



등록특허 10-2276888



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월14일

(11) 등록번호 10-2276888

(24) 등록일자 2021년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/705 (2006.01) A61K 35/12 (2020.01)

C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/705 (2013.01)

A61K 35/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7000921(분할)

(22) 출원일자(국제) 2013년05월02일

심사청구일자 2021년02월09일

(85) 번역문제출일자 2021년01월12일

(65) 공개번호 10-2021-0013284

(43) 공개일자 2021년02월03일

(62) 원출원 특허 10-2014-7032747

원출원일자(국제) 2013년05월02일

심사청구일자 2018년05월02일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/039316

(87) 국제공개번호 WO 2013/166321

국제공개일자 2013년11월07일

(30) 우선권주장

61/642,358 2012년05월03일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

PNAS., 102(52). 19033-19038, 2005.

Nat. Biotechnol., 23(3), 349-354, 2005.

J. Immunol Methods, 339(2), 175-184, 2008.

US20090217403 A1

(73) 특허권자

프레드 헛чин슨 켄서 리서치 센터

미국 워싱턴 98109, 시애틀, 1100 페어뷰 애비뉴
엔.,

(72) 발명자

슈미트, 토마스 엠.

미국, 워싱턴 98107, 시애틀, 4426 1번 애비뉴 노
스웨스트

그린버그, 필립 디.

미국, 워싱턴 98040, 머서 아일랜드, 6510 82번
애비뉴 사우스아이스트

(74) 대리인

특허법인한얼

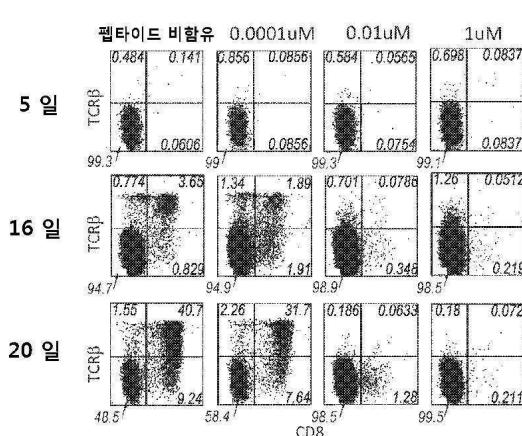
전체 청구항 수 : 총 48 항

심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 증강된 친화성 T 세포 수용체 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 출원은 델타-유사-1 또는 델타-유사-4를 발현하는 간질세포로 배양한 항원 특이적 TCR α를 발현하는 조혈전구 세포의 효능제 선택에 의해 증강된 친화성 T 세포 수용체를 생성하는 방법, 이러한 방법으로 제조한 조성물 및 이의 용도를 제공한다.

대 표 도 - 도1a

(52) CPC특허분류

C07K 19/00 (2013.01)

C12N 15/867 (2013.01)

C12N 5/10 (2020.05)

명세서

청구범위

청구항 1

펩타이드 항원에 특이적인 모체(parent) TCR에 비해 상기 펩타이드 항원에 대해 증강된 친화성을 갖는 T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 세포를 생성하는 시험관 내(*in vitro*) 방법으로서, 상기 방법이:

(a) 조혈전구세포에서 이중 음성(DN) $TCR\alpha\beta^+$ 흡선세포로의 분화를 유도하는데 충분한 조건하 및 시간 동안, 조혈전구세포를 하나 이상의 간질세포 및 펩타이드 항원과 접촉시키는 단계로서,

상기 조혈전구세포가 상기 펩타이드 항원에 특이적인 모체 TCR로부터의 $TCR\alpha$ 쇄를 인코딩하는 비-내인성 폴리뉴클레오타이드를 포함하고,

상기 하나 이상의 간질세포가 델타-유사-1(Delta-like-1) 또는 델타-유사-4를 인코딩하는 비-내인성 폴리뉴클레오타이드 및 MHC 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 단계;

(b) DN $TCR\alpha\beta^+$ 흡선세포로부터 $TCR\beta$ 쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 단리하고, 세포 표면상에서 TCR을 발현할 수 있고 단계 (a)로부터의 $TCR\alpha$ 쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포 내로 상기 $TCR\beta$ 쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 도입하는 단계; 및

(c) 단계 (b)에서 생성된 세포 중에서, 증강된 친화성 TCR을 발현하는 세포를 동정하는 단계를 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 조혈전구세포가 흡선전구세포를 포함하거나, 또는 조혈줄기세포 또는 태아줄기세포로부터 유래하는, 시험관 내 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 조혈전구세포가 골수 또는 제대혈로부터 유래하는 조혈줄기세포로부터 유래하는 것인, 시험관 내 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

(i) $TCR\alpha$ 쇄를 인코딩하는 비-내인성 폴리뉴클레오타이드가 바이러스 벡터를 사용하여 단계 (a)의 조혈전구세포 내로 도입된 것이고/것이거나;

(ii) 단계 (b)가 DN $TCR\alpha\beta^+$ 흡선세포로부터의 $TCR\beta$ 쇄를 인코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드를 바이러스 벡터를 사용하여 세포 표면상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포 내로 도입하는 것을 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, (i) 및/또는 (ii)의 바이러스 벡터가 레트로바이러스 벡터를 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, (i) 및/또는 (ii)의 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터를 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, (i) 및/또는 (ii)의 바이러스 벡터가 형질도입을 위한 유전자 마커를 추가로 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 형질도입을 위한 유전자 마커가 녹색 형광 단백질 또는 인간 CD2의 세포외 도메인을 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 하나 이상의 간질세포가 델타-유사-1 단백질을 인코딩하는 비-내인성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 하나 이상의 간질세포가 MS5, S17, HGS2.11, HGS2.52, HGS.18, HGS3.30, HGS3.65, HGS.3.66, HGS3.103, HGS3.114, OP9, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 유래하는, 시험관 내 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 단계 (c)에서 증강된 친화성 TCR을 발현하는 세포의 동정이 MHC-펩타이드 사량체 염색의 사용을 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 세포 표면상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포가 TCR α^-/β^- 58 T 세포 하이브리도마로부터 유래하는, 시험관 내 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 단계 (c)의 증강된 친화성 TCR, 모체 TCR 또는 둘 다가 인간 TCR을 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, MHC 분자가 부류 I MHC 분자를 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, MHC 분자가 HLA-A1 및 인간 베타-2-마이크로글로불린(β 2M)을 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, MHC 분자가 부류 II MHC 분자를 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 펩타이드 항원이 바이러스 항원, 세균 항원, 암 항원 및 자가면역 항원으로부터 선택되는, 시험관 내 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 펩타이드 항원이 WT1 펩타이드 항원 또는 메소텔린 펩타이드 항원인, 시험관 내 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 펩타이드 항원이 아미노산 서열 RMFPNAPYL(서열번호 2)을 포함하는 WT1 펩타이드 항원인, 시험관 내 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 펩타이드 항원이 아미노산 서열 GQKMNAQAI(서열번호 31)을 포함하는 메소텔린 펩타이드 항원인, 시험관 내 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 단계 (a)에서의 접촉이 웨타이드 항원을 배양 중에 조혈전구세포 및 하나 이상의 간질세포와 조합하는 것을 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 하나 이상의 간질세포가 웨타이드 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 단계 (b)에서의 단리가 모체 TCR의 β 쇄와 동일한 $V\beta$ 유전자를 포함하는 하나 이상의 TCR β 쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 선별하는 것을 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 단계 (b)에서 도입된 폴리뉴클레오타이드에 의해 인코딩되는 TCR β 쇄가 모체 TCR 쇄와 동일한 CDR1 및 CDR2 도메인을 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 시험관 내 방법에 의해 생성되는 포유동물 세포로서,
모체 TCR로부터의 TCR α 쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 포유동물 세포에 대해 비-내인성이고,
TCR β 쇄를 인코딩하는 비-내인성 폴리뉴클레오타이드가 모체 TCR β 쇄와 동일한 $V\beta$ 유전자를 포함하고,
증강된 친화성 TCR의 발현된 TCR β 쇄가 모체 TCR β 쇄와 동일한 CDR1 및 CDR2 도메인을 포함하고,
웨타이드 항원이 WT1 웨타이드 항원 또는 메소텔린 웨타이드 항원인, 포유동물 세포.

청구항 26

제25항의 포유동물 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는, WT1 웨타이드 항원 또는 메소텔린 웨타이드 항원과 연관된 암을 갖는 대상체를 치료하기 위한 약제학적 조성물로서, WT1 웨타이드 항원과 연관된 암이 유방암, 난소암, 급성 백혈병, 혈관 종양, 흑색종, 결장암, 폐암, 갑상선암, 골 및 연질 조직 육종, 또는 식도암이고, 메소텔린 웨타이드 항원과 연관된 암이 상피 중피종, 난소암 또는 편평 상피암인, 약제학적 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 대상체가 인간인, 약제학적 조성물.

청구항 28

제26항에 있어서, 증강된 친화성 TCR이 인간 TCR인, 약제학적 조성물.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 세포가 T 세포인, 약제학적 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, T 세포가 조절성 T 세포인, 약제학적 조성물.

청구항 31

제29항에 있어서, T 세포가 $CD8^+$ T 세포, $CD4^+$ T 세포 또는 둘 다인, 약제학적 조성물.

청구항 32

제29항에 있어서, T 세포가 대상체에게 자가인, 약제학적 조성물.

청구항 33

펩타이드 항원에 특이적인 모체 TCR에 비해 상기 펩타이드 항원에 대해 증강된 친화성을 갖는 T 세포 수용체 (TCR)를 발현하는 세포를 생성하는 시험관 내(*in vitro*) 방법으로서, 상기 방법이:

- (a) 모체 TCR로부터의 TCR α 쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포 내로, 이중 음성(DN) TCR α β⁺ 흉선세포로부터 유래한 TCRβ 쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 도입하여, 세포 표면상에 TCR을 발현하는 세포를 생성하는 단계; 및
- (b) 단계 (a)에서 생성된 세포 중에서 증강된 친화성 TCR을 발현하는 세포를 동정하는 단계를 포함하고,

상기 DN TCR α β⁺ 흉선세포가 모체 TCR로부터의 TCR α 쇄를 인코딩하는 비-내인성 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 조혈전구세포로부터 분화되었고,

상기 분화가 조혈전구세포를 펩타이드 항원, 및 (i) 엘타-유사-1 또는 엘타-유사-4를 인코딩하는 비-내인성 폴리뉴클레오타이드 및 (ii) MHC 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 간질세포와 접촉시킴으로써 유도되었던 것인, 시험관 내 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 단계 (b)에서 증강된 친화성 TCR을 발현하는 세포의 동정이 MHC-펩타이드 사량체 염색의 사용을 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 증강된 친화성 TCR, 모체 TCR, 또는 둘 다가 인간 TCR인, 시험관 내 방법.

청구항 36

제33항 또는 제34항에 있어서, 펩타이드 항원이 바이러스 항원, 세균 항원, 암 항원 및 자가면역 항원으로부터 선택되는, 시험관 내 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 펩타이드 항원이 WT1 펩타이드 항원 또는 메소텔린 펩타이드 항원인, 시험관 내 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 펩타이드 항원이 아미노산 서열 RMFPNAPYL(서열번호 2)을 포함하는 WT1 펩타이드 항원인, 시험관 내 방법.

청구항 39

제37항에 있어서, 펩타이드 항원이 아미노산 서열 GQKMNAQAI(서열번호 31)을 포함하는 메소텔린 펩타이드 항원인, 시험관 내 방법.

청구항 40

제33항에 있어서, TCRβ 쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 모체 TCR의 β 쇄와 동일한 Vβ 유전자를 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 41

펩타이드 항원에 특이적인 모체 TCR에 비해 상기 펩타이드 항원에 대해 증강된 친화성을 갖는 T 세포 수용체 (TCR)를 동정하는 시험관 내 방법으로서, 상기 방법이:

변형된 세포에 의해 상기 세포 표면상에서 발현된 하나 이상의 TCR의 결합 친화성을 평가하여 증강된 친화성 TCR을 동정하는 것을 포함하고,

상기 변형된 세포가 (a) 모체 TCR로부터의 TCR α 쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 및 (b) 이중 음성(DN)

TCR $\alpha \beta^+$ 흥선세포로부터 유래한 TCR β 쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고,

상기 DN TCR $\alpha \beta^+$ 흥선세포가 모체 TCR로부터의 TCR α 쇄를 인코딩하는 비-내인성 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 조혈전구세포로부터 분화되었고,

상기 분화가 조혈전구세포를 웹타이드 항원, 및 (i) 엘타-유사-1 또는 엘타-유사-4를 인코딩하는 비-내인성 폴리뉴클레오타이드 및 (ii) MHC 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 간질세포와 접촉시킴으로써 유도되었던 것인, 시험관 내 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, TCR 결합 친화성의 평가가 MHC-펩타이드 사량체 염색의 사용을 포함하는, 시험관 내 방법.

청구항 43

제41항에 있어서, 증강된 친화성 TCR, 모체 TCR, 또는 둘 다가 인간 TCR인, 시험관 내 방법.

청구항 44

제41항에 있어서, 웹타이드 항원이 바이러스 항원, 세균 항원, 암 항원 및 자가면역 항원으로부터 선택되는, 시험관 내 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 웹타이드 항원이 WT1 웹타이드 항원 또는 메소텔린 웹타이드 항원인, 시험관 내 방법.

청구항 46

제44항에 있어서, 웹타이드 항원이 아미노산 서열 RMFPNAPYL(서열번호 2)을 포함하는 WT1 웹타이드 항원인, 시험관 내 방법.

청구항 47

제44항에 있어서, 웹타이드 항원이 아미노산 서열 GQKMNAQAI(서열번호 31)을 포함하는 메소텔린 웹타이드 항원인, 시험관 내 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, TCR β 쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 모체 TCR의 β 쇄와 동일한 V β 유전자를 포함하는, 시험관 내 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원의 상호 참조

[0002]

본 출원은, 이의 전체가 본원에서 참조로서 도입되는, 2012년 5월 3일자로 출원된 미국 가출원 제61/642,358호에 대해 35 U.S.C. § 119(e)하의 이익을 주장한다.

[0003]

서열 목록에 관한 진술

[0004]

본 출원과 관련된 서열 목록은 문서 사본를 대신에 텍스트 형식으로 제공되고, 명세서 중에 참조로서 도입된다. 서열 목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 360056_412WO_SEQUENCE_LISTING.TXT이다. 텍스트 파일은 129KB이고, 2013년 5월 2일에 작성되었으며, EFS-Web를 통해 전자적 문서로 제출된다.

[0005]

정부 권리의 진술

[0006]

본 발명은 미국 건강/국립 암 연구소의 국립 연구소에 의해 부여된 계약 번호 P01 CA 18029하에 미국 정부의 지원을 받아 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 있어서 일정의 권리를 갖는다.

[0007]

기술 분야

[0008] 본 발명은 증강된 친화성 T 세포 수용체(TCR) 및, 보다 특히 항원 특이적 TCR α 를 발현하는 조혈전구세포의 효능제 선택을 사용하여 증강된 친화성 TCR을 생성하는 방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0009] TCR 유전자 치료는 종양 항원-특이적 T 세포 클론을 단리, 특성화 및 확장하는데 필요한 대규모 시간 및 노력 등과 같이 종래의 T 세포 양자 면역요법과 관련된 다수의 장애를 극복할 수 있는 새로운 치료 방법이다[참조: Schmitt, Ragnarsson, & Greenberg, 2009, Hum. Gene Ther. 20:1240-1248]. 유전자 치료법의 추가의 잇점은 생체내에서 장기간 지속할 수 있는 T 세포의 정의된 모집단을 이용하는 능력을 포함한다[참조: Berger et al., 2008, J. Clin. Invest. 118:294-305; Hinrichs et al., 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:17469-17474]. 이러한 T 세포는, 종양 항원에 대해 고친화성을 가져 항종양 효과를 매개할 가능성을 증가시키는, 잘 특성화된 TCR을 인코딩하는 유전자로 형질도입할 수 있다. 실제, 자가/종양-항원을 표적화하는 고친화성 키메라 수용체를 발현하는 유전자 변형된 T 세포를 사용하여 고도의 B 세포 백혈병을 표적화하는 치료법에 대한 최근의 보고는 백혈병을 치료하기 위해 조작된 고친화성 T 세포를 사용할 가능성을 강조해 왔다[참조: Kalos et al., 2011, Sci. Transl. Med. 3:95ra73]. 그러나, T 세포 면역요법에 의해 표적화된 대부분의 종양 항원은 과발현된 자가 단백질이기 때문에, 이들 항원에 특이적인 고친화성 T 세포는 일반적으로 흥선에서 음성 선택의 대상이 된다. 따라서, T 세포 기반 면역요법의 한 가지 중요한 제한은 일반적으로 비돌연변이된 종양 항원에 대해 충분히 고친화성을 갖는 내인성 TCR을 발현하는 T 세포의 제한된 이용가능성이다.

[0010] 몇몇 전략은 TCR 유전자 치료에서 사용하기 위해 의도된 TCR의 친화성을 증강시키기 위해 개발되었다[참조: Richman & Kranz, 2007, Biomol. Eng. 24:361-373; Udyavar et al., 2009, J. Immunol. 182:4439-4447; Zhao et al., 2007, J. Immunol. 179:5845-5854]. 이들 방법은 표적 웨타이드/MHC 리간드에 대해 보다 고친화성을 부여하는 수회의 돌연변이유발 및 후속의 돌연변이체 스크리닝을 겪은 TCR 돌연변이체의 라이브러리의 생성을 수반한다. 돌연변이는 웨타이드/MHC와 상호작용하는 것으로 공지된 CDR 영역에서 일반적으로 이루어진다. CDR1 및 CDR2 영역은 MHC 분자와 주로 접촉하고, 초가변성 CDR3 영역은 주로 웨타이드를 접촉한다[참조: Wucherpfennig et al., 2010, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2:a005140-a005140]. 부위-지정 돌연변이유발 전략은 일반적으로 이들 영역 3개 모두의 선택된 부분을 표적화하지만, 보다 고친화성 변이체를 생성하는데 항상 성공한 것은 아니며, 개선은 단지 특이적으로 표적화된 영역에서의 변화로 제한된다. 더욱이, MHC 접촉 잔기 내로 도입된 돌연변이는 이의 동족 웨타이드에 대한 수용체의 전체 특이성을 감소시키면서 MHC에 대한 TCR의 친화성을 잠재적으로 증가시킬 위험성을 갖는다. 이상적으로, TCR의 친화성을 증강시키기 위해 도입된 대부분의 돌연변이는 이러한 이유로 CDR3 영역으로 제한될 것이다. 그러나, 현재의 방법들은, 부위-지정 돌연변이유발이 CDR3 영역의 본래 길이에 의해 제약되기 때문에, CDR3 다양성을 생성하는 능력이 제한되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 관련하는 종양 관련 항원을 인식하는 고친화성 T 세포를 단리하는 것의 곤란성을 고려하면, 증강된 친화성 TCR을 생성하는 또 다른 방법이 지속적으로 요구되고 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 한 가지 양상에서, 본 발명은, a) 조혈전구세포를, DN TCR $\alpha\beta^+$ 흥선세포로 조혈전구세포의 분화를 유도하는데 충분한 조건과 및 시간 동안 간질세포 및 웨타이드 항원과 접촉시키는 단계로서, 상기 조혈전구세포는 웨타이드 항원에 특이적인 친(parent) TCR로부터의 TCR α 쇄를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열을 포함하고, 상기 간질세포는 델타-유사-1 (Delta-like-1) 또는 델타-유사-4를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열 및 MHC 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단계; b) DN TCR $\alpha\beta^+$ 흥선세포로부터 다양한 TCR β 쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 단리하고, TCR β 쇄를 인코딩하는 핵산 서열을, 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있고 단계 (a)로부터의 TCR α 쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 세포 내로 도입하는 단계; 및 c) 증강된 친화성 TCR을 동정하는 단계 (예를 들어, MHC 사량체 분석에 의해 고친화성 TCR $\alpha\beta$ 후보자를 검출 또는 선택하고, 이어서 모체 (parent) TCR $\alpha\beta$ 와 비교하여 결합 친화성을 측정함으로써)를 포함하는, 증강된 친화성 T 세포 수용체(TCR)을 생성하는 방법을 제공한다.

[0013] 추가의 양상에서, 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 증강된 친화성 TCR이 제공되고, 이는 세포 결합된 또는 가

용성 형태일 수 있고 추가로 T 세포에서의 발현을 증강시키기 위해 최적화된 코돈일 수 있다.

[0014] 추가의 양상에서, 본 발명의 증강된 친화성 TCR은 증강된 친화성 TCR을 포함하는 조성물을 투여함으로써 대상체에서 질환(예를 들면, 암, 감염성 질환 또는 자가면역 질환)을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 추가의 실시형태에서, 본 발명의 증강된 친화성 TCR은 본원에서 확인된 정후 또는 증상과 관련하여 사용된 이들 방법을 포함하여 진단 방법 또는 영상화 방법에 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명의 이들 및 기타 양상은 하기 상세한 설명 및 첨부된 도면을 참조하면 명백해질 것이다. 본원에 개시된 모든 참고문헌은 각각이 개별적으로 도입된 것과 같이 이들의 전체가 본원에 참조로서 도입된다.

[0017] 본 발명은 항원-특이적 TCR로부터의 TCR α 쇄가, 목적하는 항원을 표적화하도록 신규한 선택 공정을 통한 음성 선택과 독립적인 T 세포 성숙을 유리하게 유도할 수 있는 신규의 증강된 친화성 수용체를 형성하기 위해 시험관내에서 T 세포 발달 동안 항원-특이적 TCR α 쇄와 쌍을 이루는 새롭게 생성된 TCR β 쇄를 선별하기 위해 사용되는 증강된 또는 고친화성 TCR을 생성하는 방법 및 조성물을 제공한다.

[0018] 한 가지 양상에서, 본 발명은, 조혈전구세포(항원 특이적 TCR α 쇄를 인코딩하는 비-내인성 핵산 서열을 함유함)를, 조혈전구세포의 DN TCR α β⁺ 흥선세포로의 분화를 유도할 수 있는 웹타이드 항원의 존재하에 간질세포(델타-유사-1 또는 델타-유사-4를 인코딩하는 비-내인성 핵산 서열 및 MHC 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 함유함)와 함께 배양함으로써 증강된 친화성 T 세포 수용체(TCR)을 생성하는 방법을 제공한다. 이어서, DN TCR α β⁺ 흥선세포로부터 다양한 TCR β 쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 단리하고, TCR을 세포 표면 상에서 발현할 수 있고 또한 상술한 TCR α 쇄를 발현하는 세포 내로 도입한다. 마지막으로, 증강된 친화성 TCR을 후보 TCR α β의 결합 친화성을 모체 TCR α β와 비교함으로써 동정한다.

[0019] 추가로, 본 발명은 이러한 방법을 사용하여 생성한 증강된 친화성 TCR, 및 대상체에서 질환(예를 들면, 암, 감염성 질환, 자가면역 질환)의 치료를 포함하는 다양한 치료학적 분야에서 본 발명의 증강된 친화성 TCR을 사용하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명을 보다 상세히 기재하기에 앞서, 본원에서 사용되는 특정 용어의 정의를 제공하는 것이 이의 이해에 유용할 수 있다. 추가의 정의는 본 명세서 전체에 걸쳐 기재되어 있다.

[0021] 본 명세서에서, 용어 "약" 및 "실질적으로 이루어진"은, 달리 지시되지 않는 한, 지시된 범위, 값 또는 구조의 ±20%를 의미한다. 본원에 사용된 용어 "하나" (a, an)은 열거된 성분의 "하나 또는 그 이상"을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 대체(예를 들면, "또는")의 사용은 어느 하나, 둘 다, 또는 대체의 임의의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포함한다", "갖는다" 및 "포함하는"은 동의적으로 사용되고, 이의 용어 및 변형태는 비제한적인 것으로 해석되는 것을 의도한다.

[0022] "T 세포 수용체"(TCR)는, CD3과 관련하여, 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자에 결합된 항원을 인식하는 것의 일반적 원인인 T 세포(또는 T 림프구)의 표면 상에서 발견된 분자를 지칭한다. TCR은 대부분의 T 세포에서 고도의 가변성 α 및 β 쇄(각각 TCR α 및 TCR β로서 각각 공지됨)의 디설파이드-결합된 헤테로이량체를 갖는다. T 세포의 작은 서브세트에서, TCR은 가변 γ 및 δ 쇄(각각 TCR γ 및 TCR δ로서 또한 공지됨)의 헤테로이량체로 구성된다. TCR의 각각의 쇄는 면역글로불린 상과 (superfamily)의 구성원이고, 하나의 N-말단 면역글로불린 가변 도메인, 하나의 면역글로불린 불변 도메인, 막판통 영역, 및 C-말단의 짧은 세포질 테일을 갖는다[참조: Janeway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997]. 본원에 사용된 TCR은 인간, 마우스, 랙트 또는 기타 포유동물을 포함하는 다양한 동물 종의 것일 수 있다. TCR은 세포-결합된 또는 가용성 형태일 수 있다.

[0023] 본 발명의 TCR 및 이의 결합 도메인은 "면역특이적"일 수 있거나, 이들이 친화성 또는, 예를 들면, 약 10^5 M^{-1} , 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} , 10^{12} M^{-1} 또는 10^{13} M^{-1} 이상의 K_a (즉, 1/M의 단위를 갖는 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수)을 갖는 표적 분자와 결합하는 경우, 시험 샘플에 존재하는 기타 성분과 현저히 결합하지 않으면서 표적과 "특이적으로 또는 선택적으로 결합"하는 것을 포함하여 목적하는 정도로 결합할 수 있다. "고친화성" 결합 도메인은 적어도 10^7 M^{-1} , 적어도 10^8 M^{-1} , 적어도 10^9 M^{-1} , 적어도 10^{10} M^{-1} , 적어도 10^{11} M^{-1} , 적어도 10^{12} M^{-1} , 적어도 10^{13} M^{-1} 이상의 K_a 를 갖는 이들 결합 도메인을 지칭한다. 대안적으로, 친화성

은 M의 단위(예: 10^{-5} M 내지 10^{-13} M)를 갖는 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수(K_d)로서 정의될 수 있다. 본 발명에 따르는 TCR 및 결합 도메인 폴리펩타이드의 친화성은 통상의 기술을 사용하여 용이하게 측정할 수 있다 [참조: Scatchard et al. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; 및 U.S. Pat. Nos. 5,283,173; 5,468,614, Biacore^R analysis, 또는 이의 등가물]. 따라서, "증강된 친화성 T 세포 수용체"(증강된 친화성 TCR)는 야생형 (또는 친) TCR이 아닌 표적 항원에 대해 강력한 결합을 갖는 선택된 또는 조작된 TCR을 지칭한다. 증강된 친화성은, 야생형(또한 모체 또는 본래로서 불리움) TCR의 것보다 높은 표적 항원의 경우에 K_a (평형 결합 상수)를 갖는 TCR에 의해, 야생형(또한 모체 또는 본래로서 불리움) TCR보다 작은 표적 항원의 경우에 K_d (해리 상수)를 갖는 TCR에 의해, 또는 야생형(또는 친) TCR보다 작은 표적 항원의 경우에 오프-속도(K_{off})로 지시될 수 있다.

[0024] "주요 조직적합성 복합체 분자"(MHC 분자)는 웨პ타이드 항원을 세포 표면에 전달하는 당단백질을 지칭한다. MHC 부류 I 분자는 막 확장 α 쇄(3개의 α 도메인을 가짐) 및 비공유 결합된 마이크로글로불린으로 이루어진 헤테로이량체이다. MHC 부류 II 분자는, 둘다 막을 확장하는 2개의 막관통 당단백질, α 및 β 로 구성되어 있다. 각각의 쇄는 2 개의 도메인을 갖는다. MHC 부류 I 분자는 시토졸에서 기원하는 웨პ타이드를 세포 표면에 전달하고, 여기서 웨პ타이드:MHC 복합체는 $CD8^+$ T 세포에 의해 인식된다. MHC 부류 II 분자는 소포 시스템에서 기원하는 웨პ타이드를 세포 표면에 전달하고, 여기서 이들은 $CD4^+$ T 세포에 의해 인식된다. MHC 분자는 인간, 마우스, 랫트 또는 기타 포유동물을 포함하는 다양한 동물 종의 것일 수 있다.

[0025] "조혈전구세포"는 성숙 세포 유형으로 추가로 분화할 수 있는 조혈줄기세포 또는 태아 조직으로부터 유래하는 세포(예를 들면, T 세포 계통의 세포)이다. 특정 실시형태에서, $CD24^{lo} Lin^- CD117^+$ 조혈전구세포가 사용된다. 본원에서 정의된 바와 같이, 조혈전구세포는 배아줄기세포를 포함할 수 있고, 이는 T 세포 계통의 세포로 추가로 분화할 수 있다. 조혈전구세포는 인간, 마우스, 랫트 또는 기타 포유동물을 포함하는 다양한 동물 종의 것일 수 있다.

