticuerpos de conejo normales.

La Tabla 1, a continuación, resume los resultados de los experimentos de IHC.

TABLA 1

Inmunohistoquímica con anti TSLP humana de conejo realizada en bloques incluidos en parafina de tejido cutáneo de perros con diversas enfermedades cutáneas.		
Afección (número total de bloques)	Bloques positivos	Bloques negativos
Piel con lesión AD (* n=10)	8	2
Piel normal con PBS inyectado (n=5)	1	4
Epidermolisis ampollosa juntural (n=2)	2	0
Lupus eritematoso cutáneo canino (n=3)	0	3
Eritema multiforme (n=3)	2	1
* n= el número de animales.		

Se detectó expresión de TSLP en el 80 % de tejidos cutáneos de perros a los que se diagnosticó AD, pero solamente en el 20 % de tejidos cutáneos normales a los que se inyectó solución salina. También se detectó TSLP en el 66 % y el 100 % de tejidos de perros con Eritema multiforme y perros con la enfermedad cutánea genética, epidermolisis ampollosa juntural; respectivamente. No hubo ninguna expresión de proteína TSLP en tejidos cutáneos de perros con lupus eritematoso cutáneo. En tejidos cutáneos incluidos en parafina, la expresión de TSLP se detectó en glándulas sudoríparas. La expresión de TSLP en tejido de amígdala canina congelado se detectó en el epitelio escamoso estratificado y glándulas salivares asociadas. Se muestra un ejemplo de tinción de IHC positiva en muestras cutáneas de perro en la FIGURA 4 que representa muestras de tejido cutáneo incluido en parafina de un perro al que se ha diagnosticado dermatitis atópica.

Ejemplo 6

Detección de inmunoperoxidasa de TSLP canina

La expresión de la proteína TSLP canina en bloques de tejido incluido en parafina, preparados a partir de piel de perros a los que se ha diagnosticado dermatitis atópica, también se determinó por inmunohistoquímica usando, como método de detección, tinción con inmunoperoxidasa. En este método, un anticuerpo monoclonal de rata específico de epitopo que se indujo contra proteína TSLP humana, se usó como anticuerpo primario. El procedimiento para determinar la expresión de TSLP por tinción con inmunoperoxidasa fue el siguiente:

Reactivos especiales

- Suero de ternero neonato normal: n.º N-4762 Sigma
- Tejido cutáneo incluido en parafina
- Anticuerpo primario: mAb anti TSLP humana de rata IgG2a de rata
- Anticuerpo secundario: anti IgG de rata de conejo (biotinilado): BA-4000 Vector Lab. Burlingame, CA.
- Reactivo de detección: Estreptavidina-HRP: n.º 43-8323 Zymed Labs. San Francisco, CA

Kit de sustrato de AEC: Biogenex n.º HK129-5K San Ramon, CA

1. Muestra de ensayo de sección de 4-6 µm.
2. Secar al aire durante 10 min a temperatura ambiente.
3. Fijar 10 min en acetona.
4. Aclarar en PBS (solución salina tamponada con fosfato 0,01) durante 3 min.
5. Detener mediante incubación en peróxido de hidrógeno 0,3 % con azida sódica 0,1 % durante 7-10 min.
6. Aclarar durante 5 min en PBS.
7. Bloquear secciones con suero de ternero neonato normal al 1 % durante 20 minutos en cámara húmeda.
8. Secar los portaobjetos y aplicar anticuerpo primario a una dilución 1:100 durante 2 h a temperatura ambiente.
9. Aclarar durante 5 min.
10. Aplicar el anticuerpo secundario (anti IgG de rata de conejo a 1:400) durante 30 minutos en cámaras húmedas a temperatura ambiente.
11. Aclarar durante 5 min.
12. Secar y aplicar reactivo de detección (estreptavidina-HRP a 1:400) durante 30 min a temperatura ambiente.
13. Aclarar 2X5 minutos.
14. Aplicar AEC 2,5 min. Ajustar de acuerdo con la intensidad de tinción deseada y el fondo.
15. Contrateñir con hematoxilina y montar.