[0026] "흉선전구세포" 또는 "흉선세포"는 흉선에 존재하는 조혈전구세포이다.

[0027] "조혈줄기세포"는 생체내 또는 생체외에서 실질적으로 비제한적으로 증식할 수 있고 T 세포 계통의 세포를 포함하는 기타 세포 유형으로 분화할 수 있는 미분화 조혈 세포를 지칭한다. 조혈줄기세포는, 예를 들면, 태아 간, 골수 및 제대혈로부터 단리할 수 있다.

[0028] "T 세포 계통의 세포"는 기타 림프구 세포로부터의 세포 및 적혈구 또는 골수 계통의 세포를 구별하는 T 세포 또는 이의 전구체 또는 선조의 적어도 하나의 표현형 특성을 나타내는 세포를 지칭한다. 이러한 표현형 특징은 T 세포(예: $CD8^+$)에 특이적인 하나 또는 그 이상의 단백질의 발현, 또는 T 세포에 특이적인 생리학적, 형태학적, 기능학적 또는 면역학적 특성을 포함할 수 있다. 예를 들면, T 세포 계통의 세포는 T 세포 계통에 위탁된 선조 또는 전구체 세포; $CD25^+$ 미성숙 및 불활성화된 T 세포; $CD4$ 또는 $CD8$ 계통 위탁을 받은 세포; $CD4^+CD8^+$ 이중 양성인 흉선전구세포; 단일 양성 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$; TCR $\alpha \beta$ 또는 TCR $\gamma \delta$; 또는 성숙 및 작용성 또는 활성화된 T 세포일 수 있다.

[0029] "간질세포"는 임의 기관의 결합 조직 세포이다. 특정 실시형태에서, 간질세포는 골수 간질세포이다. DLL1 또는 DLL4를 발현하도록 조작될 수 있는 간질세포주의 예는 마우스 간질세포주 MS5[참조: Itoh, et al., Exp. Hematol. 1989, 17:145-153] 및 S17, 및 인간 간질세포주 HGS2.11, HGS2.52, HGS.18, HGS3.30, HGS3.65, HGS.3.66, HGS3.103, 및 HGS3.114[휴먼 게놈 사이언시스 인코포레이티드사에서 입수가능, MD, 미국 공개 출원 제20020001826호 참조]를 포함한다. 특정 실시형태에서, OP9 세포[참조: Kodama et al., 1994, Exp. Hematol. 22:979-984; 리켄 세포 보관소에 입수가능]가 사용된다. DLL1 및 DLL4를 발현하는 OP9 세포는 이미 기재되어 있다[참조: Schmitt et al., 2002, Immunity:17:749-756; U.S. Patent No. 7,575,925].

[0030] "이중 음성 TCR $\alpha \beta$ 흉선세포"(DN TCR $\alpha \beta$ 흉선세포)는, CD4 및 CD8 공-수용체를 발현하지 않지만 TCR α 및 β 쇄를 발현하는 흉선세포의 모집단을 지칭한다.

[0031] "웨პ타이드 항원"은, 항원으로서 TCR 또는 이의 결합 도메인에 의해 특이적으로 인식되고 보다 긴 표적 생물학적 분자(예: 폴리웨პ타이드, 단백질)의 단편 또는 이의 유도체로부터 유래하거나 이에 기반할 수 있는 약 7개 아미노산 내지 약 25개 아미노산 길이 범위의 아미노산 서열을 지칭한다. 항원은 세포 표면 상에서, 세포 내에서, 또는 내재성 막 단백질로서 발현될 수 있다. 항원은 숙주 유래(예: 종양 항원, 자가면역 항원)될 수 있거나 외

래 기원(예: 세균, 바이러스)일 수 있다.

[0032] "핵산 서열" 또는 폴리뉴클레오타이드는 cDNA, 게놈 DNA 및 합성 DNA를 포함하는 RNA 또는 DNA의 형태일 수 있다. 핵산 서열은 이중사슬 또는 단일사슬일 수 있고, 단일사슬인 경우, 코딩 쇄 또는 비-코딩(안티센스 쇄) 쇄일 수 있다. 코딩 서열은 당해 기술분야에 공지된 코딩 서열과 동일할 수 있거나 상이한 코딩 서열일 수 있고, 이는 유전자 코드의 중복 또는 축중의 결과로서 또는 스플라이싱에 의해 동일한 폴리펩타이드를 인코딩한다.

[0033] "비내인성"은, 문자가 도입, 예를 들면, 재조합에 의해 도입되는 숙주 세포(들)/샘플에 존재하지 않는 문자(예: 핵산 서열)를 지칭한다. 비내인성 문자는 동일한 종 또는 상이한 종의 것일 수 있다.

[0034] 노치 리간드 "델타-유사-1"(DL1 또는 DLL1) 및 "델타-유사-4"(DL4 또는 DLL4)는 노치 델타 리간드의 동족체이고, 델타/세레이트(serrate)/재기드(jagged) 단백질 부류의 구성원이다. 이들은 조혈 동안 세포 운명 결정의 매개에서 중요한 역할을 하고, 세포-대-세포 통신에서 중요한 역할을 할 수 있다. 예시적 델타-유사-1 서열은 진뱅크(Genbank) 수탁 번호 NM_005618.3(서열번호 3) 및 NP_005609.3(서열번호 4)(각각 호모 사피엔스 (*Homo sapiens*) 전사물 및 단백질 서열) 및 진뱅크 수탁 번호 NM_007865.3(서열번호 5) 및 NP_031891.2(서열번호 6)(각각 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 전사물 및 단백질 서열)을 포함한다. 예시적 델타-유사-4 서열은 진뱅크 수탁 번호 NM_019074.3(서열번호 7) 및 NP_061947.1(서열번호 8)(각각 호모 사피엔스(*Homo sapiens*) 전사물 및 단백질 서열) 및 진뱅크 수탁 번호 NM_019454.3(서열번호 9) 및 NP_062327.2(서열번호 10)(각각 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 전사물 및 단백질 서열)을 포함한다. 노치 리간드는 상업적으로 입수 가능하거나, 표준 재조합 DNA 기술로 생산되어 다양한 정도로 정제할 수 있다.

[0035] "배아줄기세포" 또는 "ES 세포" 또는 "ESC"는 발생 배의 생식 세포로 통합되어 이의 일부로 되는 능력을 갖는 미분화 배아줄기세포를 지칭한다. 배아줄기세포는 조혈전구세포로 분화할 수 있다. 본원에서 사용하기에 적합한 배아줄기세포는 J1 ES 세포주, 129J ES 세포주, 마우스 줄기 세포주 D3(아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection) 카탈로그 # CRL 1934), 129/Sv 마우스로부터 유래하는 R1 또는 E14K 세포주, Balb/c 및 C57B1/6 마우스로부터 유래하는 세포주 및 인간 배아줄기세포[예를 들면, 위셀 리씨치 인스티튜트(WiCell Research Institute)사, WI; 또는 ES 셀 인터네셔널(ES cell International)사, 멜버른, 오스트렐리아]로부터의 세포를 포함한다.

[0036] "WT1"은 빌름 종양 (Wil'm's tumor) 1, C-말단에 4개의 징크-핑거 모티브 및 N-말단에 프롤린/글루타민-풍부 DNA 결합 도메인을 함유하는 전사 인자를 지칭한다. WT1은 뇨생식 시스템의 정상 발달에서 중요한 역할을 갖고, 빌름 종양을 갖는 환자의 작은 서브세트에서 돌연변이된다. WT1의 고도 발현은 유방암, 난소암, 급성 백혈병, 혈관 종양, 흑색종, 결장암, 폐암, 갑상선암, 골 및 연질 조직 육종, 및 식도암을 포함하는 다양한 암에서 관찰된다. 선택적 스플라이싱은 WT1을 위해 주목된다. 예시적 WT1 서열은 진뱅크 수탁 번호: NM_000378.4(서열번호 11)(인간 전사물), NP_000369.3(서열번호 12)(인간 단백질); NM_024424.3(서열번호 13)(인간 전사물), NP_077742.2(서열번호 14)(인간 단백질); NM_024426.4(서열번호 15)(인간 전사물), NP_077744.3(서열번호 16); NM_001198552.1(서열번호 17), NP_001185481.1(서열번호 18)(인간 단백질); NM_001198551.1(서열번호 19) (인간 전사물), NP_001185480.1(서열번호 20)(인간 단백질); NM_144783.2(서열번호 21)(마우스 전사물), 및 NP_659032.3(서열번호 22)(마우스 단백질)을 포함한다.

[0037] "메소텔린"(MSLN)은 2개 생성물, 거핵구 증강 인자 및 메소텔린으로 절단되는 전구체 단백질을 인코딩하는 유전자를 지칭한다. 거핵구 강화 인자는 골수 거핵구에서 콜로니 형성을 자극할 수 있는 사이토kin으로 기능한다. 메소텔린은 세포 부착 단백질로서 기능할 수 있는 글리코실포스파티딜이노시톨-앵커 세포-표면 단백질이다. 이 단백질은 상피 중피종, 난소암 및 특정 편평 상피암에서 과발현된다. 선택적 스플라이싱은 다중 전사 변이체를 생성한다. 예시적 메소텔린 서열은 진뱅크 수탁 번호: NM_001177355.1(서열번호 23), NP_001170826.1(서열번호 24)(각각 인간 전사물 및 예비-단백질 서열); NM_005823.5(서열번호 25), NP_005814.2(서열번호 26)(각각 인간 전사물 및 예비-단백질 서열); NM_013404.4(서열번호 27), NP_037536.2(서열번호 28)(각각 인간 전사물 및 예비-단백질 서열); NM_018857.1(서열번호 29), NP_061345.1(서열번호 30)(각각 마우스 전사물 및 전구체 단백질 서열)을 포함한다.

[0038] "MHC-펩타이드 사량체 염색"은 MHC 분자의 사량체를 특징으로 하는 항원-특이적 T 세포의 검출에 사용된 분석을 지칭하고, 각각은 적어도 하나의 항원에 동족(예를 들어, 동일 또는 관련되는)인 아미노산 서열을 갖는 동일한 펩타이드를 포함하고, 여기서 복합체는 동족 항원에 특이적인 T 세포에 결합할 수 있다. 각각의 MHC 분자는 비오턴 분자로 태그 부착할 수 있다. 비오티닐화 MHC/펩타이드는 통상 형광 표지되는 스트렙트아비딘의 부가에 의해 사량체화된다. 사량체는 형광 표지를 통한 유동 세포분석에 의해 검출할 수 있다. 특정한 실시형태에서,

MHC-펩타이드 사량체 분석은 본 발명의 고친화성 TCR의 검출 또는 선택에 사용된다.

[0040] 증강된 친화성 TCR을 생성하는 방법

배경으로서, 흥선에서 T 세포 발달 동안, 전구 흥선세포는 다수의 TCR-매개된 체크포인트에 제공된다. 이들중 첫번째는 β -선택으로 불리우며, 마우스 T 세포 발달의 이중 음성 3(DN3) 단계에서 발생한다. Tcrb 유전자 좌에서 성공적 재배열을 생성하는 DN3 세포는 불변 프리-T α 단백질과 쌍을 이룬 세포 표면에서 TCR β 단백질을 발현할 수 있다. 이 수용체는 Pre-TCR이라 불리우며, 이는 CD4/CD8 이중 양성(DP) 단계로 $\alpha\beta$ 계통 세포의 증식 및 분화 및 Tcra 유전자 좌에서 재배열을 촉진시키기 위해 리간드-독립적 방식으로 신호전달한다[참조: Boehmer et al., 1999, Curr. Opin. Immunol. 11:135-142]. TCR α 좌는 불활성이고 β -선택 전에 TCR 유전자 재배열로 폐쇄되고, TCR γ 및 δ 좌는 또한 발달의 DN3 단계에서 재배열을 겪고, 이들 두 좌 모두에서 성공적 재배열은 $\gamma\delta$ T 세포 계통으로 분화를 유도하는 신호를 제공할 수 있는 성숙 $\gamma\delta$ -TCR의 발현을 제공하고, $\gamma\delta$ T 세포는 발달 동안 DP 단계를 통해 분화하지 않고, 일반적으로 DN 또는 CD8 $\alpha\alpha+$ 가 잔류하지 않는다. $\alpha\beta/\gamma\delta$ 세포 운명 결정은 이러한 발달 단계에서 TCR 신호의 강도에 의해 결정되고, 이는 발달 T 세포가 성숙 $\gamma\delta$ TCR과 관련된 보다 강력한 신호에 의해 프리-TCR 신호 및 $\gamma\delta$ TCR 신호를 구별하기 때문이다[참조: Pennington, Silva-Santos, & Hayday, 2005, Curr. Opin. Immunol. 17:108-115]. 흥미롭게도, 다수의 $\gamma\delta$ TCR 유전자도입 마우스는 흥선에서 성숙 CD24⁻ TCR $\alpha\beta$ 양성 CD4/CD8 이중 음성(DN) 세포의 보다 큰 모집단을 갖고, 이는 β -선택에서 성숙 $\alpha\beta$ 유전자도입 TCR로부터 보다 강력한 신호의 결과로서 발달하는 " $\gamma\delta$ 워너비" 세포를 나타내는 것으로 밝혀졌다[참조: Egawa et al., 2000, PLOS One 3:1512].

[0042] 본원에는 증강된 친화성 TCR을 생성하는 방법이 개시되어 있고, 여기서 β -선택 전에 항원-특이적 TCR α 쇄의 이소성 발현은, 시험관내 T 세포 분화 동안 동족 항원의 존재하에 분화시키는 경우, 동일한 항원에 대해 고친화성 TCR을 발현하는 T 세포의 발달을 가능하게 한다. 이 방법을 사용하여, 고친화성 수용체를 발현하는 T 세포는 T 세포 발달의 DN3 단계에서 효능제 신호에 반응하여 DN TCR $\alpha\beta^+$ 계통 운명을 채용함으로써 음성 선택을 우회한다.

[0043] 특정 실시형태에서, 본 발명은, a) 조혈전구세포를, DN TCR $\alpha\beta^+$ 흥선세포로 조혈전구세포의 분화를 유도하는데 충분한 조건과 및 시간 동안 간질세포 및 펩타이드 항원과 접촉시키는 단계로서, 상기 조혈전구세포는 펩타이드 항원에 특이적인 모체 TCR로부터의 TCR α 쇄를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열을 포함하고, 상기 간질세포는 멜타-유사-1 또는 멜타-유사-4를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열 및 MHC 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단계; , b) DN TCR $\alpha\beta^+$ 흥선세포로부터 다양한 TCR β 쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 단리하고, TCR β 쇄를 인코딩하는 핵산 서열을, 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있고 단계 (a)로부터의 TCR α 쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 세포 내로 도입하는 단계; 및 c) 증강된 친화성 TCR을 동정하는 단계 (예를 들어, MHC 사량체 분석에 의해 고친화성 TCR $\alpha\beta$ 후보를 검출 또는 선택하고, 이어서 모체 TCR $\alpha\beta$ 와 비교하여 결합 친화성을 측정함으로써)를 포함하는, 증강된 친화성 T 세포 수용체(TCR)을 생성하는 방법을 제공한다.

[0044] 특정 실시형태에서, 조혈전구세포는 흥선전구세포 또는 배아줄기세포를 포함한다. 기타 실시형태에서, 조혈전구 세포는 태아 간 조직으로부터 유래한다. 기타 실시형태에서, 조혈전구세포는 골수, 제대혈 또는 말초혈로부터 유래하거나 이로부터 기원하는 조혈줄기세포를 포함한다. 기타 실시형태에서, 조혈전구세포는 인간, 마우스, 랙트 또는 기타 포유동물로부터 유래한다. 특정 실시형태에서, CD24^{lo} Lin⁻ CD117⁺ 흥선전구세포가 사용된다.

[0045] 조혈전구세포는, 펩타이드 항원에 특이적인 모체 TCR로부터의 TCR α 쇄를 인코딩하는 비-내인성 핵산 서열을 포함하도록 변형된다. 특정한 실시형태에서, TCR β 쇄는 또한 모체 TCR로부터 단리된다. TCR α 및 β 쇄의 클로닝은 당해 기술분야에 공지된 표준 문자 생물학 기술을 사용하여 수행할 수 있다. TCR 쇄를 클로닝하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: Walchli et al., 2011, PLoS ONE 6:e27930; Birkholz et al., 2009, J. Immunol. Method 346:45-54; Kurokawa et al., 2001, Clin. Exp. Immunol. 123:340-345].

[0046] "간질세포"는 임의의 기관의 결합 조직 세포이다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 간질세포는 인간 및 마우스 간질세포를 포함한다. DL1 또는 DL4를 발현하도록 조작될 수 있는 간질세포주의 예는 마우스 간질세포주 MS5(Itoh, et al., Exp. Hematol. 1989, 17:145-153) 및 S17, 및 인간 간질세포주 HGS2.11, HGS2.52, HGS.18, HGS3.30, HGS3.65, HGS.3.66, HGS3.103, 및 HGS3.114(휴먼 게놈 사이언시스 인코포레이티드사에서 입수 가능, MD, US 공개 출원 제20020001826호 참조]. 특정 실시형태에서, 간질세포는 골수 간질세포이다. 추가의 실시형태에서, OP9 세포가 사용된다.

- [0047] 특정 실시형태에서, 간질세포는 인간 DL1 등의 DL1을 인코딩하는 비내인성 핵산 서열을 포함한다. 예시적 엘타-유사-1 서열은 진뱅크 수탁 번호 NM_005618.3(서열번호 3) 및 NP_005609.3(서열번호 4)(각각 호모 사피엔스 (*Homo sapiens*) 전사물 및 단백질 서열) 및 진뱅크 수탁 번호 NM_007865.3(서열번호 5) 및 NP_031891.2(서열번호 6)(각각 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 전사물 및 단백질 서열)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 간질세포는 인간 DL4 등의 DL4를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열을 포함한다. 예시적 엘타-유사-4 서열은 진뱅크 수탁 번호 NM_019074.3(서열번호 7) 및 NP_061947.1(서열번호 8)(각각 호모 사피엔스(*Homo sapiens*) 전사물 및 단백질 서열) 및 진뱅크 수탁 번호 NM_019454.3(서열번호 9) 및 NP_062327.2(서열번호 10)(각각 무스 무스쿨루스 (*Mus musculus*) 전사물 및 단백질 서열)을 포함한다. 노치 리간드는 상업적으로 입수 가능하거나, 표준 재조합 DNA 기술에 의해 생산되고 다양한 정도로 정제할 수 있다.
- [0048] 추가의 실시형태에서, 간질세포는 OP9 세포, 또는 인간 DL1 등의 DL1을 발현하는 이의 유도체이다. DL1 및 DL4를 발현하는 OP9 세포는 이미 기재되어 있다[참조: Schmitt et al., 2002, *Immunity* 17:749-756; U.S. Patent No. 7,575,925].
- [0049] 특정 실시형태에서, 간질세포는 또한 MHC 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 간질세포는 MHC 부류 1 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 임의로 또한 β 2 마이크로글로불린을 인코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. MHC 부류 I 및 β 2 마이크로글로불린 분자는 인간, 마우스, 랫트 또는 기타 포유동물 종 MHC 부류 I 분자로부터 유래할 수 있고, 이의 유전자 및 단백질 서열은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 다른 실시형태에서, 간질세포는 MHC 부류 II 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. MHC 부류 II 분자는 인간, 마우스, 랫트 또는 기타 포유동물 종 MHC 분자로부터 유래하고, 이의 유전자 및 단백질 서열은 당해 기술분야에 공지되어 있다.
- [0050] 제공된 T 세포는, 숙주 세포의 MHC 분자(MHC-제한된 항원 인식)에 결합되는 경우에만 웨타이드 항원을 인식할 것이다. 공지된 웨타이드 항원에 대해 특이성을 갖는 모체 TCR은 기재된 방법을 사용하여 TCR 친화성의 증강을 위해 선택된다. 따라서, 특정 웨타이드 항원에 결합하는 MHC 분자가 또한 선택되고 간질세포에서 발현되어 개시된 시험관내 시스템에서 MHC-제한된 항원 인식을 가능하게 한다. 웨타이드 항원에 결합하는 MHC 분자를 동정하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: Akatsuka et al., 2002, *Tissue Antigens* 59:502-511]. 특정 실시형태에서, MHC 분자는 바람직하게는 인간 기원의 HLA-A2 및 베타-2 마이크로글로불린을 포함하고, 이는, 예를 들면, WT1 웨타이드 RMFPNAPYL(서열번호 2)에 결합할 수 있다. 기타 실시형태에서, MHC 분자는, 예를 들면, 문헌[참조: Hung et al., 2007, *Gene Therapy* 14:921-929]의 도 3a에 개시된 바와 같은 WT1 웨타이드 RMFPNAPYL 또는 다양한 메소텔린 웨타이드에 결합할 수 있는 마우스 H-2D^b, 또는 문헌[참조: Hung et al.]의 도 3a에 개시된 바와 같은 다양한 메소텔린 웨타이드에 결합할 수 있는 H-2K^b를 포함한다. 문헌[참조: Hung et al.]에 개시된 잠재적 H-2D^b 제한된 메소텔린 에피토프는 ISKANVDL(서열번호 42), GQKMNAQAI(서열번호 43), SAFQNVSGL(서열번호 44) 및 LLGPNIVDL(서열번호 45)을 포함한다. 문헌[참조: Hung et al.]에 개시된 잠재적 H-2Kb 제한된 메소텔린 에피토프는 EIPFTYEQQL(서열번호 46) 및 GIPNGYLV(L(서열번호 47)을 포함한다.
- [0051] 개시된 방법에 사용된 웨타이드 항원은 항원의 웨타이드 서열, 또는 모체 TCR이 특이적으로 결합하는 표적 생물학적 분자(예: 폴리웨타이드, 단백질)를 지칭한다. 웨타이드 서열은 세포 표면 상에서, 세포 내에서 발현되는 항원으로부터 유래할 수 있거나, 완전한 막 단백질이다. 항원은 숙주 유래된 항원(예: 종양/암 항원, 및 자가면역 항원)일 수 있거나, 외인성 항원(예: 바이러스, 세균, 원충 항원)일 수 있다. 종양 또는 암 항원은 다양한 암, 예를 들면, 본원에 기재된 것들로부터 유래할 수 있다. 일부 실시형태에서, 암 항원은 백혈병 항원을 포함한다. 특정한 실시형태에서, 웨타이드 항원은 빌름 종양 1(WT1), 예를 들면, 아미노산 서열 RMFPNAPYL(서열번호 2)을 포함하는 WT1 웨타이드로부터 유래된다. 특정 실시형태에서, 웨타이드 항원은 메소텔린, 예를 들면, 문헌[참조: Hung et al., 2007, *Gene Therapy* 14:921-929]의 도 3a에 개시된 메소텔린 웨타이드로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 메소텔린 웨타이드는 아미노산 서열 GQKMNAQAI(서열번호 31)을 포함한다. 다른 실시형태에서, 메소텔린 웨타이드는 ISKANVDL(서열번호 42), GQKMNAQAI(서열번호 43), SAFQNVSGL(서열번호 44), 및 LLGPNIVDL(서열번호 45), EIPFTYEQQL(서열번호 46), 또는 GIPNGYLV(L(서열번호 47)을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 자가면역 항원은 자가-항원에 특이적인 자가반응성 TCR에 의해 인식되는 항원이고, 후속의 면역 효과기 기능은 자가면역 질환을 유발하고, 자가면역 질환을 악화시키고, 자가면역 질환의 진행에 기여하고, 자가면역 질환과 관련된 증상을 유발 또는 악화시킨다. 예를 들면, 콜라겐 웨타이드에 특이적인 자가반응성 TCR은 류마티스성 관절염에서 Treg의 억제 유전자 치료에 유용할 수 있다. 자가면역 항원은 또한 자가면역 질환을 유발하거나 자가면역 질환의 증상을 매개하는 기타 면역 세포(예를 들면, 자가항체를 생성하는 B 세포) 상에 위치하

는 항원일 수 있다. 예를 들면, CD20 웨타이드 항원은 류마티스성 관절염에 수반되거나 이와 관련된 B 세포를 표적화하는 증강된 친화성 TCR의 생성에 유용할 수 있다. 웨타이드 항원은 본원에 개시된 바와 같이 조혈전구세포 및 간질세포에 대한 배양 시스템에 첨가될 수 있다. 또는, 목적하는 웨타이드 항원을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 간질세포는 세포 배양물에서 이러한 항원을 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 이론에 국한시키고자 하는 것은 아니지만, 웨타이드 항원은, 외인성 웨타이드 항원으로서 배양 시스템에 첨가되거나 간질세포에 의해 발현되든지, 간질세포에 의해 발현된 MHC 분자와 복합체를 형성하여 MHC-웨타이드 항원 복합체를 형성한다. MHC-웨타이드 항원 복합체는 배양 시스템에서 TCR에 의한 MHC-제한된 웨타이드 항원 인식을 가능하게 한다. 특정한 실시형태에서, OP9 세포는 핵산 서열로 형질도입되어 WT1 항원 웨타이드 RMFPNAPYL(서열번호 2)을 발현한다. 다른 실시형태에서, OP9 세포는 핵산 서열로 형질도입되어 메소텔린 항원 웨타이드 GQKMNAQAI(서열번호 3 1)을 발현한다.

[0052]

MHC 부류 I 분자에 결합하는 웨타이드는 일반적으로 약 7 내지 약 10개 아미노산 길이이다. MHC 부류 II 분자에 결합하는 웨타이드는 통상 약 10 내지 25개 아미노산 길이로 길이가 가변적이다. 특정한 실시형태에서, 모체 TCR의 웨타이드 항원 특이성은 공지되어 있다. 특정 실시형태에서, 모체 TCR의 웨타이드 항원 특이성은 당해 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 측정할 필요가 있다[참조: Borras et al., 2002, J. Immunol. Methods 267:79-97; Hiemstra et al., 2000, Cur. Opin. Immunol. 12:80-4]. 예를 들면, 모체 TCR의 표적 항원이 공지되어 있는 경우, 특이적 웨타이드 서열이 아니라도, 표적 항원 폴리웨타이드 서열로부터 유래된 웨타이드 라이브러리는 모체 TCR에 대한 특이적 웨타이드 항원의 스크리닝 및 동정에 사용될 수 있다.

[0053]

"벡터"는 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자이다. 벡터는, 예를 들면, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 또는 과자일 수 있다. "발현 벡터"는, 적절한 환경에 존재하는 경우, 벡터에 의해 운반된 하나 또는 그 이상의 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 유도할 수 있는 벡터이다.

[0054]

"레트로바이러스"는 RNA 계놈을 갖는 바이러스이다. "감마레트로바이러스"는 레트로비리다에 부류의 속을 지칭한다. 예시적 감마레트로바이러스는, 이로써 제한되지 않지만, 마우스 줄기 세포 바이러스, 마우스 백혈병 바이러스, 고양이 백혈병 바이러스, 고양이 육종 바이러스 및 조류 세망내피증 바이러스를 포함한다.

[0055]

"렌티바이러스"는 분화 및 미분화 세포를 감염시킬 수 있는 레트로바이러스의 속을 지칭한다. 렌티바이러스의 몇몇 예는 HIV(인간 면역결핍 바이러스: HIV 유형 1 및 HIV 유형 2 포함); 말 감염성 빈혈 바이러스; 고양이 면역결핍 바이러스(FIV); 소 면역 결핍 바이러스(BIV) 및 유인원 면역결핍 바이러스(SIV)를 포함한다.

[0056]

코어 바이러스를 인코딩하는 벡터는 또한 "바이러스 벡터"로서 공지되어 있다. 문헌[참조: Pfeifer and Verma, Pfeifer, A. and I. M. Verma. 2001. Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 2:177-211]에 기재된 것들과 같이 인간 유전자 치료 분야를 위해 동정된 것들을 포함하여 본 발명에서 사용하기 적합한 다수의 이용가능한 바이러스 벡터가 있다. 몇몇 바이러스 벡터는 RNA 바이러스에 기반한 벡터, 예를 들면, 레트로바이러스-유래된 벡터, 예를 들면, 몰로니 마우스 백혈병 바이러스(MLV)-유래된 벡터를 포함하고, 보다 복잡한 레트로바이러스-유래된 벡터, 예를 들면, 렌티바이러스-유래된 벡터를 포함한다. HIV-1-유래된 벡터는 이러한 범주에 속한다. 기타 예는 HIV-2, FIV, 말 감염성 빈혈 바이러스, SIV 및 마에디/비스나 바이러스를 포함한다. 포유동물 표적 세포를 TCR 도입 유전자를 함유하는 바이러스 벡터로 형질도입하기 위해 바이러스 입자 레트로바이러스 및 렌티바이러스 바이러스 벡터 및 팩토징 세포를 사용하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[참조: U.S. Patent 8,119,772; Walchli et al., 2011, PLoS One 6:327930; Zhao et al., J. Immunol., 2005, 174:4415-4423; Engels et al., 2003, Hum. Gene Ther. 14:1155-68; Frecha et al., 2010, Mol. Ther. 18:1748-57; Verhoeven et al., 2009, Methods Mol. Biol. 506:97-114]에 이미 기재되어 있다. 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터 작제물 및 발현 시스템은 또한 상업적으로 입수 가능하다.

[0057]

특정한 실시형태에서, 바이러스 벡터는 웨타이드 항원에 특이적인 TCR α 쇄를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열을 조혈전구세포 내로 도입하기 위해 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 바이러스 벡터는 DL1 또는 DL4를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열 및 MHC 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 간질세포 내로 도입하기 위해 사용된다. 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터일 수 있다. 바이러스 벡터는 또한 형질도입을 위한 마커를 인코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 바이러스 벡터를 위한 형질도입 마커는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 약물 내성을 부여할 수 있는 선택 마커, 또는 검출 가능한 마커, 예를 들면, 형광 마커, 또는 유동 세포분석에 의해 검출할 수 있는 세포 표면 단백질을 포함한다. 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 녹색 형광 단백질 또는 인간 CD2의 세포외 도메인을 포함하는 형질도입을 위한 유전자 마커를 추가로 포함한다. 바이러스 벡터 계놈이 분리된 전사물로서 숙주 세포에서 발현되는 하나 또는 그 이상의 핵산 서열을 포함하는 경우, 바이

러스 벡터는 또한 바이스트론 또는 멀티스트론 발현을 가능하게 하는 2개(또는 그 이상) 전사물 사이에 추가의 서열을 또한 포함한다. 바이러스 벡터에 사용된 이러한 서열의 예는 내부 리보솜 도입 부위(IRES), 퓨린 절단 부위, 바이러스 2A 웹타이드를 포함한다.

[0058] 기타 벡터는 또한, 예를 들면, 아데노바이러스-기반 벡터 및 아데노-관련 바이러스(AAV)-벡터; 앰플리콘 벡터, 복제-결합 HSV 및 약독화된 HSV를 포함하는 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV)로부터 유래하는 벡터를 포함하는 DNA 바이러스 벡터를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 전달에 사용될 수 있다[참조: Krisky et al., 1998, Gene Ther. 5: 1517-30].

[0059] 유전자 치료를 위해 최근 개발된 기타 벡터를 또한 본 발명의 방법에 사용할 수 있다. 이러한 벡터는 바콜로바이러스 및 알파-바이러스로부터 유래하는 것들을 포함한다[참조: Jolly D J. 1999. Emerging virus vectors. pp 209-40 in Friedmann T. ed. 1999. The development of human gene therapy. New York: Cold Spring Harbor Lab].

[0060] 조혈전구세포는 DN TCR $\alpha \beta^+$ 흥선세포로 조혈전구세포의 분화를 유도하는데 충분한 조건하 및 시간 동안 비내인성 DL1 또는 DL4를 인코딩하는 핵산 서열 및 MHC 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 간질세포로 배양한다. 특정 실시형태에서, 조혈전구세포는 6cm 또는 10cm 조직 배양-처리된 접시에서 배양한다. 배양 중의 조혈전구세포의 농도는 $1\text{-}10^9$ 또는 1×10^2 내지 1×10^6 , 또는 1×10^3 내지 1×10^4 일 수 있다. 일부 실시형태에서, 조혈전구세포(약 $1\text{-}5 \times 10^4$ 세포)는 DL1을 발현하는 OP9 세포의 단층 상에서 배양된다.

[0061] 조혈전구세포의 정형 및 분화를 촉진하는 하나 또는 그 이상의 사이토킨을 또한 배양물에 첨가할 수 있다. 사이토킨은 인간 또는 기타 종으로부터 유래할 수 있다. 배양물 중의 사이토킨의 농도는 약 1ng/ml 내지 약 50ng/ml의 범위일 수 있다. 사용될 수 있는 사이토킨의 대표적 예는 FGF-4 및 FGF-2를 포함하는 FGF 부류의 모든 구성원; Flt-3-리간드, 줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO) 및 IL-7을 포함한다. 사이토킨은 헤파린 셀레이트 등의 글리코스아미노글리칸과 함께 사용될 수 있다. 사이토킨은 상업적으로 입수가능하거나, 재조합 DNA 기술에 의해 생산되어 다양한 정도로 정제할 수 있다. 몇몇 사이토킨은 표준 생화학적 기술에 의해 세포주의 배양 배지로부터 정제할 수 있다.

[0062] 조혈전구세포는 조절된 배지, 비조절된 배지 또는 배아줄기세포 배지를 포함하는 배양 배지에서 배양할 수 있다. 적합한 조절된 배지의 예는 배아 섬유아세포 세포(예: 인간 배아 섬유아세포 세포)로 조절된 IMDM, DMEM 또는 αMEM, 또는 등가의 배지를 포함한다. 적합한 비-조절된 배지의 예는 이스코브 변형된 둘베커 배지(IDMD), DMEM) 또는 αMEM 또는 등가의 배지를 포함한다. 배양 배지는 혈청(예: 소 혈청, 태소 혈청, 송아지 혈청, 말 혈청, 인간 혈청 또는 인공 혈청 대체물)을 포함할 수 있거나, 혈청을 함유하지 않을 수 있다.

[0063] 배양 조건은 DN TCR $\alpha \beta^+$ 흥선세포로 조혈전구세포의 분화를 유도하기에 충분한 시간 동안 조혈전구세포를 배양하는 것을 수반한다. 세포는 일반적으로 약 4 내지 5일 동안, 바람직하게는 약 5 내지 20일 동안 배양물에 유지된다. 세포는 목적하는 결과, 즉 목적하는 세포 조성을 달성하는데 요구되는 적절한 시간 동안 유지될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 주로 미성숙 및 불활성화된 T 세포를 포함하는 세포 조성을 생성하기 위해, 세포는 약 5 내지 20일 동안 배양물에 유지될 수 있다. 세포는 주로 성숙 T 세포를 포함하는 세포 조성을 생성하기 위해 20 내지 30일 동안 배양물에 유지될 수 있다. 비-부착 세포는 또한 다양한 시점, 예를 들면, 약 수일 내지 약 25일에 배양물로부터 수집될 수 있다. 간질세포주 상에서 조혈줄기세포의 배양 방법은 이미 기재되어 있다[참조: U.S. Patent #7,575,925; Schmitt et al., 2004, Nat. Immunol. 5:410-417; Schmitt et al., 2002, Immunity 17:749-756].

[0064] DN TCR $\alpha \beta^+$ 흥선세포로 조혈전구세포의 분화를 검출하고, 이들 세포는 표준 유동 세포분석 방법을 사용하여 단리할 수 있다. 하나 또는 그 이상의 세포 선별은 DN TCR $\alpha \beta^+$ 흥선세포를 단리하기 위해 사용할 수 있다. 예를 들면, 제1 세포 선별은 형질도입 마커(즉, TCR 발현을 위한 마커)를 발현하는 조혈전구세포를 동정할 수 있다. 특정 실시형태에서, 형질도입 마커는 인간 CD2의 세포외 도메인이다. 추가의 실시양태에서, 형질도입 마커 양성 세포는 제2 세포 선별에 제공하여 CD4⁻ 및 CD8⁻인 세포를 스크리닝할 수 있다. DN 세포에 대한 제3 세포 선별은 TCRβ를 발현하는 세포를 스크리닝할 수 있다. 이들 선별의 서브세트, 또는 단일 또는 다중 세포 선별은 DN TCR $\alpha \beta^+$ 흥선세포의 목적하는 아모집단을 동정하기 위해 세포 표면 또는 형질도입 마커의 상이한 조합을 사용하여 설계될 수 있음이 당해 기술분야의 숙련가에게 명백할 것이다. DN TCR $\alpha \beta^+$ 세포를 선별하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다[참조: U.S. 7,575,925 and Schmitt et al., 2002, Immunity:17:749-756].

[0065]

DN TCR α β + 흥선세포로부터 다양한 TCR 쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 단리하고, 모체 TCR로부터의 TCR α 쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 T 세포 내로 도입한다. 본원에 언급된 바와 같이, 세포로부터의 TCR β 쇄를 클로닝하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 이미 기재되어 있다. 특정 실시형태에서, 후보 TCR β 쇄를 인코딩하는 핵산 서열이 DN TCR α β + 흥선세포로부터 단리되면, 핵산 서열은 추가의 선택 공정에 제공하여, 모체 TCR β 쇄에 의해 사용된 동일한 V β 유전자를 갖는 TCR β 쇄를 T 세포로의 도입을 위해 선택한다. TCR β 쇄를 함유하는 모체 V β 유전자는 PCR용의 V β 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 선별된 세포 모집단 내에서 동정될 수 있다. 시험관내에서 항원-특이적 TCR의 친화성을 증강시키는 것과 관련된 한 가지 관심은 일부 변형이 펩타이드/MHC가 아닌 MHC 단독에 대해 수용체의 친화성을 증가시켜, TCR이 자가반응성일 수 가능성을 증가시킬 수 있다는 것이다. 후보 TCR β 쇄를 모체 V β 유전자를 함유하는 것들로 제한하는 것은 MHC와 접촉하는 TCR CDR1 및 CDR2 도메인을 보유하고 CDR3에 대한 다양성을 제한할 가능성을 증가시킨다. 이미 논의한 바와 같이, 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터 등의 바이러스 벡터는 세포 내로 다양한 TCR β 쇄 및/또는 모체 TCR α 를 인코딩하는 핵산 서열을 도입하는데 적합하다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 형질도입을 위한 유전자 마커(예를 들면, 녹색 형광 단백질)를 추가로 포함한다.

[0066]

세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포는 DN TCR α β + 흥선세포로부터 다양한 TCR β 쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 사용한 형질전환 또는 형질도입에 사용된다. 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포는 CD3 분자를 발현한다. "CD3"은 세포 표면 상에서 TCR과 안정하게 결합하는 6개 쇄의 다중단백질 복합체이다. 포유동물에서, 상기 복합체는 CD3 γ 쇄, CD3 δ 쇄, 2개의 CD3 ϵ , 및 CD3 ζ 쇄의 호모이량체를 포함한다. CD3 γ , CD3 δ 및 CD3 ϵ 은 단일 면역글로불린 도메인을 함유하는 면역글로불린 상과의 고도 관련된 세포 표면 단백질이다. CD3 γ , CD3 δ 및 CD3 ϵ 의 막관통 영역은 음으로 하전되고, 이는 이들 쇄를 양으로 하전된 TCR 쇄와 결합하게 하는 특성이다. CD3 γ , CD3 δ 및 CD3 ϵ 쇄의 세포질 도메인은, 이들을 세포질 단백질 티로신 키나제와 결합시킨 다음 수용체를 자극시켜 세포 내부로 신호전달하는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티브(ITAM)을 함유한다. CD3 단백질은 TCR의 세포 표면 발현에 요구된다[참조: Janeway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:39, 1997].

[0067]

일부 실시형태에서, 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포는 인간, 마우스, 랫트 또는 기타 포유동물로부터 유래하는 일차 세포 또는 세포주를 포함하는 T 세포이다. 포유동물로부터 수득되는 경우, T 세포는 혈액, 골수, 림프절, 흥선 또는 기타 조직 또는 유체를 포함하는 다수의 공급원으로부터 수득될 수 있다. T 세포는 풍부화 또는 정제될 수 있다. T 세포주는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 이들 중 일부는 문헌[참조: Sandberg et al., 2000, Leukemia 21:230-237]에 기재되어 있다. 특정 실시형태에서, TCR α 및 β 쇄의 내인성 발현을 결여하는 T 세포가 사용된다. 이러한 T 세포는 TCR α 및 β 쇄의 내인성 발현을 자연적으로 결여하거나, 발현을 차단하기 위해 변형될 수 있다(예를 들면, TCR α 및 β 쇄를 발현하지 않는 유전자도입 마우스로부터의 T 세포, 또는 TCR α 및 β 쇄의 발현을 억제하기 위해 조작된 세포주). 특정한 실시형태에서, 58 $\alpha^- \beta^-$ 세포, 내인성 TCR α 및 TCR β 쇄를 결여하는 마우스 T 세포주가 사용된다[참조: Letourneur and Malissen, 1989, Eur. J. Immunol. 19:2269-74]. 기타 실시형태에서, H9 T 세포주가 사용된다(Catalog # HTB-176, ATCC, Manassas, VA). 특정 실시형태에서, 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포는 T 세포 또는 T 세포주의 세포가 아니지만, CD3을 발현하도록 조작되어 TCR(예: 293 세포 또는 3T3 세포)의 세포 표면 발현이 가능한 세포이다. T 세포 계통이 아닌 세포 상에서 TCR의 세포 표면 발현은 이미 기재되어 있다[참조: Szymczak et al., 2004, Nat. Biotechnol. 22:589-594].

[0068]

잠재적 증강된 친화성 TCR을 동정하기 위해, 모체 TCR α 쇄를 또한 발현할 수 있는 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포가 후보 TCR β 쇄의 라이브러리로 형질전환 또는 형질도입되면, 항원-특이적 세포는 MHC-펩타이드 사량체 염색을 사용하여 선별 또는 동정된다. MHC-펩타이드 사량체 염색은 MHC 분자의 사량체를 특징으로 하고, 각각은 적어도 하나의 항원과 동족(예를 들어, 동일하거나 관련된)인 아미노산 서열을 갖는 동일한 펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 복합체는 동족 항원에 특이적인 T 세포에 결합할 수 있다. 각각의 MHC 분자는 비오틴 분자로 태그 부착할 수 있다. 비오티닐화 MHC-펩타이드는, 통상 형광 표지되는 스트렙토아비딘의 침가에 의해 사량체화된다. 사량체는 형광 표지를 통한 유동 세포분석에 의해 검출할 수 있다. 항원 특이적 T 세포를 검출하는 MHC-펩타이드 사량체 염색 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: Altman et al., 1996, Science 274:94-96; Kalergis et al., 2000, J. Immunol. Methods 234:61-70; Xu and Screamton, 2002, J. Immunol. Methods 268:21-8; James et al., J. Vis. Exp. 25:1167]. 특정 실시형태에서, MHC-펩타이드 사량체는 MHC 부류 I 분자를 포함한다. 기타 실시형태에서, MHC-펩타이드 사량체는 MHC 부류 II 분자를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 기재된 방법의 배양 단계를 사용한 동일한 펩타이드 항원은 MHC-펩타이드 사량체 내로 도입된 펩타이드와

동일하다. 다른 실시형태에서, 개시된 방법의 배양 단계에서 간질세포에 의해 발현된 MHC 분자는 MHC-펩타이드 사량체 중의 MHC 분자와 동일하다. MHC-펩타이드 사량체 염색된 세포는 유동 세포분석에 의해 1회 또는 그 이상 선별할 수 있다. 1차 선별은 검출가능한 형질도입 마커(예: 녹색 형광 단백질)을 발현하는 형질도입된 세포를 선택할 수 있다. 형질도입 양성 세포는 또한 모체 TCR과 동일한 V β 쇄를 발현하는 세포를 1회 또는 그 이상 선별할 수 있다. 이들 선별의 서브세트, 또는 단일 또는 다중 세포 선별은 세포의 목적하는 아모집단을 동정하기 위해 세포 표면 또는 형질도입 마커의 상이한 조합을 사용하여 설계될 수 있음이 당해 기술분야의 숙련가에게 명백할 것이다.

[0069] 증강된 친화성 TCR은 후보 TCR $\alpha\beta$ 의 결합 친화성을 모체 TCR $\alpha\beta$ 와 비교함으로써 동정된다. 이어서, 항원-특이적 T 세포를 클로닝하고, 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 서열분석할 수 있다. 이어서, 후보 TCR β 클론을 사용하여, 모체 TCR α 쇄를 포함하는 T 세포를 형질도입할 수 있고, MHC-펩타이드 사량체 염색을 사용하여 이미 기재된 바와 같이 염색 수준을 모체 TCR $\alpha\beta$ 와 비교할 수 있다. 후보 TCR β 로 관찰된 증가된 염색은 모체 TCR $\alpha\beta$ 와 비교하여 증강된 친화성을 나타낼 수 있다. 그러나, 모체 TCR $\alpha\beta$ 가 T 세포에서 증가된 발현을 위해 코돈-최적화된 경우, 후보 TCR β 와 사량체 염색 수준의 직접 비교는 불가능할 수 있다. 또한, 후보 TCR β 쇄는 모체 TCR β 와의 직접 비교를 위해 코돈 최적화될 수 있다.

[0070] 후보 TCR $\alpha\beta$ 는, 모체 TCR $\alpha\beta$ 보다 펩타이드 항원에 대해 보다 강력한 결합을 갖는 경우, 모체 TCR $\alpha\beta$ 와 비교하여 증강된 친화성을 갖는다. 증강된 친화성은, 모체 TCR의 것보다 높은 표적 항원의 경우에 K_a (평형 결합 상수)을 갖는 TCR에 의해, 모체 TCR의 것보다 작은 표적 항원의 경우에 K_0 (해리 상수)를 갖는 TCR에 의해, 및 야생형(또는 친) TCR의 것보다 작은 표적 항원의 경우에 오프-속도(K_{off})로 나타낼 수 있다. TCR 결합 친화성을 측정하는 방법은 이미 기재되어 있다[참조: Laugel et al., 2007, J. Biol. Chem. 282:23799-23810; Garcia et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:6818-6823].

[0071]

증강된 친화성 TCR 및 조성물

[0073] 또 다른 양상에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 증강된 친화성 TCR이 제공된다. 증강된 친화성 TCR은 세포-결합될 수 있거나(예를 들면, 성숙 T 세포의 표면 상에서 발현), 가용성 형태일 수 있다. 특정한 실시형태에서, 증강된 친화성 TCR은 코돈 최적화되어 T 세포에서 발현을 증강시킬 수 있다[참조: Scholten et al., 2006, Clin. Immunol. 119:135-145].

[0074] 다른 실시형태에서, 증강된 친화성 TCR은 융합 단백질의 성분일 수 있고, 이는 세포독성 성분(예를 들면, 빈데신, 엽산길항체 등의 화학치료 약물; 세균 독소, 리신, 항-바이러스제)를 추가로 포함할 수 있고, 암 세포 또는 감염된 세포의 특정한 사멸 또는 파괴 또는 검출가능한 성분(예: 비오틴, 형광 잔기, 방사선핵종)에 유용하고, 암 세포, 감염된 세포 또는 자가면역 공격하의 조직의 영상화에 유용하다.

[0075] 본 발명은 또한 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 증강된 친화성 TCR 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 적합한 부형제는 물, 염수, 벡스트로즈, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합을 포함한다.

적용

[0078] 본 발명의 방법에 의해 생성된 증강된 친화성 TCR은 증강된 친화성 TCR을 포함하는 조성물을 투여함으로써 대상체에서 질환(예를 들면, 암, 감염성 질환 또는 자가면역 질환)을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0079] 증강된 친화성 TCR 요법으로 치료될 수 있는 질환은 암, 감염성 질환(바이러스, 세균, 원생동물 감염) 및 자가면역 질환을 포함한다. TCR 유전자 치료는 다양한 유형의 암[참조: Morgan et al., 2006, Science 314:126-129; reviewed in Schmitt et al., 2009, Human Gene Therapy; reviewed in June, 2007, J. Clin. Invest. 117:1466-1476] 및 감염성 질환[참조: Kitchen et al., 2009, PLoS One 4:38208; Rossi et al., 2007, Nat. Biotechnol. 25:1444-54; Zhang et al., PLoS Pathog. 6:e1001018; Luo et al., 2011, J. Mol. Med. 89:903-913]을 위한 유망한 치료법이다. 자가반응성 TCR을 포함하는 조절성 T 세포를 사용하는 자가면역 질환의 면역억제 유전자 치료는 또한 최근 생겨난 치료법이다[참조: Fujio et al., 2006, J. Immunol. 177:8140-8147; Brusko et al., 2008, Immunol. Rev. 223:371-390].

[0080] 고형 종양 및 백혈병을 포함하는 광범위한 암은 본원에 개시된 조성물 및 방법으로 처리할 수 있다. 치료될 수

있는 암의 유형은 유방, 전립선 및 결장의 선암; 폐의 기관지원성 암의 모든 형태; 골수종; 흑색종; 간장암; 신경아세포종; 유두종; 아푸도마; 분리종; 새열종; 악성 카르시노이드 증후군; 카르시노이드 심장 질환; 및 암종(예를 들면, 위커, 기저 세포, 기저편평성, 브라운-피어스, 도관, 예를리히 종양, 크렙 2, 메르켈 세포, 점액소, 비-소세포 폐, 구리 세포, 유두, 경섬유질, 세기관지, 기관지원성, 편평 세포 및 이행 세포)을 포함한다. 치료될 수 있는 추가 유형의 암은 조직구 장애; 백혈병; 악성 조직구증가; 호지킨 질환; 면역증식성 소장; 비-호지킨 림프종; 형질세포종, 세망내피종; 흑색종; 연골아세포종; 연골종; 연골육종; 섬유종; 섬유육종; 거대 세포 종양; 조직구종; 지방종, 지방육종; 중피종; 점액종; 점액육종; 골종; 골육종; 척색종, 두개인두종; 미분화세포종; 과오종; 간엽종; 중신종; 근육종; 에나멜상피종; 시멘트질종; 치아종; 기형종; 흉선종; 융모 상피종을 포함한다. 추가로, 하기 유형의 암이 또한 치료로 처리할 수 있는 것으로 고려된다: 선종; 담관암; 진주종; 원주종; 낭종암; 낭선종; 과립막 세포 종양; 음양모세포종; 간암; 한선종; 섬 세포 종양; 라이디히(Leydig) 세포 종양; 유두종; 세르틀리 세포 종양; 난모막 세포 종양; 자궁근종; 자궁육종; 근아세포종; 근종; 근육종; 횡문근종; 횡문육종; 상의세포종; 신경절세포종; 신경교종; 수모세포종; 뇌수막종; 신경집종; 신경아세포종; 신경 상피종; 신경섬유종; 신경종; 부신경절종; 부신경절종 비-크로마핀. 치료될 수 있는 암의 유형은 또한 피각혈관종; 호산구 증가증을 갖는 혈관림프양 증식; 혈관 경화증; 혈관종; 사구맥관종; 혈관내피종; 혈관종; 혈관주위 세포종; 혈관육종; 림프관종; 림프관육종; 송과체종; 암육종; 연골육종; 엽상 낭육종; 섬유육종; 혈관육종; 평활근육종; 백혈육종; 지방육종; 림프관육종; 근육종; 점액육종; 난소 암종; 횡문근육종; 육종; 신생물; 신경섬유종증 및 자궁경부 이형상피증을 포함한다.

[0081]

증강된 TCR 치료로 처리될 수 있는 다양한 과증식성 질환의 예는 B 세포 림프종을 포함하는 B-세포 암(예를 들면, 다양한 형태의 호지킨 질환, 비-호지킨 림프종(NHL) 또는 중추신경계 림프종), 백혈병(예를 들면, 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 모발 세포 백혈병 및 만성 근아세포 백혈병) 및 골수종(예를 들면, 다발성 골수종)이다. 추가의 B 세포 암은 작은 림프구성 림프종, B 세포 프로리프구성 백혈병, 림포형 질세포 림프종, 비장 대역 림프종, 형질 세포성 골수종, 골의 고립성 형질세포종, 골외 형질세포종, 점막-관련(MALT) 림프 조직의 외절성 대역 B-세포 림프종, 결절성 대역 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 외피 세포 림프종, 분산 거대 B-세포 림프종, 종격(흉선) 거대 B-세포 림프종, 혈관내 거대 B-세포 림프종, 원발성 삼출액 림프종, 버킷 림프종/백혈병, 불확실 악성 가능성의 B-세포 증식, 림파선 육아종증 및 이식후 림프증식성 질환을 포함한다.

[0082]

자가면역 질환은 관절염, 류마티스성 관절염, 유년형 류마티스성 관절염, 골관절염, 다발연골염, 건선성 관절염, 건선, 피부염, 다발성근염/피부근염, 봉입체 근염, 염증성 근육염, 독성 표피 피사증, 전신성 경피증 및 경화증, CREST 증후군, 염증성 장 질환과 관련된 반응, 크론병, 궤양성 대장염, 호흡 곤란 증후군, 성인 호흡 곤란 증후군(ARDS), 수막염, 뇌염, 포도막염, 대장염, 사구체신염, 알레르기 증상, 습진, 천식, T 세포 및 만성 염증 반응의 침윤을 수반하는 증상, 아테롬성 동맥경화증, 자가면역 심근염, 백혈구 부착 결핍증, 전신성 홍반성 낭창(SLE), 아급성 피부 홍반성 낭창, 원반상 루푸스, 낭창성 척추염, 루푸스 뇌염, 청소년 발병 당뇨병, 다발성 경화증, 알레르기성 뇌척수염, 시신경 척수염, 류마티스 열, 시드남 무도병, 사이토kin 및 T-림프구에 의해 매개된 급성 및 지연된 과민증과 관련된 면역 반응, 결핵, 유육종증, 베게너 육아종증 및 케르그-스트라우스 질환을 포함하는 유육종증, 무과립구증, 혈관염(과민성 혈관염/혈관염, ANCA 및 류마티스성 혈관염을 포함), 재생불량성 빈혈, 다이아몬드 블랙팬 빈혈, 자가면역 용혈성 빈혈(AIHA)을 포함하는 면역 용혈성 빈혈, 악성 빈혈, 적아구 무형성(PRCA), 인자 VIII 결핍증, 혈우병 A, 자가면역 호중구감소증, 범혈구감소증, 백혈구감소, 백혈구 누출을 수반하는 질환, 중추신경계(CNS) 염증성 질환, 다장기 순상 증후군, 중증 근무력증, 항원-항체 복합체 매개된 질환, 항-사구체 기저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 알레르기성 신경염, 베체트병, 캐슬 증후군, 굿페스처 증후군, 랩버트-이튼 근무력 증후군, 르노(Reynaud) 증후군, 소그렌 증후군, 스티븐-존슨 증후군, 고형 기관 이식 거부, 이식편 대 숙주병(GVHD), 수포성류천포창, 천포창, 자가면역 다발성 내분비병 증, 혈청반응 음성 척추 관절증, 라이터병, 스티프-맨 증후군, 거대 세포 동맥염, 면역 복합체 신염, IgA 신장 병, IgM 다발성신경병 또는 IgM 매개된 신경병, 특발성 혈소판감소성 자반병(ITP), 혈전성 혈소판감소성 자반병(TTP), 헤노호-쇤라인 자반병, 자가면역 혈소판감소증, 자가면역 고환염 및 난소염을 포함하는 고환 및 난소의 자가면역 질환, 원발성 갑상선 기능저하증; 자가면역 갑상선염, 만성 갑상선염(하시모토 갑상선염), 아급성 갑상선염, 특발성 갑상선 기능저하증, 애디슨 질환, 그레이브 질환, 자가면역 다선성 증후군(또는 다선성 내분비 증후군), 인슐린 의존성 진성 당뇨병(IDDM)으로 또한 지칭되는 유형 I 당뇨병 및 쉬한 증후군을 포함하는 자가면역 내분비 질환; 자가면역 간염, 림프 간질성 폐렴(HIV), 기관지 폐색증(비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레 증후군, 거대 혈관 혈관염(류마티스성 다발성근육통 및 거대 세포(디카야수) 관절염 포함), 중간 혈관염(가와사키 질환 및 결절성 동맥염 포함), 결절성 다발성 동맥염(PAN) 강직성 척추염, 벼제 질환(IgA 신장병), 급속 진

행성 사구체 신염, 원발성 담즙성 간경변, 복강 스프루(글루텐 장병증), 한랭글로불린혈증, 간염과 관련된 한랭글로불린혈증, 근위축성 측색 경화증(ALS), 관상 동맥 질환, 가족성 지중해 열, 현미경 다발혈관염, 코간 증후군, 위스코트-알드리흐 증후군 및 폐색성혈전 혈관염을 포함한다.

[0083] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 증강된 친화성 TCR로 대상체를 치료하는 방법은 급성 골수성 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 만성 골수성 백혈병을 갖는 대상체를 포함한다.