Un conjunto de tejidos cutáneos caninos de perros con AD se ensayó mediante IHC usando un anticuerpo de TSLP canina específica de epítipo. Los resultados mostrados en la FIGURA 5 indican que este anticuerpo reacciona con una molécula que comparte epítipos antigénicos con TSLP humana. La tinción de muestras de ensayo cutáneas de AD caninas fue fuerte en áreas de inflamación crónica donde la epidermis se engrosa. Este patrón es coherente con lo que se sabe acerca de la localización de expresión de TSLP en lesiones cutáneas de AD humana y sugiere adicionalmente que la molécula reconocida en lesiones de AD cutáneas caninas es TSLP canina. No hubo ninguna tinción observada con PBS o un monoclonal de rata diferente específico para una proteína diferente (una proteína linfocítica).

Ejemplo 7

Mapeo de epítipos de TSLP canina

Para identificar epítipos en TSLP canina que son útiles para inclusión en una vacuna capaz de neutralizar la actividad de TSLP, se sintetizó un conjunto de péptidos solapantes basados en la secuencia de proteína TSLP canina y se ensayó con respecto a su capacidad para reaccionar con un anticuerpo monoclonal anti TSLP humana neutralizante. Para este fin se sintetizó un conjunto de péptidos solapantes cada uno de 15 aminoácidos de longitud y desviado en dos aminoácidos en agujas en MIMOTOPES (Minneapolis, MN). Las secuencias de estos péptidos se enumeran en la Tabla 2. Los péptidos 1-57 se sintetizaron con un extremo amidado en la configuración NH₂-PÉPTIDO-AGUJA. Los péptidos 58-94 (duplicados de péptidos parentales 1-37) se compusieron con un extremo acetilado en la configuración ACETILO-PÉPTIDO-AGUJA.

Las agujas que portan el péptido enumerado en la Tabla 2 se ensayaron en un formato de ensayo de ELISA de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante (Mimotopes, Minneapolis, MN). Como se muestra en la FIGURA 6, el péptido n.º 25 (epítipo 25) con la secuencia de aminoácidos NH₂-ARIERLTLHRIGCA (SEQ ID NO: 32) tuvo la mayor reactividad contra el anticuerpo monoclonal PAB100. Se muestra una comparación de esta secuencia peptídica con una secuencia peptídica de TSLP humana potencial correspondiente en la FIGURA 7.

TABLA 2

Péptidos de TSLP canina usados para mapeo de epítipos			
NÚMERO DE EPÍTOPO	SEQ ID NO:	NÚMERO DE EPÍTOPO	SEQ ID NO:
1 YNFIDCDFEKIRWKY	8	48 AKKKRKKRGVTTNKC	55
2 FIDCDFEKIRWKYQE	9	49 KKRKKRGVTTNKCRE	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