[0084] 감염성 질환은 감염성 인자와 관련된 것들을 포함하고, 임의의 다양한 세균(예를 들면, 병원성 이. 콜라이(*E. coli*), 에스 티피무리움(*S. typhimurium*), 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*), 비. 안트라시스(*B. anthracis*), 씨. 보툴리눔(*C. botulinum*), 씨. 디피실(*C. difficile*), 씨. 퍼프링겐스(*C. perfringens*), 에이치. 필로리(*H. pylori*), 브이. 콜레라에(*V. cholerae*), 리스테리아 종(*Listeria spp.*), 리켓트시아 종(*Rickettsia spp.*), 클라미디아 종(*Chlamydia spp.*) 등), 마이코박테리아 및 기생충(원생동물의 임의의 공지된 기생 구성원을 포함함)을 포함한다. 감염성 바이러스는 진행생물 바이러스(예를 들면, 아데노바이러스, 분야바이러스, 헤르페스바이러스, 파포바바이러스, 파라믹소바이러스, 피코르나바이러스, 라브도바이러스(예: 광견병), 오르토믹소바이러스(예: 인플루엔자), 폭스바이러스(예: 백시니아), 레오바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스(예: HIV), 플라비바이러스(예: HCV) 등)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원이 MHC 부류 I 분자로 처리되어 표시되는 시토졸 병원체에 의한 감염은 본 발명의 증강된 친화성 TCR로 치료된다.

[0085] 증강된 친화성 TCR은 세포 결합된 형태로 대상체에 투여될 수 있다(즉, 표적 세포 모집단(성숙 T 세포(예: CD8⁺ T 세포) 또는 T 세포 계통의 기타 세포)). 특정 실시형태에서, 대상체에게 투여된 증강된 친화성 TCR을 포함하는 T 세포 계통의 세포는 자가 세포이다. 또 다른 실시형태에서, 증강된 친화성 TCR은 가용성 형태로 대상체에게 투여될 수 있다. 가용성 TCR은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: Molloy et al., 2005, Curr. Opin. Pharmacol. 5:438-443; U.S. Patent #6,759,243].

[0086] "치료하다" 및 "치료"는 대상체의 질환, 장애 또는 증상의 의학적 관리를 지칭한다(즉, 인간 또는 비인간 포유동물(예: 영장류, 마우스, 랫트)일 수 있는 개체). 일반적으로, 적절한 용량 및 치료 섭생은 본원에 기재된 증강된 친화성 TCR 및 임의로 보조제를 치료학적 또는 예방학적 이점을 제공하기에 충분한 양으로 제공한다. 치료학적 및 예방학적 이점은 개선된 임상적 결과; 질환과 관련된 증상의 경감 또는 완화; 증상의 재발 감소; 개선된 삶의 질; 보다 긴 무병 상태; 질환 정도의 축소, 질환 증상의 안정화; 질환 진행의 지연; 진정; 생존; 또는 생존 연장을 포함한다.

[0087] 증강된 친화성 수용체를 포함하는 약제학적 조성물은 당해 기술분야의 숙련가에 의해 측정된 바와 같이 치료(또는 예방)되는 질환 또는 증상에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 조성물의 적절한 용량, 적합한 기간 및 투여빈도는 환자의 증상, 질환의 크기, 유형 및 중증도, 특정 형태의 활성 성분 및 투여 방법과 같은 인자에 의해 결정될 것이다.

[0088] 추가의 실시형태에서, 본 발명의 증강된 친화성 TCR은 본원에서 동정된 정후 또는 증상과 관련하여 사용된 이들 방법을 포함하여 진단 방법 또는 영상화 방법에 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0089] 본 출원은 엘타-유사-1 또는 엘타-유사-4를 발현하는 간질세포로 배양한 항원 특이적 TCR α를 발현하는 조혈전구세포의 효능제 선택에 의해 증강된 친화성 T 세포 수용체를 생성하는 방법, 이러한 방법으로 제조한 조성물 및 이의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0090] 도 1a 내지 1d: OT-1 유전자도입 마우스로부터의 흥선세포는 TCR β⁻TCR γ⁻δ⁻CD4⁻CD8⁻CD117⁺CD44⁺ DN1 및 DN2 전구세포에 대해 선별하고, 지시된 바와 같이 난알부민 SIINFEKL 웹타이드(서열번호 1)의 다양한 농도의 존재하에 20일 동안 MHC 부류 I H-2Kb 분자를 발현하는 OP9-DL1 세포 상에서 배양했다. (A, B, C) 배양물은 지시된 시점에서 유동 세포분석에 의해 분석했다. (D) 각 배양물의 전체 세포성은 배양 20일에 측정했다.

도 2: B6 또는 OT-1 유전자도입 마우스로부터 선별된 양성 선택을 통해 수행되지 않은 CD69⁻ DP 흥선세포는 난알부민 SIINFEKL 웹타이드(서열번호 1)의 존재하에 MHC 부류 I H-2Kb 분자를 발현하는 OP9-DL1 세포 상에서 배양했다.

도 3a 내지 3c: B6 흥선세포를 $CD4^- CD8^- CD117^+ CD44^+$ DN1 및 DN2 전구 세포에 대해 선별하고, 친화성 증강된 WT1 특이적 TCR 3D 클론의 TCR α 쇄를 형질도입하고, $1\mu M$ 의 WT1 웨타이드 RMFPNAPYL(서열번호 2)의 존재 또는 부재 하에 MHC 부류 I H-2Db 분자를 발현하는 OP9-DL1 세포 상에서 배양했다. (A) 배양 16일에, 형질도입된(hCD2 $^+$) 및 비형질도입된(hCD2 $^-$) 세포를 유동 세포분석에 의해 분석했다. (B) 1mM WT1 웨타이드 RMFPNAPYL(서열번호 2)의 존재하에 OP9-DL1 배양 21일에, DN TCR $\alpha\beta^+$ 세포를 지시된 계획에 따라 선별했다. (C) 선별된 세포를 용해시키고, DNA를 단리하고, Vb10-특이적 전방 프라이머 및 Cb2-특이적 역방 프라이머를 사용하여 PCR을 수행했다. 이어서, Vb10 PCR 생성물을 벡터 pENTR/D-TOPO로 지향 TOPO-클로닝시키고, 게이트웨이(Gateway^R) 기술을 사용하여 레트로바이러스 벡터 MigR1-attR로 이동시키고, 레트로바이러스 상청액을 생성하고, 기재된 바와 같이 라이브러리 스크리닝을 위한 마우스 58 $^{/-}$ 세포의 형질도입에 사용했다.

도 4a 내지 4c: 레트로바이러스 TCR β 라이브러리는 CD8 $^+ 3D\alpha^+ 58^{/-}$ 세포를 형질도입시키기 위해 사용했다. (A) 형질도입된 세포는 먼저 GFP 발현 단독(데이타는 제시되지 않음)에 대해 선별하고, 이어서 지시된 바와 같이 GFP 및 고도 MHC-WT1 웨타이드 사량체 발현의 두가지에 대해 선별했다. 또한 선별된 58 $^{/-}$ 세포를, 비특이적인 사량체 결합에 대한 대조군으로서, GP33에 비특이적이나 MHC H-2D6-웨타이드 사량체 특이적인 것으로의 염색에 대해 분석하였다. (B) 단리된 TCR β 쇄의 서열 분석. (C) 4개 후보 TCR β 쇄를 서열 분석에 의해 동정하고, MigR1-attR 레트로바이러스 벡터로 다시 이동시켰다. 레트로바이러스 상청액을 생성하고, CD8 $^+ 3D\alpha^+ 58^{/-}$ 세포의 형질도입에 사용했다.

도 5a 내지 5c: (A) 3개의 최고 친화성 TCR의 상대적 친화성은 각각의 형질도입된 세포주를 MHC-웨타이드 사량체로 염색시킨 다음 유동 세포분석에 의해 측정했다. K_D 측정은 PE-접합된 사량체의 6개의 2배 희석물을 사용하여 수행하고, 외관 K_D 값은 절반-최대 결합을 생성하는 리간드의 농도로서 비선형 회귀에 의한 결합곡선으로부터 측정했다. (B) 최고 친화성 TCR β 쇄(클론 #1)는 코돈-최적화시키고, 사량체 결합은 본래 증강된 친화성 3D $\alpha\beta$ 작제물과 비교했다. (C) 3D α 와 쌍을 이룬 후보 TCR β 쇄의 각각으로 형질도입된 58 $^{/-}$ 세포를 MHC-WT1 웨타이드 특이적 사량체 및 비-특이적 MHC H-2Db-웨타이드 사량체로 염색하여 MHC에 대한 잠재적 웨타이드-독립적 반응성을 평가했다.

도 6a 내지 6b: 3D-PYY α -IRES-hCD2 및 7431 α -IRES-hCD2 레트로게닉 마우스로부터의 TCR β^+ 흥선세포(A) 및 비장세포(B)의 CD4 및 CD8 발현의 분석. 3D-PYY α -IRES-hCD2 및 7431 α -IRES-hCD2 레트로게닉 마우스로부터의 TCR β^+ 흥선세포(A)의 V β 10 및 V β 9 발현.

도 7: 시험관내에서 메소텔린 웨타이드 자극 +IL2의 WT1의 6일 후 레트로게닉 마우스로부터 비장세포의 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0091] 실시예

다음 실시예는 본 명세서에 의해 제공된 바와 같이, 예를 들면, TCR 유전자도입 흥선세포가 OP9-DL1 배양물 중의 이들의 동족 항원에 노출시 효율적으로 "γδ 형" $CD4^- CD8^- CD24^- TCR\beta^+$ 계통으로 분화한다는 것을 입증한다. 더욱이, 종양 항원 WT1에 특이적인 T 세포 클론으로부터의 TCR α 쇄만을 발현시키는 전구 흥선세포가 또한 OP9-DL1 배양물에서 성숙한 TCR $\alpha\beta^+$ 계통으로 분화할 수 있다. TCR β 쇄의 라이브러리는 이러한 배양물로부터 선별된 DN TCR $\alpha\beta^+$ 세포의 모집단으로부터 생성되었고, 항원-특이적 TCR α 쇄와 쌍을 이를 경우 WT1 MHC 사량체 반응성에 대해 스크리닝했다. 이러한 접근법을 사용하여, 본래의 TCR에 비해 WT1 웨타이드에 대해 최대 10배 높은 친화성을 갖는 TCR을 생성하기 위해 항원-특이적 TCR α 쇄와 쌍을 이를 수 있는 다수의 TCR β 쇄를 동정하였다.

실시예 1: OP9-DL1 세포 상의 분화 동안 웨타이드 효능제의 결속은 TCR 유전자도입 마우스로부터 정제된 T 세포 전구세포로부터 성숙한 TCR $\alpha\beta^+$ DN 세포의 분화를 유도할 수 있다.

β-선택 전에 $\alpha\beta$ TCR을 통하는 효능제 신호는 생체내에서 T 세포 발달 동안 "γδ 형" 이중 음성(DN) TCR $\alpha\beta^+$ 세포의 분화를 유도하고, DN3 단계에서 TCR 가교결합은 OP9-DL1 세포 상에서 시험관내 T 세포 분화 동안 유사한 계통의 분화를 유도한다. TCR 유전자도입 마우스로부터의 전구 T 세포가 또한 DN3 단계에서 동족 웨타이드 항원

에 반응하여 DN TCR $\alpha \beta^+$ 계통으로 분화할 수 있었는지를 측정하기 위해, TCR $\alpha \beta^- CD4^- CD8^- CD117^+ CD44^+$ DN1 및 DN2 전구 흥선세포를 유전자도입 OT-1 마우스[MHC 부류 I H-2K^b]에 제공된 난알부민 웨타이드 서열 SIINFEKL (서열번호 1)에 특이적인 TCR을 발현시킨다; Stock #003831, 잭슨 라보라토리, ME; 참조: Hogquist et al., 1994, Cell 76:17-27]로부터 선별하고, 웨타이드의 부재하에 또는 난알부민-특이적 웨타이드(서열번호 1)의 증가하는 농도로 마우스 MHC 부류 1 문자 H-2K^b를 발현시키기 위해 형질도입된 OP9-DL1 세포[참조: Schmitt et al., 2002, Immunity 17:749-756; 미국 특허 제7,575,925호]로 20일 동안 배양하고, 각종 시점에서 유동 세포분석으로 분석했다. 웨타이드의 부재하에, 이중 양성(DP) T 세포는 16일째까지 검출할 수 있었고, 20일째까지 배양물의 주요 분획을 구성했다(도 1a). 그러나, DP T 세포의 발달 또는 생존은 비상하게 낮은 농도의 웨타이드 ($0.0001 \mu M$)까지 감소되었고, DP는 $0.01 \mu M$ 이상의 웨타이드(도 1a)를 함유하는 배양물에 완전히 존재하지 않아서 DP 세포가 OP9-DL1 배양물에서 강력한 효능제 신호에 의해 음성 선택된다는 것을 증명한다.

[0096] 점점 강한 효능제 신호가 TCR $\alpha \beta^+$ DN 세포의 발달을 유도하는지를 측정하기 위해, DN 모집단을 CD24, 모든 미성숙 전구 T 세포 모집단 상에서 고수준으로 발현되는 성숙 마커, 및 TCR β 의 발현에 대해 분석했다. 세포의 대부분은 고수준의 CD24를 발현시키고, 5일째(도 1b)에 TCR β 발현이 결핍되지만, 16일째까지 모든 배양 조건으로부터 DN 세포의 대부분은 TCR β 를 발현시키지만, 실질적으로 많은 수의 CD24⁻ 세포가 $0.01 \mu M$ 이상의 웨타이드가 함유된 배양물로부터 관찰되었다(웨타이드 부재 배양물 중의 6.9% TCR⁺CD24⁻에 비해, 각각 0.01 및 $1.0 \mu M$ 의 웨타이드를 함유하는 배양물 중의 38.2% 및 31.4% TCR⁺CD24⁻ 세포)(도 1b). 20일째까지, 모든 DN 세포 중의 약 60%는 $0.01 \mu M$ 또는 $1.0 \mu M$ 웨타이드를 함유하는 배양물로부터의 TCR $\beta^- CD24^+$ 인 반면, 어떤 웨타이드로 수용하지 않거나 저농도($0.0001 \mu M$)의 웨타이드를 수용한 배양물에서, 단지 약 20%의 DN이 TCR $\beta^- CD24^-$ 였고, 50%에 근접하게 TCR β^- 였다(도 1b, 1c). 더욱이, TCR 표면 발현 수준이 상이한 배양 조건 사이에서 비교될 때, 고수준의 웨타이드에 반응하여 발달된 TCR β^+ 세포는 세포 표면에서 보다 높은 수준의 TCR β 를 발현시켰다(도 1c). 이론에 구속시키고자 하지 않고, 첨가된 웨타이드 없이 배양물 중의 일부 TCR $\alpha \beta^+$ DN 세포의 발달은 OP9-DL1 배양 시스템에서 기타 웨타이드-MHC 리간드와의 교차-반응성에 기인한다는 것이 가능하다. 이러한 배양물에서 관찰된 TCR $\alpha \beta^+$ DN 세포가 DP 단계를 통해 발달되지 않았음을 확인하기 위해, 아직 양성 선택되지 않은 CD69⁻ DP 세포를 B6 또는 OT-1 흥선으로부터 선별하고, 난알부민 SIINFEKL 웨타이드(서열번호 1)의 존재하에 또는 부재하에 배양하였다. B6 DP 세포는 SIINFEKL 웨타이드(서열번호 1)의 존재에 의해 영향을 받지 않았지만, OT-1 DP 흥선 세포가 SIINFEKL(서열번호 1)의 존재하에 OP9-DL1 세포 상에서 배양되었을 경우, 세포질 및 공동-수용체 하향 조절(도 2)의 대규모 손실을 포함하여 음성 선택의 모든 홀마크가 관찰되었다. 중요하게는, 이러한 배양물에서 관찰된 DN 세포는 균일하게 TCR 음성였다(도 2).

[0097] 이러한 데이터는, OP9-DL1 세포 상에서의 분화 동안 웨타이드 효능제의 결속이 TCR 유전자도입 마우스로부터 정제된 T 세포 전구세포로부터 성숙한 TCR $\alpha \beta^+$ DN 세포의 분화를 유도할 수 있음을 나타낸다.

[0099] 실시예 2: OP9-DL1 배양 시스템에서 DN CD24⁻ TCR $\alpha \beta^+$ "γ δ 위너비" 세포의 발달을 유도하기 위한 내인성 TCR β 쇄를 갖는 유전자도입 TCR β 쇄 쌍

[0100] β -선택 전에 단지 TCR α 쇄의 발현이 또한 특정 친화성 임계치 이상의 OP9-DL1 배양 시스템에서 웨타이드-MHC 리간드를 결합할 수 있는 도입된 TCR α 쇄와 짹을 이루는 내인성 TCR β 쇄를 발현시키는 DN3 T 세포 전구세포의 계통 전환을 유도해야 하는지를 결정하기 위해, CD4⁻CD8⁻CD117⁺CD44⁺ DN1 및 DN2 전구 흥선세포를 B6 마우스로부터 선별하고, 이전에 3D α 의 CDR3 영역의 포화 돌연변이유발 라이브러리로부터 단리된 친화성 증강된 변이체로서 동정된 빌름스 종양 항원(WT1) 특이적 T 세포 클론 3D로부터의 TCR α 쇄로 형질도입했다. 3D α 발현 자체물은 마커 형질도입으로서 인간 CD2의 세포외 도메인(Genbank 수탁 번호 NM_001767.3(서열번호 48) 및 NP_001758.2(서열번호 49)(각각 전장 CD2에 대한 전사를 및 단백질 서열))이 이어지는 내부-리보좀 도입 서열 모티브(IRES-hCD2)를 함유한다. 형질도입된 전구 흥선세포는 $1.0 \mu M$ 의 MHC 부류 I H-2D^b 제한된 WT1 웨타이드 RMFPNAPYL(서열번호 2)의 존재 또는 부재하에 14일 동안 배양한 다음, 유동 세포분석에 의해 분석했다. hCD2 음성 분획 내의 DN 세포는 배양 조건에서 웨타이드의 존재와 무관하게 약간의 TCR $\alpha \beta^+$ 세포를 함유한다. 대조적으로

로, 웨타이드를 수용하지 않은 배양물로부터의 hCD2 양성 분획(3D α 유전자를 발현시키는)은 6.8% TCR β^+ 세포를 함유하고, 1.0 μ M WT1 웨타이드가 첨가될 때(도 3a) TCR $\alpha \beta^+$ 세포의 수는 16.6%로 증가하였다. 이러한 데이터는, TCR $\alpha \beta^+$ DN 세포의 상당한 모집단이 β -선택 전에 TCR α 쇄를 이소적으로 발현시키는 초기 전구 흥선세포로부터 발달할 수 있음을 나타낸다. 더욱이, TCR $\alpha \beta^+$ DN 세포의 이 모집단이 동족 웨타이드(도입된 TCR α 쇄에 대해)가 존재할 때 증가한다는 사실은 이러한 세포 중의 상당한 분획이 WT1 항원-특이적 신호에 반응하여 발달된다는 것을 시사한다.

[0101] 정리하면, 이러한 데이터는, TCR $\alpha \beta^+$ DN 모집단이 원래의 증강된 친화성 수용체보다 MHC-WT1 웨타이드 사량체에 대해 더 고친화성을 갖는 TCR을 형성하기 위해 도입된 3D α 와 짹을 이를 수 있는 TCR β 쇄를 발현시키는 세포를 잠재적으로 함유할 수 있고, 표준 T 세포 래퍼토리로부터 단리될 수 있는 것보다 상당히 더 높다는 것을 나타낸다.

[0102] 따라서, 3D α -형질도입된 CD4 $^-$ CD8 $^-$ CD117 $^+$ CD44 $^+$ DN1 및 DN2 전구 흥선세포는 마우스 MHC 부류 1 H-2D b 를 발현시키는 OP9-DL1 세포 상에서 분화되고, 또한 WT1을 발현시키기 위해 형질도입되었다. 비-부착 세포는 최대 21일까지 수일 동안 수집하고, TRIzol 시약(Invitrogen)(도 3b) 속에서 hCD2 $^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ TCR β^+ 세포에 대해 선별하였다. 개별 일수로부터의 세포 종류를 풀링하고, RNA를 정제하고, cDNA를 생성시켰다. 모체 3D TCR은 Vb10 가변 영역을 사용한다. MHC를 접촉시키는 TCR CDR1 및 CDR2 도메인을 유지시키기 위해, 후보 TCR β 쇄를 이 가변 영역을 함유하는 것들로 제한하였다. 따라서, 선별된 세포 모집단 내의 V β 10-함유 TCR β 쇄는 V β 10 특이적 전방 프라이머 및 C β 2 특이적 역방 프라이머(도 3c)를 사용하여 PCR로 단리시켰다. Vb10-특이적 전방 프라이머는 CACC 서열을 함유하여 pENTRTM/D-TOPO^R 내로 지향 TOPO-클로닝을 허용한 다음, 레트로바이러스 벡터 MigR1-attR(Gateway^R) 클로닝을 위한 ccdB 유전자 및 attR 부위를 함유하도록 변형된 MigR1 벡터의 변형(Pear et al., 1998, Blood 92:3780-3792)) 내로 재조합(Invitrogen)을 위한 Gateway^R 기술을 사용하여 전이되도록 설계된다. MigR1-TCR β 라이브러리를 사용하여 PlatE 레트로바이러스 패키징 세포[참조: Morita et al., 2000, Gene Therapy 7:1063-1066; Cell Biolabs, Inc.]를 형질도입하여 레트로바이러스 상청액을 생성한 다음, 이를 사용하여 내인성 TCR α 및 TCR β 쇄, (58 $^{+/-}$)[참조: Letourneur and Malissen, 1989, Eur. J. Immunol. 19:2269-74]이 결여된 58 $\alpha^- \beta^-$ 세포, 마우스 T 세포주를 레트로바이러스 형질도입시켰다.

[0103] 레트로바이러스 TCR β 라이브러리 상청액을 적정하고, 형질도입 후 20% 미만의 형질도입 세포를 유도하는 회석을 사용하여 대부분의 세포가 단지 하나의 레트로바이러스 통합을 함유한다는 것을 보장한다. 형질도입 세포를 먼저 GFP 양성 세포에 대해 선별한 다음, 또한 높은 수준의 MHC-WT1 웨타이드 사량체 염색(도 4a)을 갖는 V β 10 $^+$ 세포 상에서 2회 더 재선별하였다. 제2 선별 후, MHC-WT1 웨타이드 사량체 양성 세포가 웨타이드-독립적 방식으로 MHC 잔기(도 4a)에 결합하였는지를 평가하기 위해 관련되지 않지만 GP33에 특이적인 MHC H-2D b -웨타이드 사량체에 의한 염색에 대해 분석하였다.

[0104] MHC-WT1 웨타이드 사량체를 위한 제3 선별 후, 높은 라이브러리-형질도입된 58 $^{+/-}$ 세포, 선별된 세포를 확장하고, 용해시키고, DNA를 단리시켰다. 레트로바이러스 삽입물은 벡터로부터 AttB Gateway^R 클로닝 부위를 포함하도록 설계된 MigR1-attR 벡터 특이적 프라이머를 사용하여 PCR로 회수하였다. 2-단계 접근법을 사용하여, 삽입물을 먼저 Gateway^R 재조합 클로닝 기술을 사용하여 pDONRTM 벡터(Invitrogen) 내로 클로닝한 다음, MigR1-attR 내로 반환시켰다. 개별적인 세균 콜로니를 재조합 클로닝 반응으로부터 취하여 서열분석하였다. > 30 클론의 서열분석 후, 4개의 가장 보편적인 TCR β 쇄를 추가 분석을 위해 동정하였다. 흥미롭게도, 다수의 클론은 원래 3D β 쇄(도 4b)를 갖는 다수의 보존된 잔기를 공유하는 CDR3 β 서열을 가졌다. 클론 중의 하나(클론#1)는 P108Q 치환 및 G112S 치환(도 4b) 이외에, 원래 3D β 와 거의 동일한 것으로 밝혀졌다. 4개의 후보 TCR β 쇄는 3D $\alpha^+ 58^{+/-}$ 세포 내로 레트로바이러스 형질도입되고, 유동 세포분석(도 4c)으로 분석하였다. 4개 후보 클론 모두 3D $\alpha^+ 58^{+/-}$ 세포 내로 형질도입될 때 MHC-WT1 웨타이드 사량체에 결합되지만, 클론#4는 다른 것들보다 상당히 낮은 수준으로 MHC-WT1 웨타이드 사량체에 결합되고, 추가로 분석되지 않았다. 모체 3D β 쇄는 이미 코돈-최적화되었고, 따라서 모든 세포 표면에서 높은 수준의 TCR을 발현시켜 3D β 와 단리된 클론 사이의 사량체 염색 수준

의 직접 비교를 배제한다.

[0105] MHC-WT1 웨타이드 사량체에 대한 TCR β 쇄 각각의 상대적 친화성을 보다 직접적으로 평가하기 위해, 3D $\alpha^{+/-}$ 세포를 3D α 로 형질도입하고, 후보 TCR β 쇄 각각은 MHC-WT1 웨타이드 사량체의 6개의 2배 연속 회석으로 염색하였고, MFI 값은 1/2 최대 결합(도 5a)을 수득하는 리간드의 농도로서 비선형 회귀로 포화 결합 곡선에 적합시켰다. 3개 후보 TCR β 쇄 모두의 외관 친화성은 3D α 와 짹을 이를 때 모체 3D β 보다 더 높은 것으로 밝혀졌고, 클론#1은 약 10배 더 고친화성(도 5a)을 가졌다. 따라서, 클론#1과 짹을 이룬 3D α 대 모체 3D β 의 사량체 염색을 직접적으로 비교하기 위해, 클론#1을 코돈-최적화하여 원래 3D β 와 클론#1 사이의 유일한 서열 차이가 CDR3 영역에 존재하도록 하였다. 두 작제물은 58 $^{+/-}$ 세포 내로 형질도입시키고, MHC-WT1 웨타이드 사량체 염색에 대해 유동 세포분석으로 평가하였다. 클론#1이 코돈-최적화될 경우, 이는 예상된 바와 같이(도 5b) 본래 3D β 보다 높은 수준으로 사량체를 결합하는 것으로 밝혀졌다.

[0106] 시험관내에서 항원-특이적 TCR의 친화성을 강화시키는 것과 관련되는 하나의 우려는 약간의 변경이 웨타이드/MHC보다 오히려 MHC 단독에 대한 수용체의 친화성을 증가시킴으로써 TCR이 자기반응성일 가능성을 증가시킬 수 있다는 것이다. 이 위험은 TCR β 라이브러리를 CDR3에 대한 변화성을 제한하기 위해 동일한 가변성 도메인(Vb10)을 공유하는 TCR β 쇄로 제한함으로써 최소화하였다. 임의의 후보 TCR β 쇄가 웨타이드-독립적 방식으로 MHC H-2D b 분자를 결합하는 증가된 경향을 부여하는지를 결정하기 위해, 형질도입된 58 $^{+/-}$ 세포를 MHC H-2D b 사량체의 패널(웨타이드: WT1, GP33, E4, MESN, SQV)로 염색했다. 모두 3개의 후보 TCR β 쇄는 본래 3D β (도 5c)와 유사하게 3D α 와 짹을 이를 때 MHC-WT1 웨타이드 사량체에 의해 높은 수준으로 염색했다. 4개의 다른 MHC H-2D b -웨타이드 사량체로 염색될 경우, 모두 3개의 TCR β 쇄는 사량체 염색에 대해 균일하게 음성하여 이러한 수용체에 대해 관찰된 친화성의 증가가 MHC 단독(도 5c)에 대한 증가된 친화성의 결과가 아님을 시사한다.

[0108] 실시예 3: 시험관내에서 초기 인간 T-세포 발달 동안 항원-특이적 TCR α 쇄의 이소성 발현에 의한 고친화성 WT1-특이적 T 세포의 생성

[0109] 월름스 종양(WT1) 항원은 백혈병 세포의 표면 상에서 비정상적으로 높은 수준으로 발현시킨다. HLA A2/WT1-특이적 T 세포 클론을 높은 특이적 활성을 갖는 클론에 대해 스크리닝하였다. WT1에 대해 가장 고친화성을 갖는 것으로 결정된 C4 클론으로부터의 TCR α 및 TCR β 쇄를 단리시켰다. C4 TCR을 포함하고 고수준 발현을 제공하는 렌티바이러스 벡터는 2012년에 계획된 TCR 유전자 치료 임상 시험의 대상이다. WT1 항원에 대한 C4 TCR의 친화성을 추가로 강화하기 위해, 이전 실시예에 기재된 시험관내 분화 시스템을 C4 TCR α 쇄를 발현시키는 인간 제대혈 전구 세포와 함께 사용한다.

[0111] WT1-특이적 T 세포의 생성:

[0112] 인간 부류 I MHC 분자 HLA-A2(Genbank 수탁 번호 U18930.1(서열번호 50) 및 AAA87076.1(서열번호 51), 각각 전사물 및 단백질 서열) 및 인간 부류 I MHC β 2 마이크로글로불린(β 2M) 분자(Genbank 수탁 번호 NM_004048.2(서열번호 52) 및 NP_004039.1(서열번호 53), 각각 전사물 및 단백질 서열)를 발현시키는 실시예 1에 기재된 OP9-DL1 세포주의 변이체를 생성했다. C4 TCR 클론의 TCR α 쇄는 형질도입 마커로서 녹색 형광 단백질(GFP)를 또한 인코딩하는 레트로바이러스 벡터를 사용하여 레트로바이러스 형질도입에 의해 제대혈-유래 조혈전구세포 내로 안정하게 형질도입된다. GFP를 발현시키는 전구 세포는 유동 세포분석으로 선별하고, WT1 웨타이드 RMFPNAPYL(서열번호 2)의 존재 또는 부재하에 OP9-DL1-A2/ β 2M 스트로마 세포 상에서 배양했다. 인간 조혈전구세포는 용이하게 증식하고, OP9-DL1 배양물에서 표현형 CD34 $^{+}$ CD1a $^{+}$ CD4 $^{+}$ [참조: La Motte-Mohs et al., 2005, Blood 105:1431-1439]로 특성화된 인간 T 세포 발달 단계로 분화하고, 이 시점에 이들은 β , γ 및 δ 유전자좌[참조: Spits, 2002, Nat. Rev. Immunol. 2:760-772]에서 TCR 유전자 재배열을 경험한다. 이들의 마우스 대상물과 같이, 인-프라임 재배열을 생산하는 TCR α -발현 인간 T 세포 전구세포는 두 세포 운명 중의 하나를 순응시킨다: 유전자도입 TCR α 와 충분히 짹을 이루지 않거나 유전자도입 TCR α 와 짹을 이루지만 이 $\alpha\beta$ TCR을 통해 강한 신호를 수신하지 않은 것들은 비록 전-TCR일지라도 신호에 반응하여 DP 단계로 분화하고; 한편, 유전자도입 TCR α 와 짹을 이를 수 있고 이 성숙 $\alpha\beta$ TCR을 통해 충분히 강한 신호를 수신하는 TCR β 쇄를 생성하는 것들은 DN TCR $\alpha\beta$ +/ $\gamma\delta$ -형 계통으로 분화한다고 가정된다. DP 세포만이 양성 선택 신호 없이 약 3 내지 4일 동안 생존하기 때문에, 그리고 효율적인 양성 선택이 OP9-DL1 배양물에서 발생하지 않기 때문에, $\alpha\beta$ TCR을 통해 효능제 신호를 수신하지 않은 세포의 대부분은 배양물로부터 제거되어 초기 $\alpha\beta$ TCR 신호에 기인하여 발달하는 $\gamma\delta$ -형 세포를 축적시킨다.

[0114] 후보 TCRβ 쇄의 단리:

다양한 배양 시점에서, DN TCR $\alpha\beta + \gamma\delta$ -형 표현형을 갖고 WT1 웨타이드/A2 MHC-사량체 양성인 비-부착 세포는 세포 선별로 수집한다. 배양물 중의 연속된 항원의 존재가 사량체 염색을 검출 이하로 감소시킬 수 있는 TCR 하향-조절을 유도할 수 있기 때문에, WT1 사량체 양성 세포를 검출하는 것이 가능하지 않을 수 있다. 더욱이, 이러한 세포가 아마 CD8 $\alpha\beta$ 를 발현시키지 않기 때문에, CD8-독립적이지 않은 고친화성 수용체는 사량체 염색으로 검출가능하지 않다. 따라서, 배양물(이하 참조)에서 나타나는 모든 DN TCR $\alpha\beta +$ 세포로부터의 TCRβ 쇄를 스크리닝하는 것이 필요할 수 있다. 또한, 후보 T 세포를 모체 C4 TCR의 CDR1 및 CDR2 MHC 접촉을 유지하기 위해, 본래 C4 TCRβ 쇄(V β 17)에 의해 이용되는 동일한 V β 단편을 사용하는 것들로 제한하는 것이 바람직할 수도 있다.

세포 선별 후, 내인성 TCRβ 쇄는 전체 RNA를 정제시키고, 전장 RACE RT-PCR을 C- β 1 또는 C- β 2 프라이머로 수행하고, PCR 생성물을 pENTR™/D-TOPO® 벡터(Invitrogen) 내로 클로닝하여 클론화하고, 이는 지향 TOPO-클로닝을 허용하고 인비트로겐의 Gateway® 기술 재조합 시스템을 사용하여 레트로바이러스 벡터 Mig-attR(목적하는 유전자의 삽입을 위한 attR 부위를 함유하는 MigR1[Pear et al., 1998, Blood 92:3780-3792]의 변이체)로 신속하고 효율적인 전이를 허용하는 attL 부위를 도입한다. 재조합 반응의 생성물을 고효율 세균 내로 전기천공하고, 콜로니를 함께 짚어내고, 맥시프렙화하여 잠재적으로 WT1-반응성 TCRβ 쇄의 레트로바이러스 라이브러리를 생성한다.

[0118] 고친화성 WT1-특이적 TCR의 스크리닝:

고친화성 WT1-특이적 TCR을 형성하기 위해 C4 TCR α 쇄와 짹을 이를 수 있는 TCRβ 쇄는 TCRβ 라이브러리를 C4 TCR α 쇄(H9-C4 α)를 발현시키기 위해 형질도입된 인간 T 세포주 H9(Catalog # HTB-176, ATCC, Manassas, VA) 내로 형질도입함으로써 동정된다. 형질도입된 세포는 고수준의 MHC-WT1 웨타이드 사량체 염색에 대해 유동 세포 분석으로 선별하고, 레트로바이러스 삽입물은 선별된 모집단으로부터 PCR에 의해 증폭된다. 후보 TCRβ 쇄는 PCR 생성물의 TOPO-클로닝, 이어서 서열 분석으로 동정된다. 선택된 TCRβ 쇄 및 모체 C4 α 를 H9-C4 α 세포 내로 형질도입하고, MHC-WT1 웨타이드 사량체에 대한 상대적 친화성을 형질도입된 세포를 PE-접합된 사량체의 연속 2배 희석(실시예 2에 기재된 바와 같음)으로 염색하여 계산한다. 친화성 값은 각각의 희석에 대한 MF1을 1/2-최대 결합을 수득하는 사량체 농도로서 규정된 KD 및 비선형 회귀에 의해 결합 곡선에 적합시킴으로써 결정된다. MHC-웨타이드 사량체 염색에 의해 야생형 C4 수용체보다 고친화성을 갖는 TCR을 생성하기 위해 C4 TCR α 와 짹을 이를 수 있는 TCRβ 쇄는 안전성 및 유효성을 위해 추가로 특성화한다.

[0121] 실시예 4: WT1-표적화된 TCR 유전자 치료의 생체내 마우스 모델을 사용하는 후보 고친화성 TCR의 유효성 및 안전성의 특성화

실시예 3에서와 같이 동정된 증강된 친화성 인간 WT1-특이적 TCR을 WT1 표적화된 유전자 치료의 HLA-A2 유전자 도입 마우스 모델에서 안정성 및 유효성에 대해 시험한다.

[0124] 탈표적화 활성에 대한 증강된 TCR의 평가:

고친화성 TCR의 무차별 활성화는 WT1 웨타이드의 존재 또는 부재하에 A2 발현 표적 세포의 패널에 대응하여 TCR-형질도입된 T 세포에 의해 사이토kin 생산을 측정하여 평가한다. 모체 C4 TCR에 비교하여 WT1 음성 표적 세포의 탈표적 인식을 나타내는 TCR은 추가 연구를 진행하지 않는다.

[0127] 생체내 정상 조직 상에서 증강된 친화성 TCR 활성:

정상 조직에서 WT1 발현은 마우스 및 인간 둘 다에서 유사하고, C4 TCR에 의해 인식된 WT1 웨타이드는 마우스에서 동일하고, 마우스 세포에 의해 처리되고 제공되는 것으로 공지되어 있다[Gaiger et al., 2000, Blood 96:1480-9]. HLA-A2 유전자도입 마우스는 인간 고친화성 WT1-특이적 TCR을 발현하는 T 세포에 의해 정상 조직의 인식에 대해 시험하기 위해 사용되었다[Kuball et al., 2009, J. Exp. Med. 206:463-475].

이전 실시예에서 개시되어 있는 바와 같이 시험관내에서 생성된 증강된 친화성 TCR의 안전성을 평가하기 위해, D^b(마우스 SD8을 결합하기 위한)[Newberg et al., 1996, J. Immunol. 156:2473-2480]의 α 3에 융합된 A2의 α 1 및 α 2 도메인을 인코딩하는 도입유전자를 발현시키는 B6.A2/D^b 마우스로부터 CD8⁺ T 세포는 발현된 후보 증강된 친화성 TCR로 형질도입한다. TCR은 형질도입 이전에 인간 C α 및 C β 도메인보다는 마우스를 함유하도록 변형시키고, 이는 마우스 T 세포에서 발현을 증가시킨다[Pouw et al., 2007, J. Gene Med. 9:561-570]. 마우스내로

TCR-형질도입된 T 세포의 전이 후 약 4 내지 6주에, WT1을 자연적으로 발현시키는 것으로 공지된 조직(예: 폐 및 신장)을 T 세포 침윤 및 조직 손상의 증거를 위해 조직학으로 분석하고, 골수는 WT1-발현 조혈전구세포의 고갈을 위해 유동 세포분석으로 평가한다.

[0131] 증강된 친화성과 개선된 표적 인식 및 기능의 상관 관계:

[0132] TCR에 대해 친화성 임계값이 존재할 수 있고, 그 이상에서 추가의 증강은 T 세포 기능을 증가시키지 않고, 실제로 항원 감도를 감소시킬 수 있다는 증거가 있다[Schmid et al., 2010, J. Immunol. 184:4936-46]. 따라서, 제한 펫타이드 농도로 펠스화된 표적 세포에 대한 고친화성 TCR-형질도입된 CD8⁺ T 세포의 반응은 모체 C4 TCR을 발현시키는 T 세포와 비교한다. 사이토kin 생산(IFNγ/IL-2) 및 증식 뿐만 아니라 용해 활성을 분석한다. 증가된 친화성 및 강화된 기능을 나타내는 TCR은 추가 연구 및 TCR 유전자 치료 시험에서 잠재적인 사용에 대해 진행한다.

[0134] 실시예 5: 생체내에서 고친화성 WT1-특이적 T 세포의 생성

[0135] 생체내 마우스 모델(TCR α 레트로게닉 마우스)을 사용하여 TCRβ⁺ 이중 음성(DN) 세포가 흥선에서 발달할 수 있는지를 결정하였다. 레트로게닉(레트로바이러스 형질도입된) 마우스는 유전자도입 방법에 비해, 특이적 TCR 도입유전자를 발현시키는 마우스의 신속한 생성을 허용한다. 레트로게닉 마우스를 제조하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다[참조: Holst et al., 2006, Nat. Protoc. 1:406-417; Holst et al., 2006, Nat. Methods 3:191-197; Bettini et al., 2012, Immunology 136:265-272]. 간단히, 조혈 전구/줄기 세포는 B6 마우스의 골수로부터 정제하고, 고친화성 WT1 특이적 3D-PYY TCR 또는 저친화성 메소텔린 특이적 TCR 7431로부터의 TCR α 쇄를 발현시키기 위해 형질도입하였다. 3D-PYY TCR은 3D TCR로부터 유전자조작되고, WT1/D^b Ig DimerX(BD Biosciences)를 갖는 T 세포 디스플레이 시스템 및 선택을 사용하여 동정된 보다 고친화성 TCR이다[Stone et al., 2011, J. Immunol. 186:5193-5200; Chervin et al., 2008, J. Immunol. Methods 339:175-184]. 3D-PYY TCR α 또는 7431 α 도입유전자를 포함하는 레트로바이러스 자체물은 또한 두 도입유전자 사이에 IRES와 함께 형질도입 마커로서 인간 CD2의 세포외 도메인을 포함한다. 형질도입된 골수 유래 전구세포는 도입된 TCR α 쇄를 발현시키는 골수 키메라를 생성하기 위해 치사적으로 조사된 B6 숙주 마우스로 전이시켰다. TCR α-형질도입된 골수 세포의 생체내 전이 후 6주에, 마우스를 희생시켰다. 흥선 및 비장으로부터의 세포를 유동 세포분석(도 6a, 6b)에 의해 CD4 및 CD8 발현에 대해 분석하였다. 흥선(도 6a)에서 TCRβ⁺ 세포에 의한 CD4 및 CD8 발현의 분석은, 이중 음성 TCRβ⁺ 세포의 대집단이 발달 중 초기에 TCR α 쇄를 이소적으로 발현시키는 형질도입된 흥선 세포에서 생체내 검출될 수 있고, 이 모집단이 고친화성 TCR(예: 3D-PYY α)로부터의 TCR α를 발현시키는 마우스에서 보다 현저하다는 것을 보여준다. 3D-PYY α 및 7431 α 레트로게닉 마우스로부터 DN TCRβ⁺ 흥선세포를 또한 각각 Vβ 10 및 Vβ 9의 발현에 대해 분석하였다(도 6a). 이러한 데이터는, DN TCRβ⁺ 모집단이 본래 항원 특이적 TCR과 동일한 Vβ 유전자 단편을 사용하는 세포에 풍부하다는 것을 나타낸다. 정리하면, 이러한 데이터는, DN TCRβ⁺ 세포가 흥선에서 발현된 표적 항원(즉, WT1 또는 메소텔린)과 동족 상호작용으로부터 생성되는 비교적 강한 TCR 신호전달에 대응하여 발달한다는 가설을 지지한다. TCRβ⁺ 레트로게닉 비장세포의 CD4 및 CD8 발현의 분석은 이러한 DN TCRβ⁺ 세포가 또한 레트로게닉 마우스(도 6b)의 말초에 또한 존재한다는 것을 보여준다.

[0136] 3D-PYY α 및 7431 α 레트로게닉 마우스로부터의 비장세포를 각각 WT1 펫타이드 및 메소텔린 펫타이드로 자극하고, IL-2의 존재하에 6일 동안 시험관내 배양하였다. 항원 특이적 세포를 이들이 사량체 염색으로 검출될 수 있도록 잠재적으로 확장하기 위해 IL-2를 배양물에 첨가하였다. 배양물을 TCRβ+ 게이트 내에서 유동 세포분석에 의한 CD4 및 CD8 발현 및 모체 TCR Vβ 유전자(도 7)의 발현에 대해 분석하였다. 다시, 모체 Vβ 유전자 계통에 대한 증강이 특히 고친화성 3D-PYY의 경우에 관찰되었다. 배양된 T 세포를 또한 WT1 또는 메소텔린 펫타이드/MHC 사량체(도 7)로 염색시켜 항원-특이적 T 세포의 존재에 대해 분석하였다. 이러한 데이터는, 특히 고친화성 3D-PYY α 레트로게닉 마우스의 경우에, 상당한 수의 항원 특이적 T 세포가 이러한 배양물에 존재함을 나타낸다. 사량체 양성 세포가 TCR α-형질도입된(hCD2⁺) 모집단 내에서 발견되었다는 사실은 이러한 세포가 TCR α 쇄의 초기 발현 결과로서 발달되었음을 나타낸다. 이는, 이러한 마우스에서 발달한 DN TCRβ+ 세포가 실제로 고친화성 항원 특이적 T 세포를 함유하지 않음을 증명한다. 이들이 DN 세포이기 때문에, 그들은 사량체 결합을 돋기 위해 CD8의 기여를 갖지 않고(이러한 TCR은 "CD8-독립적임"), CD8-독립적 사량체 결합은 고친화성 TCR을 필요로 한다.

[0137]

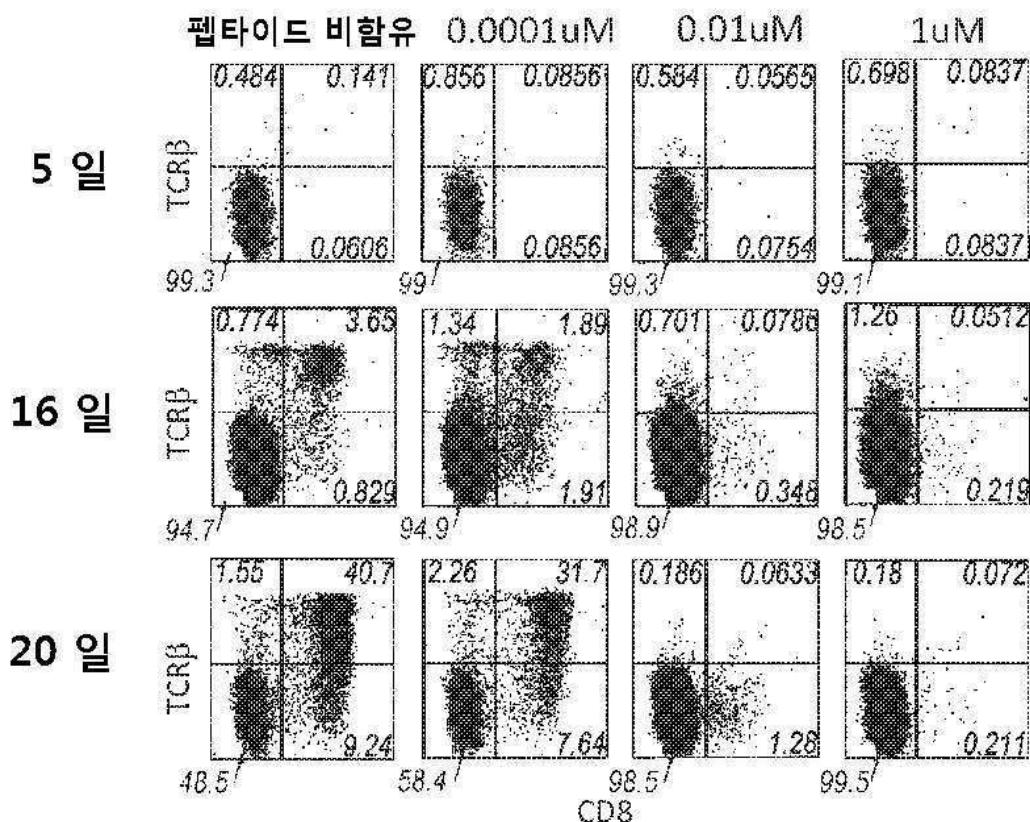
상기 기재된 다양한 실시형태를 조합하여 추가의 실시양태를 제공할 수 있다. 본원에서 언급된 및/또는 출원 데 이터 시트에 나열된 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 비-특허 공보 모두는 전문이 본원에 참조로 인용된다. 실시형태의 양상은, 필요에 따라 각종 특허, 출원 및 공보의 개념을 사용하도록 변형되어 추가의 실시형태를 제공할 수 있다.

[0138]

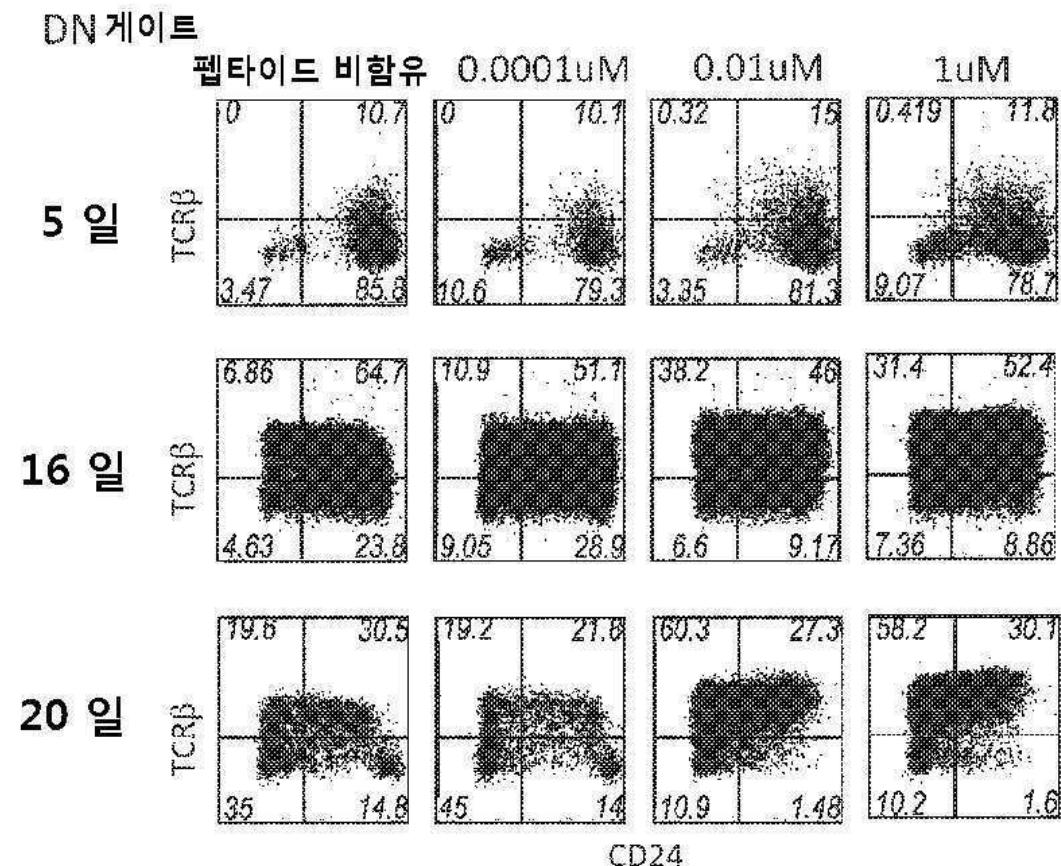
상술된 설명의 견지에서 실시형태에 대한 이러한 변화 및 기타 변화가 이루어질 수 있다. 일반적으로, 하기 특허청구범위에, 사용된 용어들이 특허청구범위를 명세서 및 특허청구범위에 기재된 특정 실시형태로 제한하는 것으로 해석되지 않아야 하고, 이러한 특허청구범위의 등가물의 전체 범위와 함께 모든 가능한 실시형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 특허청구범위는 상기 개시에 의해 제한되지 않는다.