ES 2 582 655 T3

9 EVIYQALEKYMDGTR	16	56 EQVAHLIGLWRRFSR	63
10 IYQALEKYMDGTRST	17	57 VAHLIGLWRRFSRIS	64
11 QALEKYMDGTRSTEF	18	58 YNFIDCDFEKIRWKY	65
12 LEKYMDGTRSTEFSSH	19	59 FIDCDFEKIRWKYQE	66
13 KYMDGTRSTEFSHPV	20	60 DCDFEKIRWKYQEV	67
14 MDGTRSTEFSHPVYC	21	61 DFEKIRWKYQEVYIQ	68
15 GTRSTEFSHPVYCAN	22	62 EKIRWKYQEVYQAL	69
16 RSTEFSHPVYCANPP	23	63 IRWKYQEVYQALEK	70
17 TEFSHPVYCANPPDC	24	64 WKYQEVYQALEKYM	71
18 FSHPVYCANPPDCLA	25	65 YQEVYQALEKYMDG	72
19 HPVYCANPPDCLARI	26	66 EVIYQALEKYMDGTR	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 IRGCASGAREAF AEG	37	77 VYCANPPDCLARIER	84
31 GCASGAREAF AEGTV	38	78 CANPPDCLARIERLT	85
32 ASGAREAF AEGTVAA	39	79 NPPDCLARIERLTLH	86
33 GAREAF AEGTVAALA	40	80 PDCLARIERLTLHRI	87
34 REAF AEGTVAALAAE	41	81 CLARIERLTLHRIRG	88
35 AF AEGTVAALAAECP	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 IRGCASGAREAF AEG	94
41 ECPGYAAAPINNTQA	48	88 GCASGAREAF AEGTV	95
42 PGYAAAPINNTQAKK	49	89 ASGAREAF AEGTVAA	96
43 YAAAPINNTQAKKKR	50	90 GAREAF AEGTVAALA	97
44 AAPINNTQAKKKRKK	51	91 REAF AEGTVAALAAE	98
45 PINNTQAKKKRKKRG	52	92 AF AEGTVAALAAECP	99
46 NNTQAKKKRKKRGVT	53	93 AEGTVAALAAECPGY	100

47 TQAKKKRKRKRGVTTN	54	94 GTVAALAAECPGYAA	101
---------------------	----	--------------------	-----

La presente invención no debe limitarse en su alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior.

5 Debe entenderse además que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, proporcionados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para descripción.

10 Se citan en el presente documento diversas publicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Schering-Plough Ltd.

<120> PROTEÍNA LINFOPOYETINA ESTROMAL TÍMICA CANINA Y USOS DE LA MISMA

<130> AH06501 WO

20 <150> 60/875.135

<151> 14-12-2006

<160> 118

25 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 468

<212> ADN

30 <213> *Canis familiaris*

<400> 1

```

atggtgcctg atgccctgct gagcgtgctg agcgtgttct ttaggaagat cttcgtcttg      60
cagctggtag ggctgggtgct aacctacaat ttcattgact gtgactttga gaagattaga      120
tggaaagtatc aggaagtcac ttaccaagcc ctggagaaat acatggatgg gaccaggagc      180
acggagttca gccaccccggt gtactgcgcg aaccgccccg actgcctggc caggatcgag      240
eggctcaccg tgcaccgcat ccgcggtgct gcgtcgggcg cccgggagggc cttcgccgag      300
gggacggctg ccgcgctcgc cgccgagtgc ccgggctacg ccgcagcgcc gataaataat      360
accagggcaa agaagaaaag aaaaaaaga ggagtcacaa caaataaatg ccgggaacaa      420
gtcgcacact taatagggct gtggcgtcgt ttcagtcgca tttcatag      468
    
```

35 <210> 2

<211> 155

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

40 <400> 2

ES 2 582 655 T3

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 5
 aaaatagata tctgaaatgc gactgaaacg acg 33

10 <210> 6
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 6
 aataatccat ggcatacaat ttcattgact gtgac 35