도면

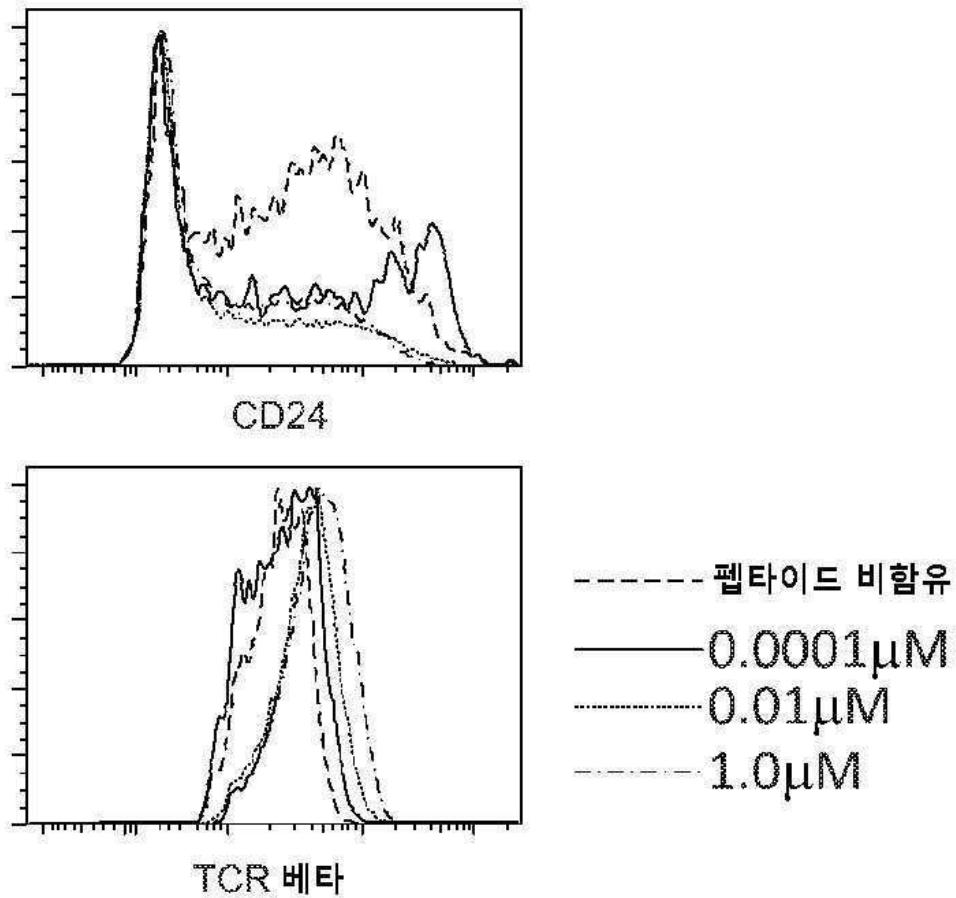
도면 1a



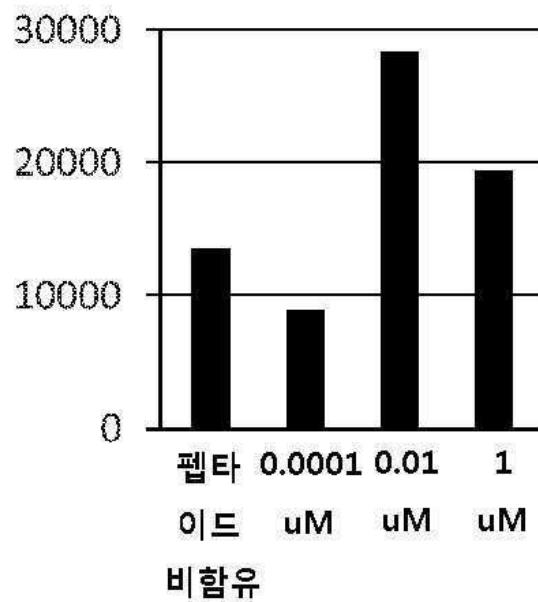
도면 1b



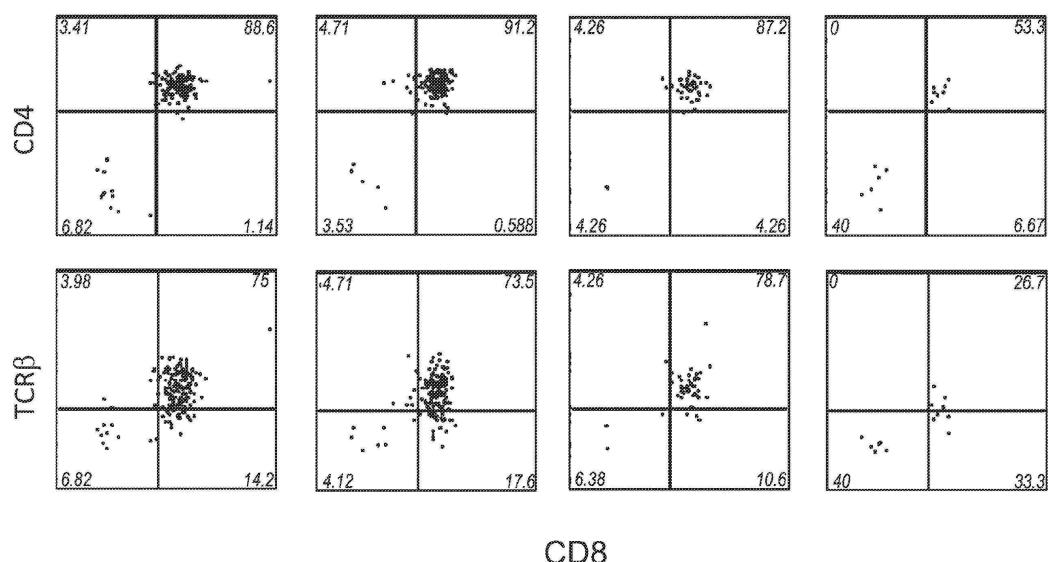
도면 1c



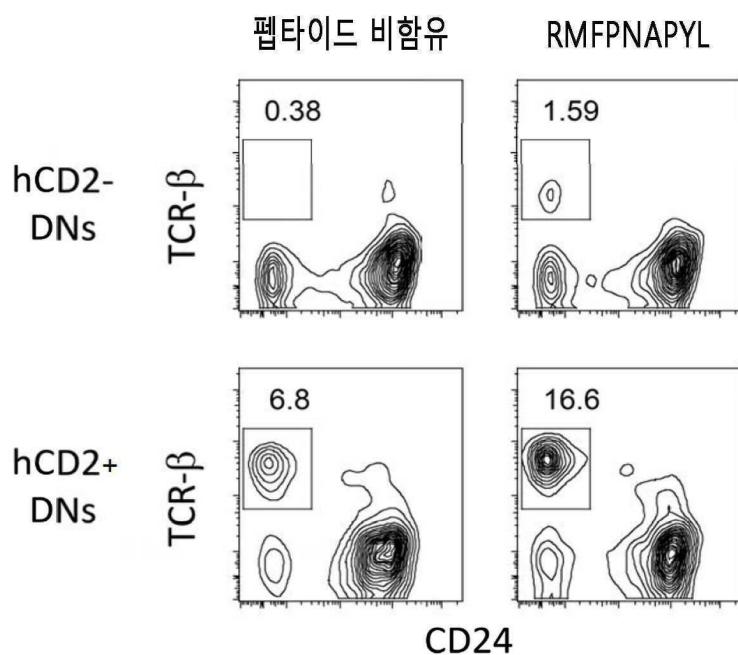
도면 1d



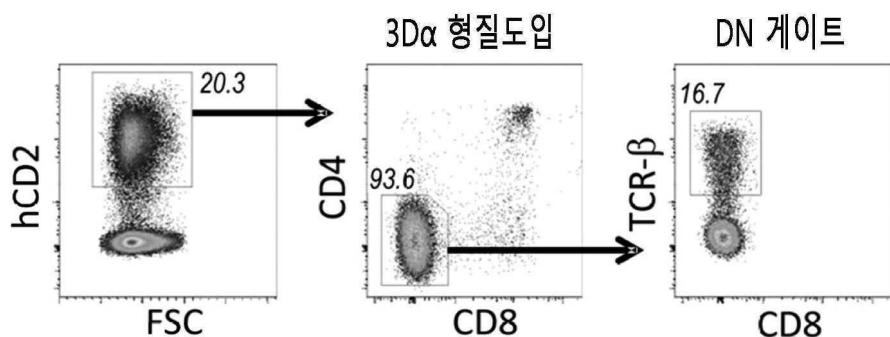
도면2



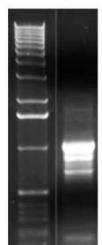
도면3a



도면3b

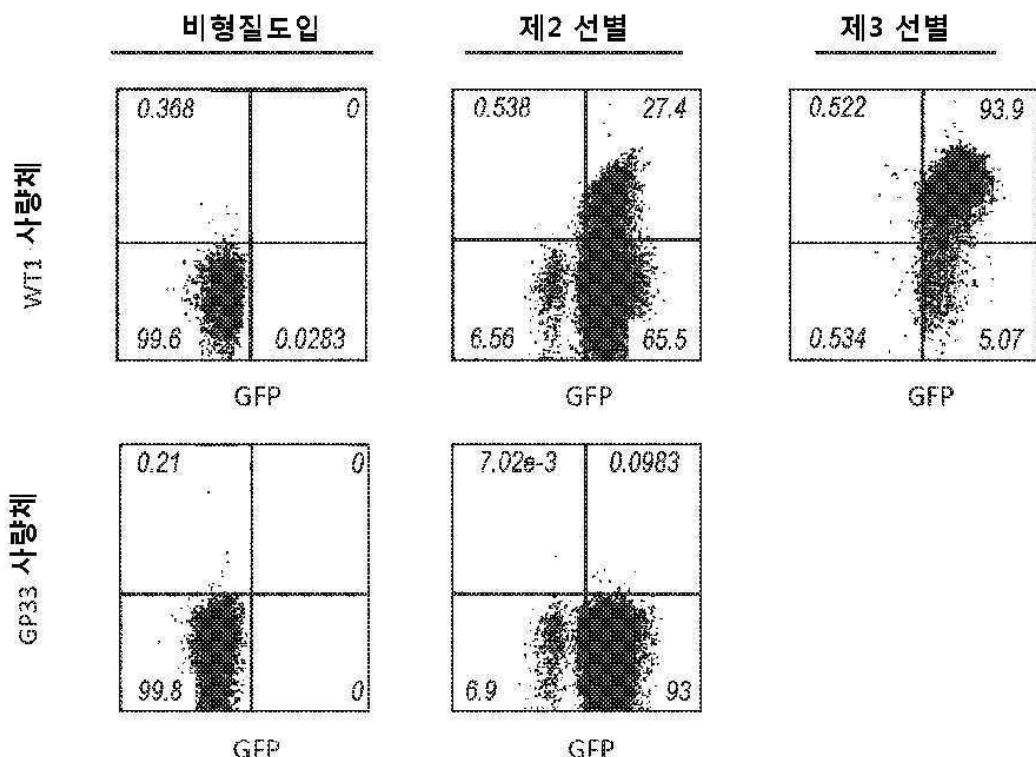


도면3c



- PCR에 의한 클론 V β 10 TCR β 쇄
- pENTR으로의 직접적 클로닝
- 레트로바이러스 벡터 Migr1 (IRES-GFP)로의 전이
- 58/- 세포의 형질도입 및 스크리닝

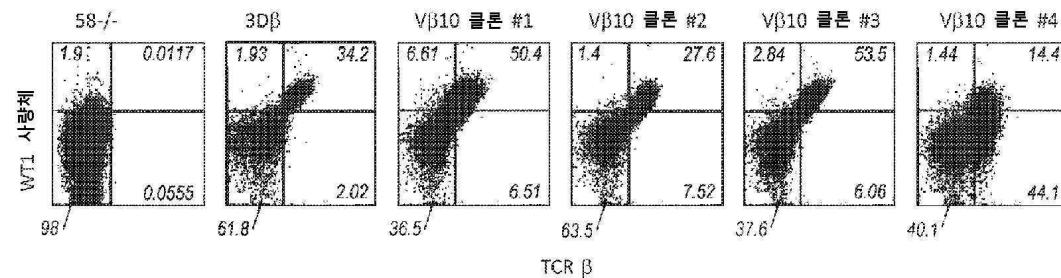
도면4a



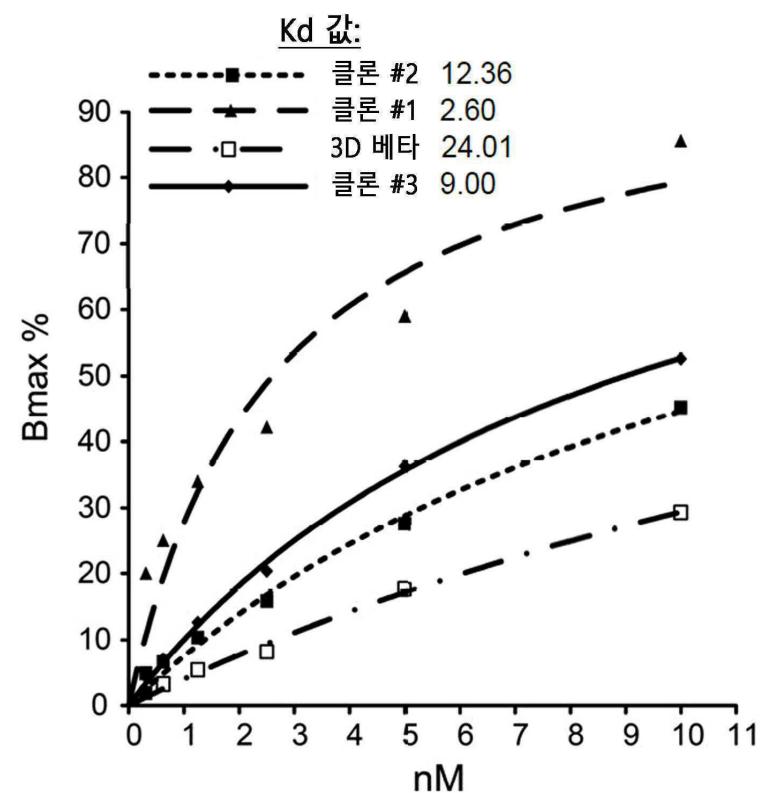
도면4b

	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	
3D β	C	A	S	S	P	G	L	G	G	S	Y	E	Q	Y	F	
	tgt	gcc	age	agc	ect	gga	cgt	ggg	gga	tcc	tat	gaa	cag	tac	ttc	
W β 10 클론 #1	C	A	S	S	Q	G	L	G	S	S	Y	E	Q	Y	F	
	tgt	gcc	age	agc	eag	gga	cgt	ggg	age	tcc	tat	gaa	cag	tac	ttc	
W β 10 클론 #2	C	A	S	S	Y	I	L		G	A	Y	R	Q	Y	F	
	tgt	gcc	agc	agc	tai	ata	cgt	...	ggg	gcc	tat	gaa	cag	tac	ttc	
W β 10 클론 #3	C	A	S	S	S	W	T		V	Y	E	Q	Y	F	서열번호 38	
	tgt	gcc	agc	agc	tcc	tgg	aca	gtc	tat	gaa	cag	tac	ttc	
W β 10 클론 #4	C	A	S	S	W	T	G	A	N	T	E	G	Q	L	Y	F
	tgt	gcc	agc	agc	igg	aea	ggg	gca	aac	acc	ggg	cag	etc	tac	ttt	

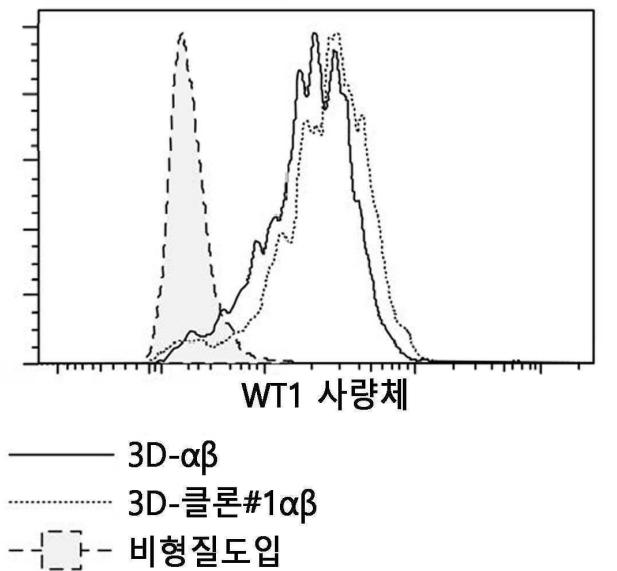
도면4c



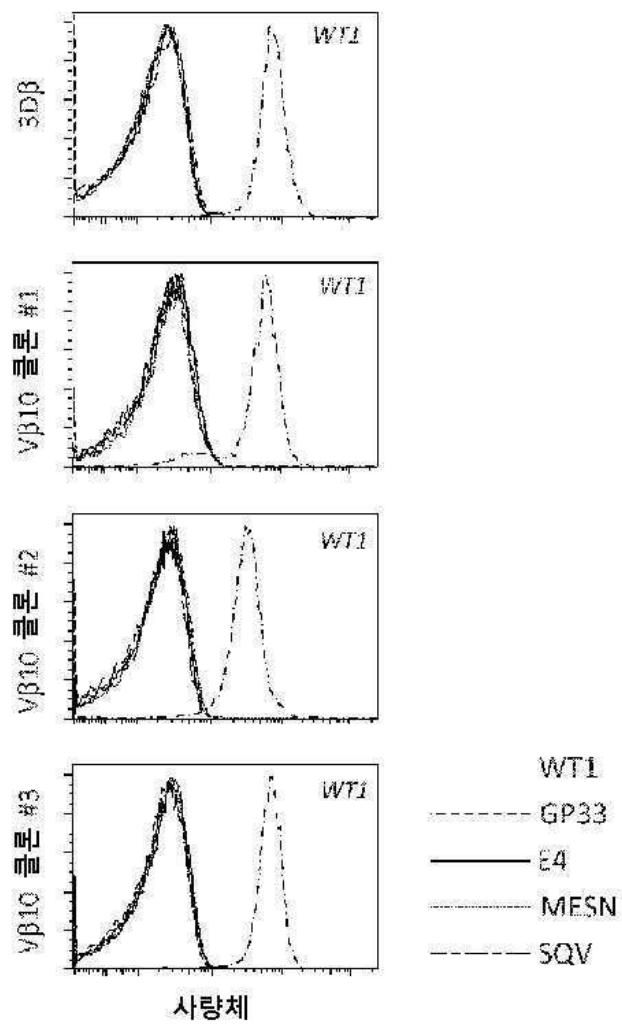
도면5a

WT1 사량체 역가
(Bmax로 표준화)

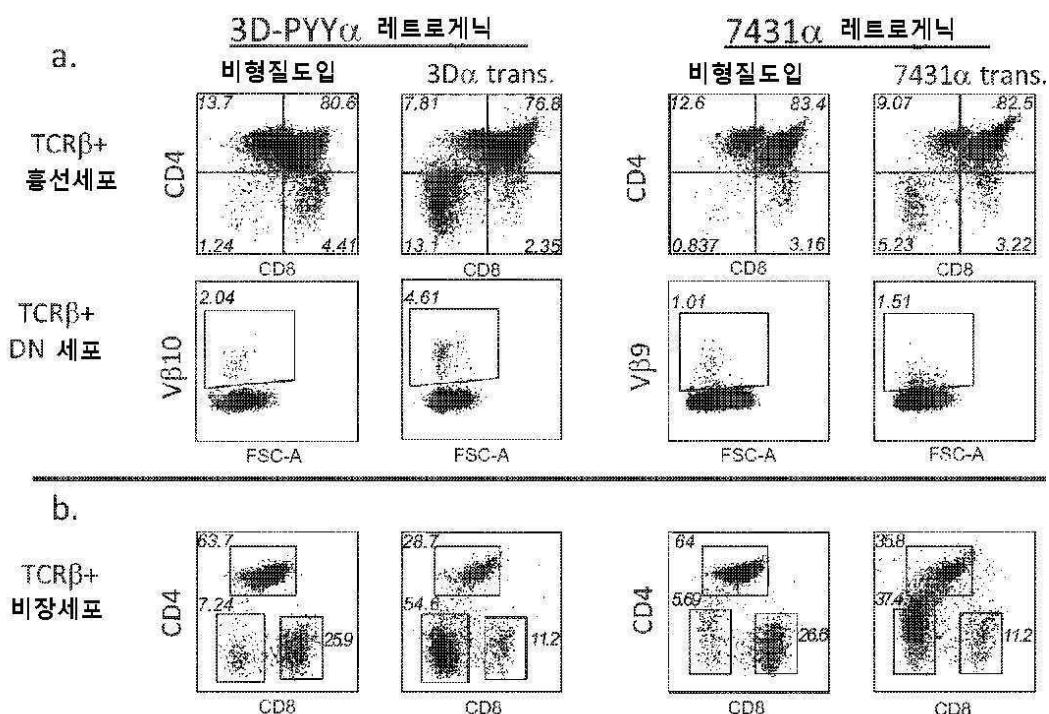
도면5b



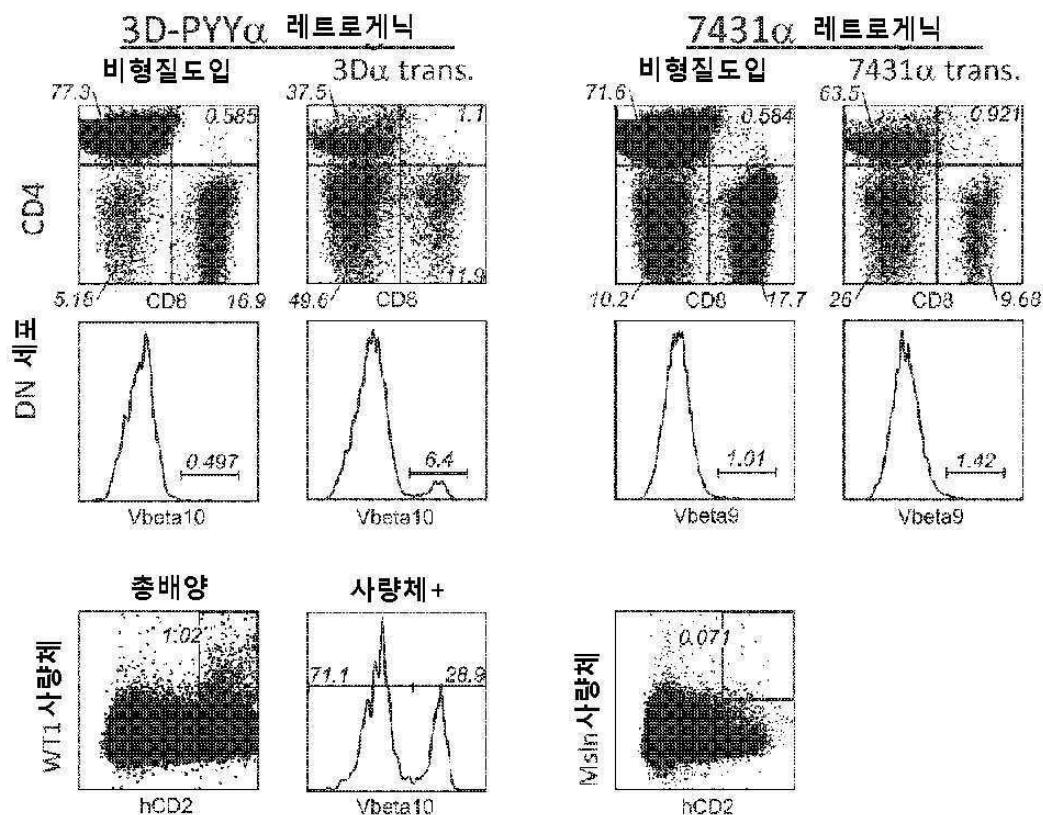
도면5c



도면6



도면7



서 열 목 록

<110> Fred Hutchinson Cancer Research Center

<120> ENHANCED AFFINITY T CELL RECEPTORS AND
METHODS FOR MAKING THE SAME

<130> IPA141134-US-D1

<150> US 61/642,358

<151> 2012-05-03

<160> 53

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic ovalbumin peptide

<400> 1

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1	5
---	---

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic WT1 peptide

<400> 2

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1	5
---	---

<210> 3

<211> 3366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cgtgggattt ccagaccgcg gctttcta at cggctcg ggaagctctg cagctcttt	60
ggaaat taag ctcaat ctct ggactctc tctttctt tctccccctc cctctctgc	120
gaagaagctc aagaca aaaaac caggaagccg gcgaccctca cctcctcg ggctggagg	180

aaggaggaaa acgaaagtgc ccggccgcg cgtgtcccc gagagctgcc tttcctcgaa	240
catccctggg gctgccgcgg gacctcgac ggcggatata aagaaccgcg gccttggaa	300
gaggcggaga ccggctttta aagaaagaag tcctgggtcc tgcggtctgg ggcgaggcaa	360
gggcgccttt ctgcgcacgc tccccgtggc ccatcgatcc cccgcgcgtc cgccgcgttt	420
ctaaggagag aagtgggggc cccccaggct cgcgctgga gcgaaggcage atggcagtc	480
ggtgcgcgt gcccctggcg gtgcctcggt ccttgcgtg tcaggtctgg agctctgggg	540
tgttcgaact gaagctgcag gagttcgtca acaagaaggg gctgctgggg aaccgcaact	600
gctgccgcgg gggcgccggg ccaccgcgt gcgcctgcgg gaccccttc cgcgtgtgcc	660
tcaagcacta ccaggccagc gtgtccccgg agccgcctg cac tacggc agcggcgtca	720
ccccctgtgt gggcgacgc tccttcagtc tgcccgacgg cggggcgcc gactccgcgt	780
tcagcaaccc catccgccttc cccttcggct tcacctggcc gggcaccttc tctctgatta	840
ttgaagctct ccacacagat tctcctgtat acctcgcaac agaaaaccca gaaagactca	900
tcagccgcct ggccacccag aggcacctga cgggtggcga ggagtggtcc caggacctgc	960
acagcagcgg ccgcacggac ctcaagtact cctaccgcgt cgtgtgtgac gaacactact	1020
acggagaggg ctgtccgtt ttctgcgcgtc cccggacga tgccttcggc cacttcacct	1080
gtggggagcg tggggagaaa gtgtgcaacc ctggctggaa agggccctac tgacacagac	1140
cgcattgtgt gcctggatgt gatgagcagc atggatttg tgacaacca gggaatgca	1200
agtgcagagt gggctggcag ggccggtaact gtgacgagtg tatccgtat ccaggctgtc	1260
tccatggcac ctgcccacgc ccctggcgt gcaactgcga ggaaggctgg gggggcctt	1320
tctgcaacca ggacctgaac tactgcacac accataagcc ctgcaagaat ggagccacct	1380
gcaccaacac gggccagggg agctacactt gctttgcgc gcctgggtac acaggtgcca	1440
cctgcgagct ggggattgac gagtgtgacc ccagcccttg taagaacgga gggagctgca	1500
cggatctcga gaacagctac tcctgtaccc tcccccccg cttctacggc aaaatctgtg	1560
aatttggatgc catgacactgt gcgacggcc cttgtttaa cgggggtcg tgctcagaca	1620
gccccgatgg aggtacagc tgccgcgtcc ccgtggcgtt ctccggcttc aactgtgaga	1680
agaaaaattga ctactgcagc tcttcaccc tttctaatgg tgccaaatgt gtggacactg	1740
gtgtatgccta cctgtgcgcg tgccaggccg gcttctcggt gaggcactgt gacgacaacg	1800
tggacgactg cccctccctcc cccgtgcgcac acgggggcac ctgcggat ggcgtgaacg	1860
acttctctg cacctgccccg cctggctaca cgggcaggaa ctgcagtgc cccgtcagca	1920

ggtgcgagca cgcaccctgc cacaatgggg ccacactgcca cgagagggc caccgctatg 1980

tgtgcgagtg tgcccgaggc tacgggggtc ccaactgcca gttcctgctc cccgagctgc 2040
 cccggggccc agcgggttgt gacctactg agaagctaga gggccagggc gggccattcc 2100
 cctgggtggc cgtgtcgcc ggggtcatcc ttgtcctcat gctgctgctg ggctgtgccg 2160
 ctgtgggtgt ctgcgtccgg ctgaggctgc agaagcacgg gccccagcc gaccctgcc 2220
 ggggggagac ggagaccatg aacaacctgg ccaactgcca gcgtgagaag gacatctcag 2280
 tcagcatcat cggggccacg cagatcaaga acaccaacaa gaaggcggac ttccacgggg 2340
 accacagcgc cgacaagaat ggcttcaagg cccgtaccc agcggtgac tataacctcg 2400

tgcaaggacca caagggtgac gacaccgccc tcagggacgc gcacagcaag cgtgacacca 2460
 atgtccagcc ccaggcgtcc tcaggggagg agaaggggac cccgaccaca ctcaggggtg 2520
 gagaagcatc taaaagaaaa aggccggact cgggctgttc aacttcaaaa gacaccaagt 2580
 accagtccgt gtacgtcata tccgaggaga aggatgagt cgtcatagca actgagggt 2640
 aaaatgaaag ttagatggca agactccgt ttctttaaa ataagtaaaa ttccaaggat 2700
 atatgccccca acgaatgctg ctgaagagga gggaggcctc gtggactgct gctgagaaac 2760
 cgagttcaga ccgagcaggt tctcctcctg aggtcctcga cgcctgccga cagcctgtcg 2820

cggccggcc gcctcgccca ctgccttcgg tgacgtcgcc gttgcactat ggacagtgc 2880
 tcttaagaga atatatattt aaatgggtga actgaattac gcataagaag catgcactgc 2940
 ctgagtgat atttggatt cttatgagcc agtctttct tgaatttagaa acacaaacac 3000
 tgcctttatt gtccttttg atacgaagat gtgccttttc tagatggaaa agatgtgt 3060
 tatttttgg attttaaaaa atatttca tgatatctgt aaagcttgag tattttgtga 3120
 tgttcgttt ttataattt aattttggta aatatgtaca aaggcacttc gggctatgt 3180
 gactatattt tttgtatatt aaatgtatatt atgaaatatt gtcaaattgt tatttgagtt 3240

ttttactgtt ttgttaatga agaaattcct tttaaaata ttttccaaa ataaattttt 3300
 tgaatgacaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3360
 aaaaaaa 3366

<210> 4

<211> 723

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Ser Arg Cys Ala Leu Ala Leu Ala Val Leu Ser Ala Leu Leu

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

Cys Ile Arg Tyr Pro Gly Cys Leu His Gly Thr Cys Gln Gln Pro Trp
 260 265 270
 Gln Cys Asn Cys Gln Glu Gly Trp Gly Leu Phe Cys Asn Gln Asp
 275 280 285
 Leu Asn Tyr Cys Thr His His Lys Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys
 290 295 300
 Thr Asn Thr Gly Gln Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys Arg Pro Gly Tyr
 305 310 315 320

 Thr Gly Ala Thr Cys Glu Leu Gly Ile Asp Glu Cys Asp Pro Ser Pro
 325 330 335
 Cys Lys Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Ser Cys
 340 345 350
 Thr Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Lys Ile Cys Glu Leu Ser Ala Met
 355 360 365
 Thr Cys Ala Asp Gly Pro Cys Phe Asn Gly Gly Arg Cys Ser Asp Ser
 370 375 380
 Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Cys Arg Cys Pro Val Gly Tyr Ser Gly Phe

 385 390 395 400
 Asn Cys Glu Lys Lys Ile Asp Tyr Cys Ser Ser Ser Pro Cys Ser Asn
 405 410 415
 Gly Ala Lys Cys Val Asp Leu Gly Asp Ala Tyr Leu Cys Arg Cys Gln
 420 425 430
 Ala Gly Phe Ser Gly Arg His Cys Asp Asp Asn Val Asp Asp Cys Ala
 435 440 445
 Ser Ser Pro Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Arg Asp Gly Val Asn Asp
 450 455 460

 Phe Ser Cys Thr Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Arg Asn Cys Ser Ala
 465 470 475 480
 Pro Val Ser Arg Cys Glu His Ala Pro Cys His Asn Gly Ala Thr Cys
 485 490 495
 His Glu Arg Gly His Arg Tyr Val Cys Glu Cys Ala Arg Gly Tyr Gly
 500 505 510

Gly Pro Asn Cys Gln Phe Leu Leu Pro Glu Leu Pro Pro Gly Pro Ala
 515 520 525
 Val Val Asp Leu Thr Glu Lys Leu Glu Gly Gln Gly Gly Pro Phe Pro
 530 535 540
 Trp Val Ala Val Cys Ala Gly Val Ile Leu Val Leu Met Leu Leu Leu
 545 550 555 560
 Gly Cys Ala Ala Val Val Val Cys Val Arg Leu Arg Leu Gln Lys His
 565 570 575
 Arg Pro Pro Ala Asp Pro Cys Arg Gly Glu Thr Glu Thr Met Asn Asn
 580 585 590
 Leu Ala Asn Cys Gln Arg Glu Lys Asp Ile Ser Val Ser Ile Ile Gly
 595 600 605