20 <210> 7
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

30 <400> 7
 acataaaaagc ttgaaatgc gactgaaacg acg 33

35 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 8

40 **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> *Canis familiaris*

45 <400> 9

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

50 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

55 <400> 10

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

60 <210> 11

ES 2 582 655 T3

<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

<400> 17

5

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> *Canis familiaris*

10

<400> 18

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

15

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

20

<400> 19

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

25

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

30

<400> 20

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

35

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

40

<400> 21

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

45

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

<400> 22

50

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

55

<210> 23
<211> 15
<212> PRT

ES 2 582 655 T3

<213> *Canis familiaris*

<400> 23

5 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

10 <213> *Canis familiaris*

<400> 24

15 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

20 <213> *Canis familiaris*

<400> 25

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

30 <213> *Canis familiaris*

<400> 26

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

<210> 27

35 <211> 15

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 27

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

<210> 28

45 <211> 15

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 28

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

<210> 29

55 <211> 15

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

ES 2 582 655 T3

<400> 29

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

5 <210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

10 <400> 30

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

15 <210> 31
<211> 15
<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

20 <400> 31

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

25 <210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

<400> 32

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

35 <210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

<400> 33

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

40 <210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

45 <400> 34

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

50 <210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

ES 2 582 655 T3

<400> 35

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

5 <210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

10 <400> 36

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

15 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

20 <400> 37

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

25 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 38

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

30 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

35 <400> 39

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

40 <210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

45 <400> 40

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

50 <210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

55 <400> 41

ES 2 582 655 T3

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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <400> 47

ES 2 582 655 T3

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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <400> 53

ES 2 582 655 T3

	Asn	Asn	Thr	Gln	Ala	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Val	Thr
	1				5					10					15
5	<210> 54 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Canis familiaris</i> <400> 54														
10	Thr	Gln	Ala	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Val	Thr	Thr	Asn
	1				5					10					15
15	<210> 55 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Canis familiaris</i> <400> 55														
20	Ala	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Lys	Cys
	1				5					10					15
25	<210> 56 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Canis familiaris</i> <400> 56														
30	Lys	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Lys	Cys	Arg	Glu
	1				5						10				15
35	<210> 57 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Canis familiaris</i> <400> 57														
40	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Lys	Cys	Arg	Glu	Gln	Val
	1				5					10					15
45	<210> 58 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Canis familiaris</i> <400> 58														
50	Lys	Arg	Gly	Val	Thr	Thr	Asn	Lys	Cys	Arg	Glu	Gln	Val	Ala	His
	1				5					10					15
55	<210> 59 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Canis familiaris</i> <400> 59														

ES 2 582 655 T3

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

5
 <210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 60

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

10
 15
 <210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 61

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

20
 25
 <210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 62

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

30
 <210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

35
 <400> 63

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

40
 <210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

45
 <400> 64

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

50
 <210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 65

ES 2 582 655 T3

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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*

ES 2 582 655 T3

<400> 71

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

5 <210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

10 <400> 72

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

15 <210> 73
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

20 <400> 73

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

25 <210> 74
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 74

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

35 <210> 75
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 75

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

40 <210> 76
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

45 <400> 76

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

50 <210> 77
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

55 <400> 77

ES 2 582 655 T3

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

5 <210> 78
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 <400> 78

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

10 <210> 79
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> *Canis familiaris*
 <400> 79

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

20 <210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> *Canis familiaris*
 <400> 80

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

30 <210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 35 <400> 81

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

40 <210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 45 <400> 82

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

50 <210> 83
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 <400> 83

ES 2 582 655 T3

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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <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> *Canis familiaris*
 <400> 89

ES 2 582 655 T3

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

5 <210> 90
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 90

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

10 <210> 91
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

15 <400> 91

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

20 <210> 92
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

25 <400> 92

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

30 <210> 93
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

35 <400> 93

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

40 <210> 94
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 94

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

45 <210> 95
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

50 <400> 95

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

ES 2 582 655 T3

<210> 96
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 5
 <400> 96

 Ala Ser Gly Ala Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala
 1 5 10 15
 10
 <210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 15
 <400> 97

 Gly Ala Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 20
 <210> 98
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 25
 <400> 98

 Arg Glu Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu
 1 5 10 15
 30
 <210> 99
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 <400> 99

 Ala Phe Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu Cys Pro
 1 5 10 15
 35
 <210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 <400> 100

 Ala Glu Gly Thr Val Ala Ala Leu Ala Ala Glu Cys Pro Gly Tyr
 1 5 10 15
 45
 <210> 101
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 50
 <400> 101

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

ES 2 582 655 T3

<210> 102
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<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

10

<210> 103
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

15

<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

20

<210> 104
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<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

ES 2 582 655 T3

<210> 105
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

5

<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

10 <210> 106
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <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

20 <210> 107
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

25 <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

30 <210> 108
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 108

ES 2 582 655 T3

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

5 <210> 109
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 <400> 109

Thr Pro Gly Cys Gly Ile Cys Ala Lys Glu Ala Ala Ala Leu Gly Trp
 1 5 10 15

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

15 <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

20 <210> 111
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*
 25 <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

30 <210> 112
 <211> 32
 <212> PRT

ES 2 582 655 T3

<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
5 20 25 30

<210> 113

<211> 32

<212> PRT

10 <213> *Canis familiaris*

<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
15 20 25 30

<210> 114

<211> 139

<212> PRT

20 <213> *Canis familiaris*

<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

ES 2 582 655 T3

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> *Homo sapiens*

5

<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

10

<210> 116
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

15

ES 2 582 655 T3

<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

- 5 <210> 117
- <211> 131
- <212> PRT
- <213> *Mus sp.*

10 <400> 117

ES 2 582 655 T3

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> *Canis familiaris*

5

<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

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína linfopoyetina estromal tímica (TSLP), en donde dicha proteína TSLP comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 80 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, excluyendo la secuencia señal de 28 restos de aminoácidos; y en donde dicha proteína TSLP reacciona de forma cruzada con un anticuerpo inducido contra la TSLP canina que comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 2 o un fragmento antigénico del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, o una combinación de dos o más de las mismas.
- 10 2. La TSLP de la reivindicación 1 en donde la TSLP se une a un anticuerpo de la TSLP canina específico de epítipo.
- 15 3. La TSLP de la reivindicación 1 que es una TSLP canina.
- 15 4. La proteína TSLP canina de la reivindicación 3 que comprende los restos de aminoácidos 29-155 de SEQ ID NO: 2.
- 20 5. Un fragmento antigénico de la proteína TSLP de la reivindicación 4, en donde dicho fragmento antigénico comprende una secuencia de aminoácidos de 5 a 22 aminoácidos contiguos de NPPDCLARIERLTLHRIRGCAS (SEQ ID NO: 118); y en donde dicho fragmento antigénico se une a un anticuerpo de la TSLP canina específico de epítipo.
- 25 6. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína TSLP de la reivindicación 1.
- 25 7. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína TSLP de la reivindicación 4 o que codifica un fragmento antigénico de la proteína TSLP que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, o una combinación de dos o más de las mismas, y combinaciones de los mismos.
- 30 8. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7 que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.
- 30 9. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7.
- 35 10. Un método para producir una proteína TSLP que comprende cultivar una célula hospedadora en un medio de cultivo adecuado, en donde dicha célula hospedadora comprende el vector de expresión de la reivindicación 9, y en donde se expresa la proteína TSLP.
- 40 11. El método de la reivindicación 10 que comprende además aislar la proteína TSLP de la célula hospedadora cultivada o del medio de cultivo.
- 45 12. Un anticuerpo anti TSLP canina inducido en un mamífero o en un sistema de hibridoma de mamífero por una TSLP o un fragmento antigénico como se describe en las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo anti TSLP canina ha sido caninizado.
- 50 13. Un anticuerpo anti TSLP canina inducido en un mamífero o en un sistema de hibridoma de mamífero por una TSLP o un fragmento antigénico como se describe en las reivindicaciones 1-4, o el anticuerpo anti TSLP canina de la reivindicación 12, para uso en el tratamiento de síntomas alérgicos en un canino atópico.
- 50 14. Un método para diagnosticar dermatitis atópica en un canino que comprende determinar la presencia de la proteína TSLP canina de la reivindicación 4 en una muestra epidérmica obtenida del canino.
- 55 15. Una proteína de fusión que comprende la TSLP o un fragmento antigénico como se describe en las reivindicaciones 1-4.
- 55 16. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la reivindicación 15.
17. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 16.