 Ala Thr Gln Ile Lys Asn Thr Asn Lys Ala Asp Phe His Gly Asp
 610 615 620
 His Ser Ala Asp Lys Asn Gly Phe Lys Ala Arg Tyr Pro Ala Val Asp
 625 630 635 640
 Tyr Asn Leu Val Gln Asp Leu Lys Gly Asp Asp Thr Ala Val Arg Asp
 645 650 655
 Ala His Ser Lys Arg Asp Thr Lys Cys Gln Pro Gln Gly Ser Ser Gly
 660 665 670
 Glu Glu Lys Gly Thr Pro Thr Thr Leu Arg Gly Glu Ala Ser Glu
 675 680 685
 Arg Lys Arg Pro Asp Ser Gly Cys Ser Thr Ser Lys Asp Thr Lys Tyr
 690 695 700
 Gln Ser Val Tyr Val Ile Ser Glu Glu Lys Asp Glu Cys Val Ile Ala
 705 710 715 720
 Thr Glu Val
 <210> 5
 <211> 3444
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 5

cttggcgata gtgcaagaga taccggtcta gaacactctg ggagcggcag cggctgccga	60
gtgacgcgg gccggaaac cagggcgcgc gccgcagtcc ttgccaccac cgttcccacc	120
gcgccccctcg gggccccgga ttatgcctc accggtgaaa tttccagacc gccgccttcct	180
aataggcctg cgaaggaagc cactgcaagc tctcttggaa attaagctga acatctggc	240
tctttccct ctgtgtctta tctccttctt cctcttccc tccgcaaga agcttaagac	300
aaaaccagaa agcaggagac actcacctct ccgtggactg aaagccagac gaagaggaaa	360
ccgaaagtgc tccttctca gtgcctcgta gagctttgc cggggaccta gctgaaggca	420
ccgcaccctc ctgaagcgac ctggccctga tagcacacct ggagccgaga gacgccttc	480
cgcactact cctcgggtca tatagacttt cctggcatcc ctgggtcttt gaagaagaaa	540
gaaaagagga tactcttagga gagcaaggcgtt accatggcc gtcggagcgc	600
gctagccctt gccgtgtct ctgcctgtct gtgccaggc tggagctccg gcgtatttga	660
gctgaagctg caggagttcg tcaacaagaa ggggctgctg gggAACCGCA actgtgcgg	720
cggggctctt gccccccctt gcgcctgcag gacccctttt cgctatgcc tcaagcacta	780
ccagggcaggc gtgtcaccgg agccaccctg cacctacggc agtgcgtca cgccagtgt	840
gggtgtcgac tccttcagcc tgcctgatgg cgccaggatc gacccgcct tcagcaaccc	900
catccgattt cccttcggct tcacctggcc aggtacccctc tctctgtatca ttgaagccct	960
ccatacagac tctcccgatg acctcgcaac agaaaaccca gaaagactca tcagccgcct	1020
gaccacacag aggcacccatca ctgtggaga agaatggctt caggacccctt acagtagcgg	1080
ccgcacacagact ctccggactt cttaccgggtt tgtgtgtgac gagcactact acggagaagg	1140
ttgctctgtt ttctggcgtt ctcggatgtatgc cgcctttggc cacttcaccc gggggacag	1200
aggggagaag atgtgcgacc ctggctggaa aggccagttac tgactgacc caatctgtct	1260
gccagggtgtt gatgaccaac atggatactg tgacaaacca ggggagtgcgca agtgcagat	1320
tggctggcag gggcgtact gcgatgatgtt catccgatcc ccaggtgttc tccatggcac	1380
ctgccagcaa ccctggcagt gtaactgcca ggaaggctgg gggggccctt tctgcaacca	1440
agacactgaac tactgtactc accataagcc gtgcaggaat ggagccaccc gcaccaacac	1500
gggcacgggg agctacacat gttcctggcc acctgggtat acaggtgcca actgtgagct	1560
ggaagtagat gagtgtgtc ctagccctg caagaacggc gcgagctgca cggacccatgt	1620
ggacagcttc tcttgcaccc gcccctccgg ctttatggc aaggtctgtg agctgagcgc	1680
catgacccgtt gcagatggcc cttgcttcaa tggaggacga tggtcagata accctgacgg	1740

aggctacacc tgccattgcc cttgggctt ctctggcttc aactgtgaga agaagatgga	1800
tctctgcggc tcttcccctt gttctaacctg tgccaagtgt gtggacctcg gcaactctta	1860
cctgtgcggg tgcaggctg gtttctccgg gaggtactgc gaggacaatg tggatgactg	1920
tgcctcctcc ccgtgtgcaa atggggcac ctgcgggac agtgtgaacg acttctctg	1980
tacctgeccca cctggctaca cgggcaagaa ctgcagcgcc cctgtcagca ggtgtgagca	2040
tgcaccctgc cataatgggg ccacctgcca ccagagggc cagcgctaca tgtgtgagtg	2100
cgcccaggc tatggggcc ccaactgcca gtttctgctc cctgagccac caccaggcc	2160
catggtggtg gacctcagtg agaggcatat ggagagccag ggcggccct tccccctgggt	2220
ggccgtgtgt gccgggggtgg tgcttgcct cctgctgctg ctggctgtg ctgctgtgg	2280
gtctcgctc cgctgaagc tacagaaaca ccagcctca cctgaaccct gtggggaga	2340
gacagaaacc atgaacaacc tagccaattt ccagcgcgag aaggacgtt ctgttagcat	2400
cattgggct acccagatca agaacaccaa caagaaggcg gactttcacf gggaccatgg	2460
agccgagaag agcagctta aggtccgata cccactgtg gactataacc tcgttcgaga	2520
cctcaaggga gatgaagcca cggtcaggga tacacacagc aaacgtgaca ccaagtgcca	2580
gtcacagagc tctgcaggag aagagaagat cgcccaaca cttagggtg gggagattcc	2640
tgacagaaaa aggccagagt ctgtctactc tacttcaaag gacaccaagt accagtgg	2700
gtatgttctg tcitcagaaa aggtgatgtg tgttatagcg actgagggtgt aagatggaag	2760
cgtatggca aaattccat ttctctaaa taaaattcca aggtatagc cccatgaaat	2820
gctgctgaga gaggaaggga gagaaacc accggactgct gctgagaacc agttcaggc	2880
gaagctggtt ctctcagagt tagcagaggc gcccacact gccagcttag gcttggctg	2940
ccgttgact gcctgctggt tttccattt gcactatgga cagttgtttt gaagagtata	3000
tattaaatg gacgagtgac ttgattcata taggaagcac gcactgccc cacgtctatc	3060
ttggattact atgagccagt ctttccttga actagaaaca caactgcctt tattgtcctt	3120
tttgatactg agatgtgttt tttttttcc tagacggaa aaagaaaaacg tgtttat	3180
ttttgggatt tgaaaaata ttttcatga tatctgtaaa gcttgatgtat tttgtgacgt	3240
tcatttttt ataattttaa ttttgtaaa tatgtacaaa ggcacttcgg gtctatgtga	3300
ctatattttt ttgtatataa atgtatattt ggaatattgt gcaaatgtta tttgagttt	3360
ttactgtttt gttaatgaag aaattcattt taaaaatattt ttccaaaat aaatataatg	3420
aactacaaaa aaaaaaaaaaaa aaaa	3444

<210> 6

<211> 722

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Met Gly Arg Arg Ser Ala Leu Ala Leu Ala Val Val Ser Ala Leu Leu

1 5 10 15

Cys Gln Val Trp Ser Ser Gly Val Phe Glu Leu Lys Leu Gln Glu Phe

20 25 30

Val Asn Lys Lys Gly Leu Leu Gly Asn Arg Asn Cys Cys Arg Gly Gly

35 40 45

Ser Gly Pro Pro Cys Ala Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys

50 55 60

His Tyr Gln Ala Ser Val Ser Pro Glu Pro Pro Cys Thr Tyr Gly Ser

65 70 75 80

Ala Val Thr Pro Val Leu Gly Val Asp Ser Phe Ser Leu Pro Asp Gly

85 90 95

Ala Gly Ile Asp Pro Ala Phe Ser Asn Pro Ile Arg Phe Pro Phe Gly

100 105 110

Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Leu His Thr

115 120 125

Asp Ser Pro Asp Asp Leu Ala Thr Glu Asn Pro Glu Arg Leu Ile Ser

130 135 140

Arg Leu Thr Thr Gln Arg His Leu Thr Val Gly Glu Glu Trp Ser Gln

145 150 155 160

Asp Leu His Ser Ser Gly Arg Thr Asp Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Phe

165 170 175

Val Cys Asp Glu His Tyr Tyr Gly Glu Gly Cys Ser Val Phe Cys Arg

180 185 190

Pro Arg Asp Asp Ala Phe Gly His Phe Thr Cys Gly Asp Arg Gly Glu

195 200 205

Lys Met Cys Asp Pro Gly Trp Lys Gly Gln Tyr Cys Thr Asp Pro Ile

210	215	220
Cys Leu Pro Gly Cys Asp Asp Gln His Gly Tyr Cys Asp Lys Pro Gly		
225	230	235
Glu Cys Lys Cys Arg Val Gly Trp Gln Gly Arg Tyr Cys Asp Glu Cys		
245	250	255
Ile Arg Tyr Pro Gly Cys Leu His Gly Thr Cys Gln Gln Pro Trp Gln		
260	265	270
Cys Asn Cys Gln Glu Gly Trp Gly Leu Phe Cys Asn Gln Asp Leu		
275	280	285
Asn Tyr Cys Thr His His Lys Pro Cys Arg Asn Gly Ala Thr Cys Thr		
290	295	300
Asn Thr Gly Gln Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys Arg Pro Gly Tyr Thr		
305	310	315
Gly Ala Asn Cys Glu Leu Glu Val Asp Glu Cys Ala Pro Ser Pro Cys		
325	330	335
Lys Asn Gly Ala Ser Cys Thr Asp Leu Glu Asp Ser Phe Ser Cys Thr		
340	345	350
Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Lys Val Cys Glu Leu Ser Ala Met Thr		
355	360	365
Cys Ala Asp Gly Pro Cys Phe Asn Gly Gly Arg Cys Ser Asp Asn Pro		
370	375	380
Asp Gly Gly Tyr Thr Cys His Cys Pro Leu Gly Phe Ser Gly Phe Asn		
385	390	395
Cys Glu Lys Lys Met Asp Leu Cys Gly Ser Ser Pro Cys Ser Asn Gly		
405	410	415
Ala Lys Cys Val Asp Leu Gly Asn Ser Tyr Leu Cys Arg Cys Gln Ala		
420	425	430
Gly Phe Ser Gly Arg Tyr Cys Glu Asp Asn Val Asp Asp Cys Ala Ser		
435	440	445
Ser Pro Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Arg Asp Ser Val Asn Asp Phe		
450	455	460
Ser Cys Thr Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Lys Asn Cys Ser Ala Pro		

465	470	475	480
Val Ser Arg Cys Glu His Ala Pro Cys His Asn Gly Ala Thr Cys His			
485	490	495	
Gln Arg Gly Gln Arg Tyr Met Cys Glu Cys Ala Gln Gly Tyr Gly Gly			
500	505	510	
Pro Asn Cys Gln Phe Leu Leu Pro Glu Pro Pro Gly Pro Met Val			
515	520	525	
Val Asp Leu Ser Glu Arg His Met Glu Ser Gln Gly Gly Pro Phe Pro			
530	535	540	
Trp Val Ala Val Cys Ala Gly Val Val Leu Val Leu Leu Leu Leu			
545	550	555	560
Gly Cys Ala Ala Val Val Cys Val Arg Leu Lys Leu Gln Lys His			
565	570	575	
Gln Pro Pro Pro Glu Pro Cys Gly Gly Glu Thr Glu Thr Met Asn Asn			
580	585	590	
Leu Ala Asn Cys Gln Arg Glu Lys Asp Val Ser Val Ser Ile Ile Gly			
595	600	605	
Ala Thr Gln Ile Lys Asn Thr Asn Lys Lys Ala Asp Phe His Gly Asp			
610	615	620	
His Gly Ala Glu Lys Ser Ser Phe Lys Val Arg Tyr Pro Thr Val Asp			
625	630	635	640
Tyr Asn Leu Val Arg Asp Leu Lys Gly Asp Glu Ala Thr Val Arg Asp			
645	650	655	
Thr His Ser Lys Arg Asp Thr Lys Cys Gln Ser Gln Ser Ser Ala Gly			
660	665	670	
Glu Glu Lys Ile Ala Pro Thr Leu Arg Gly Glu Ile Pro Asp Arg			
675	680	685	
Lys Arg Pro Glu Ser Val Tyr Ser Thr Ser Lys Asp Thr Lys Tyr Gln			
690	695	700	
Ser Val Tyr Val Leu Ser Ala Glu Lys Asp Glu Cys Val Ile Ala Thr			
705	710	715	720

Glu Val

<210> 7

<211> 3420

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

aggttcagt	agcggcgctg	cgcgcaggcc	ggaaacacga	ggccaagagc	cgcagcccc	60
gccgccttgg	tgcagcgtac	accggacta	gcccgttgc	agccccagga	ttagacagaa	120
gacgcgtcct	cggcgccgtc	gccgcggc	cgtagtcacc	tggattacct	acagcggcag	180
ctgcagcgga	gccagcgaga	aggccaaagg	ggagcagcgt	cccgagagga	gccccttt	240
tcagggaccc	cggcgctgg	cgacgcg	ggaaagcg	gtcgcaaca	gagccagatt	300
gaggccccgc	gggtggagag	agcgacgccc	gagggatgg	cggcagcgtc	ccggagcgcc	360
tctggctggg	cgtactgct	gctggtgca	cttggc	agcgccggc	cggctccggc	420
gtcttccagc	tgca	ggagttcatc	aacgagcgc	gcgtactggc	cagtggcgg	480
ccttgcgagc	cggctg	gacttcttc	cgcgtc	ttaagca	ccaggcgg	540
gtctcgcccg	gacc	ctcggacc	gtctccac	cggtattgg	caccaactcc	600
ttcgctgtcc	gggacgac	tagcggc	gggcgc	ctctca	gccctta	660
ttcacctggc	cggtac	ctcg	atcga	ggcac	aggagac	720
ctgcggccag	aggc	ttg	accagat	ca	ccat	780
ctagctgtgg	gtc	agaact	gttattgg	gagca	acca	840
tactttacc	gggt	catct	cagt	gaca	actat	900
aagaagc	atgacc	actt	cggcc	actat	gtgt	960
ctgcccgtt	ggact	ggg	atatt	gcca	cagat	1020
cagaatggct	actg	cagcaa	gccag	cag	gtc	1080
ctgtgtaacg	aatgc	atccc	ccaca	atggc	tgt	1140
caatgtactt	gtgat	gaggg	ctggggaggc	ctgtttgt	accaagat	1200
acccaccact	ccccat	gcaaa	aatggggca	acgt	gtcca	1260
acctgcac	gtcg	cccagg	ctacact	gtggact	gt	1320
gacagcaacc	cctgt	cgcaa	tggaggc	agtg	ggact	1380
ctgtgtctc	cgg	ctacta	tggc	ctgt	gacaca	1440
tccccctgct	tcaat	gggg	ctc	cgtt	gcca	1500

gaatgtcccc ccaacttcac cggttccaaac tgcgagaaga aagtggacag gtgcaccaggc	1560
aaccctgtg ccaacgggg acagtgcctg aaccgaggta caagcccat gtgccgtgc	1620
cgtctggat tcacggcac ctacttgaa ctccacgtca gcgactgtgc cgtaaccct	1680
tgcggccacg gtggacttg ccatgacgtg gagaatggc tcatgtgcac ctgcctgcc	1740
ggcttctgt gccgacgtg tgaggtgcgg acatccatcg atgcctgtgc ctgcgtccc	1800
tgcttcaaca gggccacgtg ctacaccgac ctctccacag acactttgt gtgcaactgc	1860
ccttatggct ttgtggcag ccgctgcgag ttccctgtgg gcttgccgccc cagttcccc	1920
tgggtggccg tctcgctggg tgtgggctg gcagtgcgtc tggtaactgct gggcatggtg	1980
gcagtggctg tgccgcagct gcccgttcga cggccggacg acggcagcag ggaagccatg	2040
aacaacttgt cgacttcca gaaggacaac ctgattctg ccgcggact taaaaacaca	2100
aaccagaaga agtagctgga agtggactgt ggcctggaca agtccaactg tggcaaacag	2160
caaaaccaca cattggacta taatctggcc ccagggcccc tgggggggg gaccatgcca	2220
ggaaagttc cccacagtga caagagctt ggagagaagg cgccactgct gttacacagt	2280
aaaaaggccag agtgcggat atcagcgata tgctcccca gggactccat gtaccagtct	2340
gtgtgtttga tatcagagga gaggaatgaa tgtgtcattt ccacggaggt ataaggcagg	2400
gccttacgt gacatccctg ctcagccccc cggctggacc ttccctctgc attgtttaca	2460
ttgcattctg gaatggacgt ttttcatatg caacgtgcgt ctctcaggag gaggaggaa	2520
tggcaggaac cgacagact gtgaacttgc caagagatgc aatacccttc cacaccttg	2580
ggtgtctgtc tggcatcaga ttggcagctg caccaaccag aggaacagaa gagaagagag	2640
atgcactgg gcaactgcct gccagtagtg gccttcagg ggctccccc gggctccgg	2700
cctttttcc agagagatgt gcagtagccc catggggccc ggagctgctg tggctccac	2760
tggcatccgt ttccaaaaa gtgccttgg cccaggctcc acggcgacag ttggcccaa	2820
atcagaaaagg agagaggggg ccaatgaggg cagggctcc tgtggctgg aaaaccactg	2880
ggtgctctc ttgtgggggt ttgccttggg ggtgaggta gtgtcgagg gaggggagtg	2940
ctttctgtccc catgcctcca actactgtat gcaggctgg ctctctggc tagcccttt	3000
ggcaagaat gtccgtctac ccggcttcca ccacccttg gccctggct tctgtaaagca	3060
gacaggcaga gggctgccc ctcccaccag ccaagggtgc cagggctaac tggggactc	3120
agggcagtgt ttggaaatt ccactgaggg ggaaatcagg tgctggccc gcctggccc	3180
tttccctccct caagcccatc tccacaacct cgagcctggg ctctggcca ctactgcccc	3240

agaccacct caaagctggc cttcagaaat caataatatg agtttttatt ttgtttttt 3300
 tttttttt gtatgttatt ttggagtcta gtattcaat aatthaagaa tcagaaggcac 3360
 tgaccccttct acatttata acattatgtt gtatataatg tgtatttata atatgaaaca 3420
 <210> 8
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

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

Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro Asp Gly Asn Leu Ser Cys
 195 200 205
 Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln Gln Pro Ile Cys Leu Ser
 210 215 220
 Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Ala Glu Cys Leu
 225 230 235 240
 Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro His

 245 250 255
 Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr Pro Trp Gln Cys Thr Cys
 260 265 270
 Asp Glu Gly Trp Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr Cys
 275 280 285
 Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys Ser Asn Ser Gly
 290 295 300
 Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Val Asp
 305 310 315 320

 Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly
 325 330 335
 Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr His Cys Leu Cys Pro Pro
 340 345 350
 Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser Thr Leu Ser Cys Ala Asp
 355 360 365
 Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly Ala
 370 375 380
 Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe Thr Gly Ser Asn Cys Glu

 385 390 395 400
 Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gln
 405 410 415
 Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys Arg Cys Arg Pro Gly Phe
 420 425 430
 Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser Asp Cys Ala Arg Asn Pro
 435 440 445

Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Leu Met Cys

450 455 460

Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Thr Ser

465 470 475 480

Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Asn Arg Ala Thr Cys Tyr

485 490 495

Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly Phe

500 505 510

Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe Pro

515 520 525

Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Ala Val Leu Leu Val Leu

530 535 540

Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg Pro

545 550 555 560

Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln Lys

565 570 575

Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys Lys

580 585 590

Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys Gln

595 600 605

Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Arg

610 615 620

Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly Glu

625 630 635 640

Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile Ser

645 650 655

Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu Ile

660 665 670

Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val

675 680 685

<210> 9

<211> 3451

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 9

atataagaaa ggctctggag caagcagggt tca gtagccg cgctgcgc aggctaggaa	60
cccgaggcca agagctgcag ccaaagtac ttgggtcag tgtactccct cactagcccg	120
ctcgagaccc taggattgc tccaggacac gtacttagag cagccaccgc ccagtgc(cc	180
tcacctggat tacctaccga ggc atcgac agcggagtt ttgagaaggc gacaaggag	240
cagcgtcccg agggaatca gctttcagg aactcggctg gcagacggga ctgcggag	300
agc acatcc taaacaagca gattcggagt cccggagttt agaggacacc ccaaggatg	360
acgcctgcgt cccggagcgc ctgtcgtgg ggc gta ctgc tgctggcggt actgtggccg	420
cagcagcgcg ctgcgggctc cggcatcttc cagctgcggc tg caggagtt cgtcaaccag	480
cgcgttatgc tggccatgg gca gtcctgc gaaccggct gccc gactt cttccgc atc	540
tgccttaagc acttccaggc aac ttctcc gagggaccct gcac ctgg caatgtctcc	600
acgcggat tggcacca ctcctcgac gtcaggaca aga atagcgg cagtgg tcgc	660
aaccctctgc agttgccctt caatttacc tggccggaa cttctact caacatccaa	720
gcttggcaca caccggaga cgacctgcgg ccagagactt cggcaggaaa ctctctcatc	780
agccaaatca tcatccaagg ctctttgt gtggtaaga ttggcgaac agacgagcaa	840
aatgacaccc tc accagact gagctactt taccggta tctgcagtga caactactat	900
ggagagagct gttctcgct atgcaagaag cgc gatgacc acttcggaca ttatgagtgc	960
cagccagatg gcagcctgtc ctgcctgcgg ggctggactg ggaagtactg tgaccagcct	1020
atatgtctt ctggctgtca tg agcagaat ggtactgca gca agccaga tg agtgc atc	1080
tgccgtccag gtggcaggg tgcctgtc aatgaatgta tccccacaa tggctgtcgt	1140
catggcacct gcagcatccc ctggcagtgt gcctgcgatg agggatggg aggtctgttt	1200
tgtgaccaag atctcaacta ctgtactcac cactctccgt gcaagaatgg atcaacgtgt	1260
tccaaacagtg gccaaagggttataacctgc acctgtctcc caggctacac tggtgagcac	1320
tgtgagctgg gactcagcaa gtgtgccagc aaccctgtc gaaatggtg cagctgtaa	1380
gaccaggaga atagctacca ctgcctgtgt ccccccaggct actatggcca gcactgtgag	1440
catagtacctt tgacctgcgc ggactcaccc tgctcaatg gggctcttg ccggagcgc	1500
aaccagggtt ccagttatgc ctgcgaatgc cccccaact ttaccggctc taactgtgag	1560
aagaaagtag acaggtgtac cagcaacccg tggccaaatg gaggccagtg ccagaacaga	1620

<210> 10

<211> 686

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Met Thr Pro Ala Ser Arg Ser Ala Cys Arg Trp Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ala Val Leu Trp Pro Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Ile Phe Gln

20 25 30

Leu Arg Leu Gln Glu Phe Val Asn Gln Arg Gly Met Leu Ala Asn Gly

35 40 45

Gln Ser Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Ile Cys Leu Lys

50 55 60

His Phe Gln Ala Thr Phe Ser Glu Gly Pro Cys Thr Phe Gly Asn Val

65 70 75 80

Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Val Val Arg Asp Lys Asn

85 90 95

Ser Gly Ser Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp

100 105 110

Pro Gly Thr Phe Ser Leu Asn Ile Gln Ala Trp His Thr Pro Gly Asp

115 120 125

Asp Leu Arg Pro Glu Thr Ser Pro Gly Asn Ser Leu Ile Ser Gln Ile

130 135 140

Ile Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Lys Ile Trp Arg Thr Asp Glu

145 150 155 160

Gln Asn Asp Thr Leu Thr Arg Leu Ser Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys

165 170 175

Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Glu Ser Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg

180 185 190

Asp Asp His Phe Gly His Tyr Glu Cys Gln Pro Asp Gly Ser Leu Ser

195 200 205

Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Lys Tyr Cys Asp Gln Pro Ile Cys Leu

210	215	220
Ser Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Asp Glu Cys		
225	230	235
Ile Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro		
245	250	255
His Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Ile Pro Trp Gln Cys Ala		
260	265	270
Cys Asp Glu Gly Trp Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr		
275	280	285
Cys Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ser Thr Cys Ser Asn Ser		
290	295	300
Gly Pro Lys Gly Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Pro Gly Tyr Thr Gly Glu		
305	310	315
His Cys Glu Leu Gly Leu Ser Lys Cys Ala Ser Asn Pro Cys Arg Asn		
325	330	335
Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asn Ser Tyr His Cys Leu Cys Pro		
340	345	350
Pro Gly Tyr Tyr Gly Gln His Cys Glu His Ser Thr Leu Thr Cys Ala		
355	360	365
Asp Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly		
370	375	380
Ser Ser Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe Thr Gly Ser Asn Cys		
385	390	395
Glu Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly		
405	410	415
Gln Cys Gln Asn Arg Gly Pro Ser Arg Thr Cys Arg Cys Arg Pro Gly		
420	425	430
Phe Thr Gly Thr His Cys Glu Leu His Ile Ser Asp Cys Ala Arg Ser		
435	440	445
Pro Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Pro Val		
450	455	460

Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Ile
 465 470 475 480
 Thr His Asp Ala Cys Ala Ser Gly Pro Cys Phe Asn Gly Ala Thr Cys
 485 490 495
 Tyr Thr Gly Leu Ser Pro Asn Asn Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly
 500 505 510
 Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe
 515 520 525
 Pro Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Val Val Leu Leu Val
 530 535 540
 Leu Leu Val Met Val Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg
 545 550 555 560
 Pro Asp Asp Glu Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln
 565 570 575
 Lys Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys
 580 585 590
 Lys Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys
 595 600 605
 Leu Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Leu Leu Gly
 610 615 620
 Arg Gly Gly Met Pro Gly Lys Tyr Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly
 625 630 635 640
 Glu Lys Val Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile
 645 650 655
 Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu
 660 665 670
 Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
 675 680 685
 <210> 11
 <211> 2977
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11

agctgggta aggagtcaa ggcagcgc acacccggg gctctcgca acccgaccgc	60
ctgtccgctc ccccacttcc cgccctccct cccacctact cattcaccca cccacccacc	120
cagagccggg acggcagccc aggcgcccgg gccccccgt ctccctcgccg cgatccctgga	180
cttccttgc ctgcaggacc cggcttccac gtgtgtcccg gagccggcgt ctcagcacac	240
gctccgctcc gggctgggt gcctacagca gccagagcag cagggagtcc gggacccggg	300
cgcatctgg gccaagttag ggcggccga ggccagcgt gaacgtctcc agggccggag	360
gagccgcggg gcgtccgggt ctgagccga gcaaattggc tccgacgtgc gggacctgaa	420
cgcgcgtcg cccgcgtcc cttccctggg tggcggcgc ggctgtgcc tcgcgttgag	480
cggcgcggcg cagtggcgc cggtgctgga ctttgcgc ccgggcgtt cggcttacgg	540
gtcggtggc gccccggcgc cgcacccggc tccgcgcaca ccccgccgc cgccgcctca	600
ctccttcatc aaacaggagc cgagctgggg cggcgcggag ccgcacgagg agcagtgcct	660
gagcgccttc actgtccact ttccggcca gttcaactggc acagccggag cctgtcgcta	720
cggcccttc ggtccctc cgcgcggcc ggcgtcatcc ggccaggcca ggtatgttcc	780
taacgcgcac tacctgccc gtcgcctcga gagccagccc gctattgc atcagggtta	840
cagcacggtc accttcgacg ggacgcccag ctacggtcac acgcctcgc accatgcggc	900
gcagttcccc aaccactcat tcaagcatga ggatccatg ggccagcagg gtcgctggg	960
tgagcagcag tactcggtgc cgcccccgt ctatggctgc cacacccca cgcacagctg	1020
cacccgcgc caggcttgc tgctgaggac gcccatacgc agtacaatt tataccaaat	1080
gacatcccag ctigaatgca tgacctggaa tcagatgaac ttaggagcca ccttaaagg	1140
ccacagcaca ggtacgaga gcataacca cacaacgcac atcctctgcg gagccaaata	1200
cagaatacac acgcacgggt tttcagagg cattcaggat gtgcgcgtg tgcctggagt	1260
agcccccact ctgtacggt cggcatctga gaccagttag aaacgcctt tcatgtgtgc	1320
ttacccaggc tgcataaga gatatttaa gctgtccac ttacagatgc acaggaggaa	1380
gcacactggt gagaaccat accagtgtga cttcaaggac tgtgaacgaa ggtttctcg	1440
ttcagaccag ctaaaagac accaaaggag acatacagggt gtgaaaccat tccagtgtaa	1500
aacttgtcag cggaaaggat cccgtccga ccacctgaag acccacacca ggactcatac	1560
aggtgaaaag cccttcagct gtcggtgcc aagtgtcag aaaaaggttt cccgtcaga	1620
tgaattagtc cgcacatcaca acatgcata gagaacatg accaaactcc agctggcgt	1680
ttgaggggtc tccctcgcccc accgttcagt gtcccgaggca gcacagtgtg tgaactgttt	1740
tcaagtcgtca ctctccactc ctctcacta aaaaggaaac ttcaatgtat cttttcatc	1800

caacttccaa gacaagatac cggtgcttct ggaaactacc aggtgtgcct ggaagagtgg	1860
gtctctgccc tgcctacttt tagttgactc acaggccctg gagaagcagc taacaatgtc	1920
tggtagtta aaagccatt gccatttgtt gtggatttc tactgttaaga agagccatag	1980
ctgatcatgt cccccgtacc ctcccttct tttttatgc tcgtttcg tgggatgga	2040

attattgtac catttctat catgaaat ttataggcca gggcatgtgt atgtgtctgc	2100
taatgtaaac ttgtcatgg ttccatata ctaacagcaa cagcaagaaa taaatcagag	2160
agcaaggcat cgggggtgaa tcttgtctaa cattcccgag gtcagccagg ctgctaacct	2220
ggaaagcagg atgttagttct gccaggcaac ttttaaagct catgcatttc aagcagctga	2280
agaaaaaatc agaactaacc agtaccttg tatagaaatc taaaagaatt ttaccattca	2340
gttaattcaa tgtgaacact ggcacactgc tcttaagaaa ctatgaagat ctgagattt	2400
tttgtgtatg ttttgactc ttttgagtgg taatcatatg tgtctttata gatgtacata	2460

cctccttgca caaatggagg ggaattcatt ttcatcactg ggagtgtcct tagtgtataa	2520
aaaccatgct ggtatatggc ttcaagttgt aaaaatgaaa gtgactttaa aagaaaatag	2580
gggatggtcc aggatctcca ctgataagac tgtttttaag taacttaagg accttgggt	2640
ctacaagtat atgtgaaaaa aatgagactt actgggtgag gaaatccatt gtttaagat	2700
ggtcgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtg tggtgtgtt tggttttaa	2760
gggagggaaat ttattattta ccgttgcttg aaattactgt gtaaatatat gtctgataat	2820
gattgtctt ttgacaacta aaattaggac tgtataagta ctagatgcat cactgggtgt	2880

tgatcttaca agatattgtat gataacactt aaaattgtaa cctgcatttt tcactttgct	2940
ctcaattaaa gtctattcaa aaggaaaaaa aaaaaaaa	2977