FIG. 1

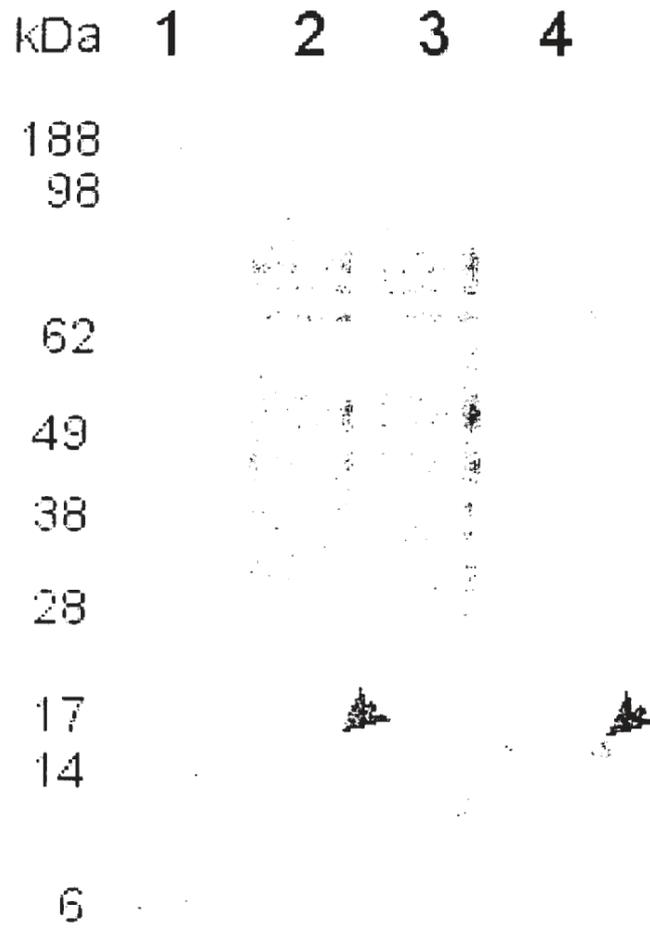


FIG. 2A

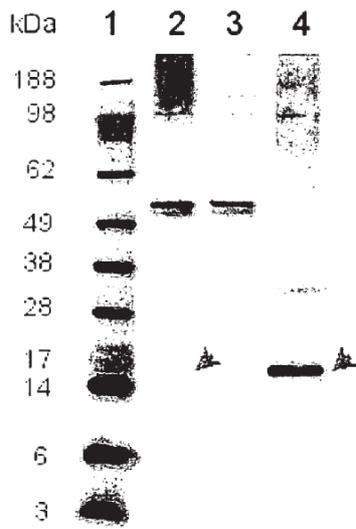


FIG. 2B

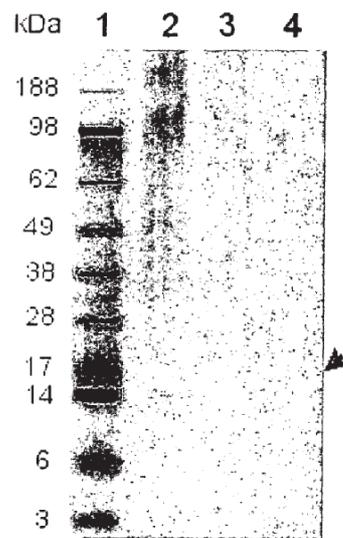


FIG. 3A

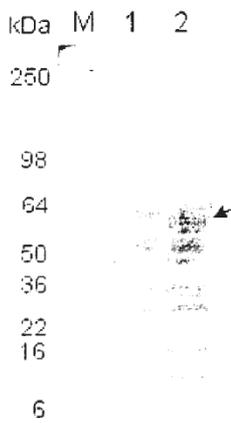


FIG. 3B

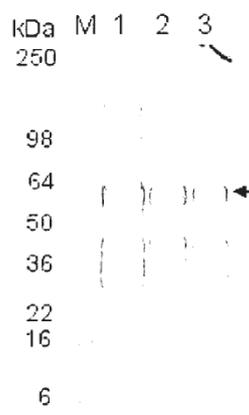


FIG. 3C

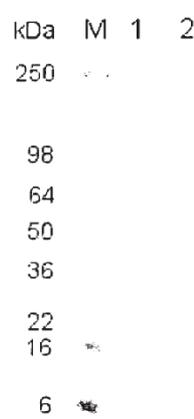


FIG. 3D

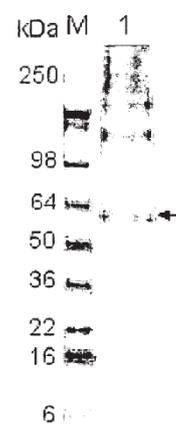


FIG. 4



FIG. 5A

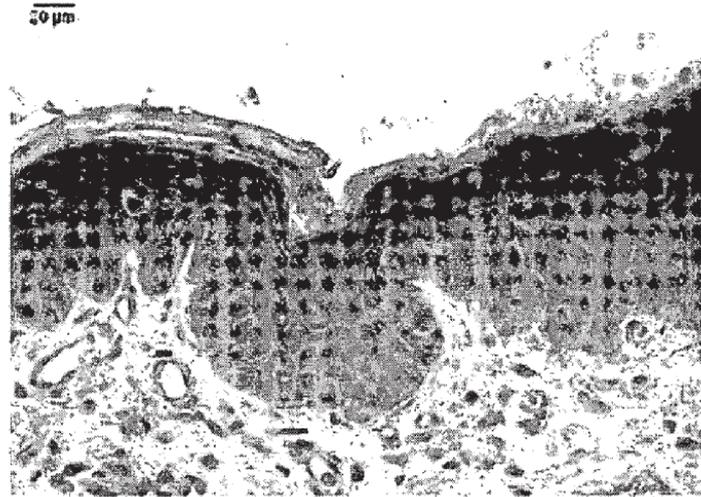


FIG. 5B

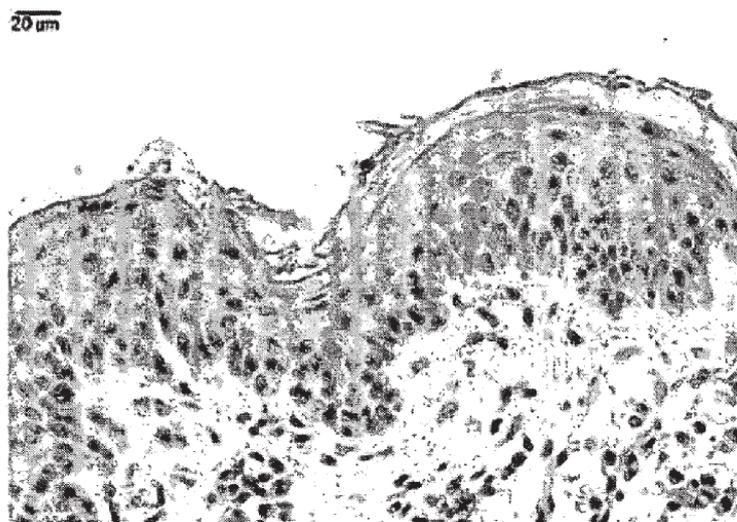


FIG. 6

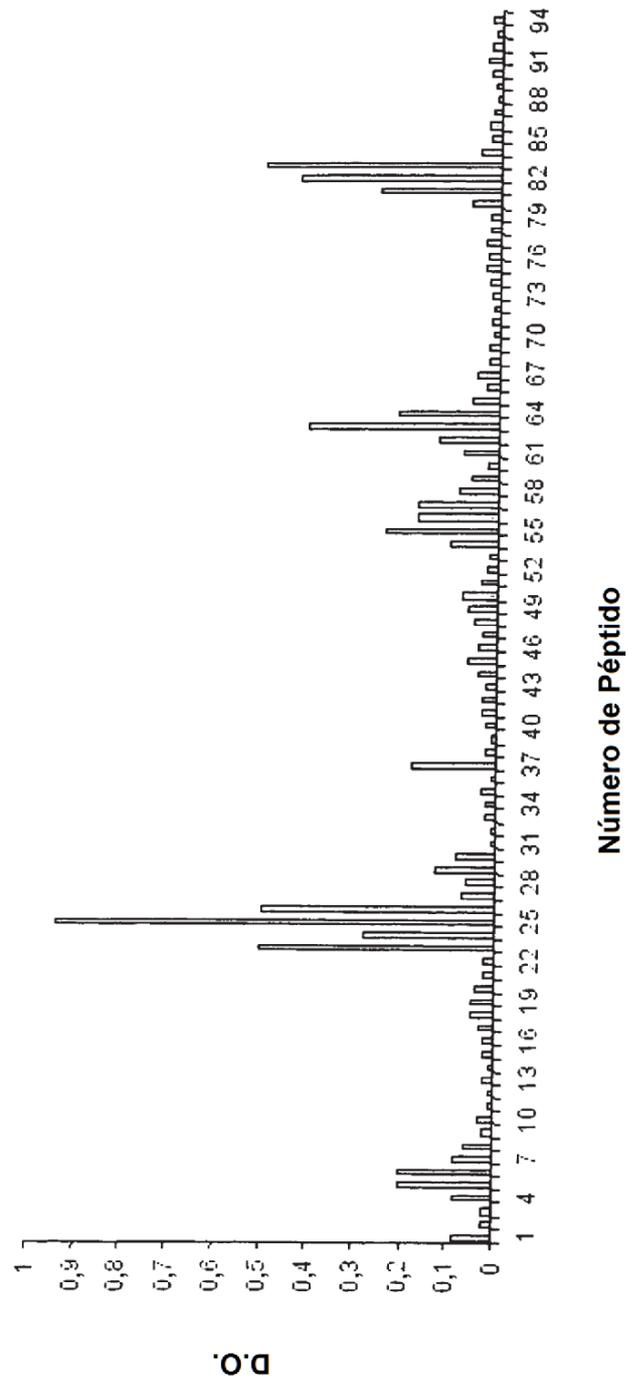


FIG. 7

Perro: ARIERLTLHRIRGCA
Ser humano: TEIQSLTFNPTAGCA

FIG. 8A

5' -

ATGGTGCCTGATGCCCTGCTGAGCGTGCTGAGCGTGTTCTTTAGGAAGAT
CTTCGTCTTGCAGCTGGTAGGGCTGGTGCTAACCTACAATTTATTGACT
GTGACTTTGAGAAGATTAGATGGAAGTATCAGGAAGTCATTTACCAAGCC
CTGGAGAAATACATGGATGGGACCAGGAGCACGGAGTTCAGCCACCCCGT
GTACTIONCGCGAACCCGCCCGACTGCCTGGCCAGGATCGAGCGGCTCACCC
TGCACCGCATCCGCGGCTGCGCGTCCGGCGCCCGGGAGGCCTTCGCCGAG
GGGACGGTCGCCGCGCTCGCCGCCGAGTGCCCGGGCTACGCCGCAGCGCC
GATAAATAATACCCAGGCAAAGAAGAAAAGAAAAAAGAGGAGTCACAA
CAAATAAATGCCGGGAACAAGTCGCACACTTAATAGGGCTGTGGCGTCGT
TTCAGTCGCATTTTCATAG - 3'

FIG. 8B

*

MVPDALLSVLSVFFRKIFVLQLVGLVLTYNFIDCDFEKIRWKYQEVYQA
LEKYMDGTRSTEF~~SH~~PVYCANPPDCLARIERLTLHRIRGCASGAREAF
GTVAALAAECPGYAAAPINNTQAKKKRKKRGVTTNKCREQVAHLIGLWRR
FSRIS