<210> 12

<211> 497

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Gln Asp Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu Pro Ala Ser Gln His

1 5 10 15

Thr Leu Arg Ser Gly Pro Gly Cys Leu Gln Gln Pro Glu Gln Gly

20 25 30

Val Arg Asp Pro Gly Gly Ile Trp Ala Lys Leu Gly Ala Ala Glu Ala

Ser Ala Glu Arg Leu Gln Gly Arg Arg Ser Arg Gly Ala Ser Gly Ser
 50 55 60
 Glu Pro Gln Gln Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu
 65 70 75 80
 Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val
 85 90 95
 Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly
 100 105 110

 Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Ala Pro
 115 120 125
 Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro
 130 135 140
 Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe
 145 150 155 160
 Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg
 165 170 175
 Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln

 180 185 190
 Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser
 195 200 205
 Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly
 210 215 220
 Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro
 225 230 235 240
 Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu
 245 250 255

 Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr
 260 265 270
 Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Arg Thr Pro
 275 280 285
 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met
 290 295 300

Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly His Ser Thr
 305 310 315 320
 Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln
 325 330 335
 Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg
 340 345 350
 Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr
 355 360 365
 Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg
 370 375 380
 Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly
 385 390 395 400
 Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser
 405 410 415
 Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys
 420 425 430
 Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His
 435 440 445
 Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 450 455 460
 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 465 470 475 480
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
 485 490 495
 Leu
 <210> 13
 <211> 3028
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 agctgggtta aggagttcaa ggcagcgccc acacccgggg gctctccgca acccgaccgc 60
 ctgtccgctc cccccacttcc cgcctccct cccacctact cattcaccca cccacccacc 120

cagagccggg acggcagccc aggcgcccc gccccccgt ctccctcgccg cgatcctgga	180
cttcctcttg ctgcaggacc cggcttccac gtgtgtcccg gagccggcgt ctcagcacac	240
gctccgctcc gggcctgggt gcctacagca gccagagcag cagggagtcc gggaccggg	300
cggcatctgg gccaagttag ggcgcgcga ggccagcgt gaacgtctcc agggccggag	360
gagccgcggg gcggtccgggt ctgagccga gcaaattggc tccgacgtgc gggacctgaa	420
cgcgctgctg cccgcgtcc ctcctcggg tggcggcgc ggctgtgcc tgcctgtgag	480
cggcgcggc cagtgggcgc cggtgctgga ctttgcgcc ccgggcgtt cggcttacgg	540
gtcggtggc gccccgcgc cgccaccggc tccgcgcaca ccccccgcgc cgccgcctca	600
ctccticatc aaacaggagc cgagctgggg cggcgcggag ccgcacgagg agcagtgct	660
gagcgccttc actgtccact ttccggca gttcaactggc acagccggag cctgtcgcta	720
cggggcccttc ggtccctctc cgcccagcca ggcgtcatcc ggccaggcca ggatgtttcc	780
taacgcgcac tacctgcaca gtcgcctcga gagccagccc gctattcgca atcagggtta	840
cagcacggc accttcgacg ggacgcccag ctacggtcac acgcctcgc accatgcggc	900
gcagttcccc aaccactcat tcaagcatga ggatccatg ggccagcagg gctcgctggg	960
tgagcagcag tactcggtgc cgcccccgt ctatggctgc cacacccca ccgacagctg	1020
caccggcagc caggcttgc tgctgaggac gccctacagc agtgacaatt tataccaaat	1080
gacatcccag ctigaatgca tgacctggaa tcagatgaac ttaggagcca ccttaaagg	1140
agttgctgct gggagctcca gtcagtgaa atggacagaa gggcagagca accacagcac	1200
agggtacgag agcgataacc acacaacgca catcctctgc ggagccaaat acagaataca	1260
cacgcacggt gtcttcagag gcattcagga tgtgcacgt gtgcctggag tagccccac	1320
tcttgtacgg tcggcatctg agaccagtga gaaacgcccc ttcatgtgt cttacccagg	1380
ctgcaataag agatattta agctgtccca cttacagatg cacagcagga agcacactgg	1440
tgagaaacca taccagtgtg acttcaagga ctgtgaacga aggtttctc gttcagacca	1500
gctcaaaaga caccaaaagga gacatacagg tgtgaaacca ttccagtgtta aaacttgtca	1560
gcgaaagtcc tcccggtccg accacctgaa gacccacacc aggactcata caggtaaaa	1620
gcccttcagc tgcgggtggc caagttgtca gaaaaagtt gccgggtcag atgaattagt	1680
ccgccccatcac aacatgcata agagaaaacat gaccaaaactc cagctggcgc tttgaggggt	1740
ctccctcggtt gaccgttcag tgtcccgac agcagacgt gtgaactgt ttcaagtctg	1800
actctccact cctctctact aaaaaggaaa cttcagttga tcttcttcat ccaacttcca	1860

agacaagata ccggtgcttc tgaaaactac caggtgtgcc tgaaagagtt ggtctctgcc 1920

ctgcctactt ttagttgact cacaggccct ggagaagcag ctaacaatgt ctggtagtt 1980
 aaaagcccat tgccatttgg tgtggatttt ctactgtaa aagagccata gctgatcatg 2040
 tccccctgac cttcccttc ttttttagt ctgtttcg ctggggatgg aattattgtaa 2100
 ccattttcta tcatggaata ttataggcc agggcatgtg tatgtgtctg ctaatgtaaa 2160
 ctttgtcatg gttccattt actaacagca acagcaagaa ataaatcaga gagcaaggca 2220
 tcgggggtga atttgtcta acattccgaa ggtcagccag gctgctaacc tgaaagcag 2280
 gatgttagttc tgccaggcaa cttaaagc tcatgcattt caagcagctg aaaaaaaat 2340

cagaactaac cagtacctt gtatagaaat ctaaaagaat ttaccattc agttaattca 2400
 atgtgaacac tggcacactg ctcttaagaa actatgaaga tctgagattt ttttgttat 2460
 gttttgact ctttgagtg gtaatcatat gtgttttat agatgtacat acctccttgc 2520
 acaaatggag gggattcat tttcatact gggagtgtcc ttagtgtata aaaaccatgc 2580
 tggatatgg ctcaagttt gaaaaatgaa agtacttta aaagaaaaata gggatggtc 2640
 caggatctcc actgataaga ctgttttaa gtaacttaag gacccccc tctacaagta 2700
 tatgtgaaaa aaatgagact tactgggtga ggaaatccat tgtaaaga tggtcggtg 2760

tgtgtgtgtg tgggtgtgtg tgggtgtttt gtgtgtgtt ttgttttttta agggaggaa 2820
 tttttttttt accgttgctt gaaattactg tgtaaatata tgtctgataa tgatttgctc 2880
 tttgacaact aaaatttagga ctgtataagt actagatgca tcaactgggtg ttgatcttac 2940
 aagatattga tgataacact taaaattgta acctgcattt ttcaacttgc tctcaattaa 3000
 agtctattca aaaggaaaaaa aaaaaaaaaa 3028

<210> 14

<211> 514

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Gln Asp Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu Pro Ala Ser Gln His

1 5 10 15

Thr Leu Arg Ser Gly Pro Gly Cys Leu Gln Gln Pro Glu Gln Gln Gly

20 25 30

Val Arg Asp Pro Gly Gly Ile Trp Ala Lys Leu Gly Ala Ala Glu Ala

35 40 45

Ser Ala Glu Arg Leu Gln Gly Arg Arg Ser Arg Gly Ala Ser Gly Ser

50 55 60

Glu Pro Gln Gln Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu

65 70 75 80

Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val

85 90 95

Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly

100 105 110

Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro

115 120 125

Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro

130 135 140

Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe

145 150 155 160

Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg

165 170 175

Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln

180 185 190

Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser

195 200 205

Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly

210 215 220

Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro

225 230 235 240

Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu

245 250 255

Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr

260 265 270

Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Arg Thr Pro

275 280 285

Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met

290	295	300
Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala		
305	310	315
Gly Ser Ser Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser		
325	330	335
Thr Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala		
340	345	350
Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val		
355	360	365
Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu		
370	375	380
Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys		
385	390	395
Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr		
405	410	415
Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe		
420	425	430
Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val		
435	440	445
Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp		
450	455	460
His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser		
465	470	475
Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu		
485	490	495
Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu		
500	505	510

Ala Leu

<210> 15

<211> 3037

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

agctgggta aggagtcaa ggcagcgc acacccggg gctctcgca acccgaccgc	60
ctgtccgctc ccccacttcc cgcctccct cccacctact cattcaccca cccacccacc	120
cagagccggg acggcagccc aggcgcccgg gccccccgt ctccctcgccg cgatccctgga	180
cttccttgc ctgcaggacc cggcttccac gtgtgtcccg gagccggcgt ctcagcacac	240
gctccgctcc gggctgggt gcctacagca gccagaggcag cagggagtcc gggacccggg	300
cgccatctgg gccaagttag ggcggccga ggccagcgct gaacgtctcc agggccggag	360
gagccgcggg gcgtccgggt ctgagccga gcaaattggc tccgacgtgc gggacctgaa	420
cgcgcgtcg cccgcgtcc cttccctggg tggcggcgc ggctgtgcc tcgcgttgag	480
cggcgcggcg cagtggcgc cggtgctgga ctttgcgc ccgggcgtt cggcttacgg	540
gtcggtggc gccccggcgc cgcacccggc tccgcgcaca ccccgccgc cgccgcctca	600
ctccttcatc aaacaggagc cgagctgggg cggcgcggag ccgcacgagg agcagtgcct	660
gagcgccttc actgtccact ttccggcca gttcaactggc acagccggag cctgtcgcta	720
cggcccttc ggtccctc cgcgcggcc ggcgtcatcc ggccaggcca ggtatgttcc	780
taacgcgcac tacctgccc gtcgcctcga gagccagccc gctattcgca atcagggtta	840
cagcacggtc accttcgacg ggacgcccag ctacggtcac acgcctcgc accatgcggc	900
gcagttcccc aaccactcat tcaagcatga ggatcccatg ggccagcagg gtcgcgtggg	960
tgagcagcag tactcggtgc cgcggccgt ctatggctgc cacacccca cgcacagctg	1020
cacccggcgc caggcttgc tgctgaggac gcccatacgc agtgcacatt tataccaaat	1080
gacatcccag ctgtaatgc tgcacctggaa tcagatgaac ttaggagcca ccttaaagg	1140
agttgctgct gggagctcca gtcagtgaa atggacagaa gggcagagca accacagcac	1200
agggtacgag agcgataacc acacaacgcc catcctctgc ggagcccaat acagaataca	1260
cacgcacgggt gtcgttcagag gcattcagga tgtgcgacgt gtgcctggag tagccccgac	1320
tcttgtacgg tcggcatctg agaccagtga gaaacgc cttcatgtgt cttacccagg	1380
ctgcaataag agatattta agctgtccca cttacagatg cacagcagga agcacactgg	1440
tgagaaacca taccagtgtg acttcaagga ctgtgaacga aggtttctc gttcagacca	1500
gctcaaaaaga caccaaaagga gacatacagg tgtgaaacca ttccagtgtaa aacttgtca	1560
gcgaaaagttc tcccggtccg accacctgaa gacccacacc aggactcata caggtaaaac	1620
aagtgaaaag cccttcagct gtcgggtggcc aagtgtcag aaaaagtttgc cccggcgtcaga	1680
tgaatttagtc cgcctacaca acatgcacca gagaacatg accaaactcc agctggcgt	1740
ttgaggggtc tccctcgccgg accgttcagt gtcccgaggca gcacagtgtg tgaactgctt	1800

tcaagtctga ctctccactc ctcctcacta aaaaggaaac ttcatgtat cttcttcata	1860
caacttccaa gacaagatac cggtgcttct ggaaactacc aggtgtgcct ggaagagtgg	1920
gtctctgccc tgccctactt tagttgactc acaggccctg gagaagcagc taacaatgtc	1980
tggttagtta aaagccattt gccatttgtt gtggatttc tactgttaaga agagccatag	2040

ctgatcatgt cccctgacc cttcccttct ttttatgc tcgtttcgcc tgggatgga	2100
attattgtac catttctat catgaaatat ttataggcca gggcatgtgt atgtgtctgc	2160
taatgtaaac ttgtcatgg ttccatata ctaacagcaa cagcaagaaa taaatcagag	2220
agcaaggcat cgggggtgaa tcttgtctaa cattcccgag gtcatgccagg ctgctaacct	2280
gaaagcagg atgttgtct gccaggcaac tttaaagct caigcatttc aagcagctga	2340
agaaaaaaatc agaactaacc agtacctctg tatagaaatc taaaagaattt ttaccattca	2400
gttaattcaa tgtgaacact ggcacactgc tcttaagaaa ctatgaagat ctgagat	2460

tttgtgtatg ttttgactc ttttgagtgg taatcatatg tgtcttata gatgtacata	2520
cctccttgca caaatggagg ggaattcatt ttcatactg ggagtgtcct tagtgtataa	2580
aaaccatgct ggtatatggc ttcaagttgt aaaaatgaaa gtgactttaa aagaaaaatag	2640
gggatggtcc aggatctcca ctgataagac tgtttttaag taacttaagg accttgggt	2700
ctacaagttat atgtgaaaaa aatgagactt actgggtgag gaaatccatt gtttaagat	2760
ggtcgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtg tggtgtgtt tggtgttt tggttttaa	2820
gggagggaaat ttattatata ccgttgcttg aaattactgt gtaaatatat gtctgataat	2880

gatttgctct ttgacaacta aaattaggac tgtataagta ctagatgcat cactgggtgt	2940
tgatcttaca agatattgtat gataacactt aaaattgtaa cctgcatttt tcactttgct	3000
ctcaattaaa gtctattcaa aaggaaaaaa aaaaaaaaaaaaa	3037

<210> 16

<211> 517

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Gln Asp Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu Pro Ala Ser Gln His

1 5 10 15

Thr Leu Arg Ser Gly Pro Gly Cys Leu Gln Gln Pro Glu Gln Gln Gly

20 25 30

Val Arg Asp Pro Gly Gly Ile Trp Ala Lys Leu Gly Ala Ala Glu Ala

35 40 45

Ser Ala Glu Arg Leu Gln Gly Arg Arg Ser Arg Gly Ala Ser Gly Ser

50 55 60

Glu Pro Gln Gln Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu

65 70 75 80

Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val

85 90 95

Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly

100 105 110

Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro

115 120 125

Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro

130 135 140

Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe

145 150 155 160

Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg

165 170 175

Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln

180 185 190

Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser

195 200 205

Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly

210 215 220

Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro

225 230 235 240

Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu

245 250 255

Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr

260 265 270

Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Arg Thr Pro

275 280 285

Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met

290	295	300	
Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala			
305	310	315	320
Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser			
325	330	335	
Thr Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala			
340	345	350	
Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val			
355	360	365	
Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu			
370	375	380	
Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys			
385	390	395	400
Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr			
405	410	415	
Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe			
420	425	430	
Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val			
435	440	445	
Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp			
450	455	460	
His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys			
465	470	475	480
Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser			
485	490	495	
Asp Glu Leu Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys			
500	505	510	
Leu Gln Leu Ala Leu			
515			
<210> 17			
<211> 2438			
<212> DNA			

<213> Homo sapiens

<400> 17

aggcgcttc accactgccc ctccgggg gacctaagg agagggttg aggccgtct 60

ttgcccggcgg aggtctgcgt gtccggctcg ggaggaggcc taggagggtct cgccggccac 120

ggcatcctt gggccggagt tctgggtgc ggacggacgt ctggagatg ggtggcgca 180

ctcgggaccc acggccctcg cggggcacgg acagttgcgg agcagggtct tgaggattgt 240

gcagtgcctt gggccctgc ctactcctgg gctcaggaat ggagaagggt tacagcacgg 300

tcaccattcga cgggacgccc agctacggc acacgcctc gcaccatgcg ggcgacttcc 360

ccaaccactc atcaagcat gaggatccca tggccagca gggctcgctg ggtgagcagc 420

agtactcggt gccggccccg gtctatggct gccacacccc caccgacagc tgccacggca 480

gccaggctt gctgctgagg acgcctaca gcagtgacaa ttataccaa atgacatccc 540

agcttaatg catgacctgg aatcagatga acttaggagc cacattaaag ggccacagca 600

cagggtaacg gagcataac cacacaacgc ccattctcg cggagccaa tacagaatac 660

acacgcacgg tgtttcaga ggcattcagg atgtgcacg tgtgcctgga gtggcccgaa 720

ctcttgtacg gtcggcatct gagaccatgt agaaacgccc ctcatgtgt gcttacccag 780

gctgcaataa gagatatttt aagctgtccc acttacagat gcacagcagg aagcacactg 840

gtgagaaacc ataccatgt gacttcaagg actgtgaacg aaggtttct cgttcagacc 900

agctcaaaag acaccaaagg agacatacag gtgtgaaacc attccagtgt aaaacttgc 960

agcgaaagtt ctccgggtcc gaccacctga agacccacac caggactcat acagtaaaa 1020

caagtaaaa gcccctcagc tgtcggtggc caagttgtca gaaaaagttt gcccggcag 1080

atgaattatgt ccgcacatcac aacatgcac agagaaacat gacaaactc cagtcggcgc 1140

tttgggggt ctccctcggg gaccgttcag tgtccagac agcacatgt gtgaactgct 1200

ttcaagtctg actctccact cctcctcact aaaaaggaaa cttagttga tcttcttcat 1260

ccaacttcca agacaagata ccgtgtctc tggaaactac caggtgtgcc tggaaagat 1320

ggctctgcc ctgcctactt ttagttgact cacaggccct ggagaagcag ctaacaatgt 1380

ctggtagtt aaagcccat tgccatttg tggatgtt ctactgtaa aagagccata 1440

gctgatcatg tccccctgac cttcccttc tttttatg ctgtttcg ctggggatgg 1500

aattattgtt ccattttctt tcatgaaata ttataggcc agggcatgtg tatgtgtctg 1560

ctaataatgtaaa ctgtgtcatg gttccattt actaacagca acagcaagaa ataataatcaga 1620

gagcaaggca tcgggggtga atcttgtcta acattccga ggtcagccag gctgctaacc 1680

tgaaaaaggcag gatgttagttc tgccaggcaa ctttaaagc tcatgcattt caagcagctg 1740

aagaaaaaat cagaactaac cagtacctct gtatagaaat ctaaaagaat tttaccattc 1800
 agttaattca atgtgaacac tggcacactg ctcttaagaa actatgaaga tctgagattt 1860
 ttttgttat gttttgact ctttgagtg gtaatcatat gtgtctttat agatgtacat 1920
 acctccttgc acaaattggag gggattcat tttcatcaact gggagtgcc ttatgtata 1980
 aaaaccatgc tggatatgg cttcaagttg taaaatgaa agtacttta aaagaaaata 2040
 gggatggtc caggatctcc actgataaga ctgttttaa gtaacttaag gaccttggg 2100
 tctacaagta tatgtgaaaa aaatgagact tactgggtga ggaaatccat ttttaaaga 2160

tggtcgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtttt gtgttgtt ttgtttttta 2220
 agggaggaa ttattttt accgttgctt gaaattactg tgaaatata tgtctgataa 2280
 tgatttgctc ttgacaact aaaatttagga ctgtataagt actagatgca tcactggtg 2340
 ttgatcttac aagatattga tgataacact taaaattgta acctgcattt ttcactttgc 2400
 tctcaattaa agtctattca aaaggaaaaaa aaaaaaaaa 2438

<210> 18

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Glu Lys Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr

1 5 10 15

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe

20 25 30

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln

35 40 45

Tyr Ser Val Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser

50 55 60

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp

65 70 75 80

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln

85 90 95

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly His Ser Thr Gly Tyr Glu Ser

100	105	110
Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile His		
115	120	125
Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro Gly		
130	135	140
Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg		
145	150	155
Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu		
165	170	175
Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr		
180	185	190
Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Gln		
195	200	205
Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys		
210	215	220
Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr His		
225	230	235
Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg		
245	250	255
Trp Pro Ser Cys Gln Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg		
260	265	270
His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu		
275	280	285
<210> 19		
<211> 2480		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 19		

aggcgcttc accactgccc ctccgggg gacctaagg agagggttg aggccgtct	60
ttgcccgcg aggtctgcgt gtccggctg ggaggaggcc taggagggtc cgccggcac	120
ggccatcctt gggcccgagt tctgggtgc ggacggacgt ctcgagagt ggtgccgcga	180
ctcgggaccc acggccctcg ccggcacgg acagttgcgg agcagggtc tgaggattgt	240

gcagtgcctt gggccctgc ctactcctgg gctcaggaat ggagaagggt tacagcacgg	300
tcaccccgca cgggacgccc agctacggtc acacgcctc gcaccatgct gcgcagttcc	360
ccaaccactc attcaagcat gaggatccca tgggccagca gggctcgctg ggtgagcagc	420
agtactcggt gccgcggcccg gtctatggct gccacacccc caccgacagc tgccggca	480
gccaggctt gctgctgagg acgcctaca gcagtgacaa ttataccaa atgacatccc	540
agcttgaatg catgacctgg aatcagatga acttaggagc cacctaaag ggagttgctg	600
ctgggagctc cagctcagtg aaatggacag aaggcagag caaccacagc acaggtaacg	660
agagcgataa ccacacaacg cccatcctc gcggagccca atacagaata cacacgcacg	720
gtgtcttcag aggattcag gatgtgcac gtgtcctgg agtagccccg actcttgtac	780
gttcggcatc tgagaccagt gagaaaacgcc cttcatgtg tgcttaccca ggctgcaata	840
agagatattt taagctgtcc cacttacaga tgcacagcag gaagcacact ggtgagaaac	900
cataccagtg tgacttcaag gactgtgaac gaaggtttc tcgttcagac cagctaaaa	960
gacaccaaag gagacataca ggtgtgaaac cattccagtg taaaacttgt cagcgaagt	1020
tctccggtc cgaccacctg aagacccaca ccaggactca tacaggtgaa aagccctca	1080
gctgtcggtg gccaagttgt cagaaaaagt ttgcccggtc agatgaatta gtccggcatc	1140
acaacatgca tcagagaaac atgaccaaac tccagctggc gctttgaggg gtctccctcg	1200
gggaccgttc agtgtcccgag gcagcacagt gtgtgaactg cttcaagtc tgactctcca	1260
ctccctcta ctaaaaagga aacttcagtt gatcttcttc atccaacttc caagacaaga	1320
taccggtgct tctggaaact accaggtgtg cctggaagag ttggctctg ccctgcctac	1380
tttttagttga ctcacaggcc ctggagaagc agctaacaat gtctggtag taaaagccc	1440
attgccattt ggtgtggatt ttctactgtt agaagagcca tagctgtatca tgtccccctg	1500
acccttcct tctttttta tgctcgcccc cgctggggat ggaattattt taccatttc	1560
tatcatggaa tatttatagg ccagggcatg tgtatgtgtc tgtaatgtt aactttgtca	1620
tggttccat ttactaacag caacagcaag aaataaatca gagagcaagg catcgccccgt	1680
gaatcttgc taacattccc gaggtcagcc aggctgctaa cctggaaagc aggatgttagt	1740
tctgccaggc aactttaaa gctcatgtt ttcaagcagc tgaagaaaaa atcagaacta	1800
accagtacct ctgtatagaa atctaaaaga attttaccat tcaatgttcaatgttcaac	1860
actggcacac tgccttaag aaactatgaa gatctgagat tttttgtgt atgttttgc	1920
ctcttttgc tggtaatcat atgtgtctt atagatgtac atacccctt gcacaaatgg	1980

aggggaattc atttcatca ctggagtg ccttagtcta taaaaccat gctgttat 2040

ggcttcaagt tgtaaaaatg aaagtactt taaaagaaaa tagggatgg tccaggatct 2100
 ccactgataa gactgtttt aagtaactt aggaccttg ggtctacaag tatatgtcaa 2160
 aaaaatgaga ctactgggt gaggaaatcc attgttaaa gatggcgtg tgtgtgtgt 2220
 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg ttgtgtgtg ttttgtttt taagggaggg aatttattat 2280
 ttaccgttgc ttgaaattac tgtgtaaata tatgtctgat aatgatttgc tcttgacaa 2340
 ctaaaattag gactgtataa gtactagatg catcaactggg tggatctt acaagatatt 2400
 gatgataaca cttaaaattt taacctgcat tttcacttt gctctcaatt aaagtctatt 2460

caaaaggaaa aaaaaaaaaaa 2480

<210> 20

<211> 302

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Glu Lys Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe

20	25	30
----	----	----

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln

35	40	45
----	----	----

Tyr Ser Val Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser

50	55	60
----	----	----

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp

65	70	75	80
----	----	----	----

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln

85	90	95
----	----	----

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser

100	105	110
-----	-----	-----

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu

115	120	125
-----	-----	-----

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile

130	135	140
His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro		
145	150	155
Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys		
165	170	175
Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys		
180	185	190
Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro		

195	200	205
Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp		
210	215	220
Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln		
225	230	235
Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr		
245	250	255
His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro		
260	265	270

Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His His		
275	280	285
Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu		
290	295	300

<210> 21

<211> 3092

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 21

tgtgtgaatg gagcggccga gcatacctggc tcctcctcct tccctgtgc cggccccctct	60
tatttgagct ttggaaagct gggggcagcc aggcagctgg ggtaaggagt tcaaggcagc	120
gcccacaccc ggggctctcc gcaaccgcac cgcctgcctg ctccccctt cctttcccg	180

ccctccctcc cacccactca ttcacccacc cacccagaga gaggacggca gcccaggaac	240
cggggccgcgc cgccctcccg ccgcgcatact ggacttcctc ctgtgcagg agccggcttc	300
cacgtgtgtc ccggagccgg cgtctcagca cacgcctccgc cgggagcccg ggtgcgtcca	360

gcagccggag caacctgggg accgaggccc ccggagcgcc tggccaagt ccagcgcga	420
gaatccgcag gatcgagga gcggagaacc gtccgcattc gagccgcacc tcatgggttc	480
cgcacgtgcgg gacctgaacg cgctgctgcc cgctgtgtct tcgctggcg gcggcggcgg	540
cggctgcggg cttccctgtga gcggcgcagc gcagtggcg cccgtgttgg acttcgcgc	600
tccggcgcc tcggcttacg ggtcgctggg cggtcccgcc ctcctcccg ctccgcgc	660
gcctccgcg ccacccact cttcatcaa acaggagccc agctggcg gcgcgcgacc	720
acacgaggag cagtgcctga gcgccttac cttgcacttc tcggccagt tcaccgtac	780
agccggggcc tgcgttacg gacccttcgg tcctcccccg cccagccagg cgtccctggg	840
ccagggcagg atgtcccca atgcgccta cctgcccagc tgctggaga gccagctac	900
catccgcaac caaggataca gcacggtac ttgcacggg gcgcgcagct atggccacac	960
gccttcgtcat cactggcgcc agttcccaa ccatttccttc aaacacgagg accccatggg	1020
ccagcagggc tcgctggcg agcagcagta ctccgtccca cctccggtgt atggctgcca	1080
cacccctact gacagtgcac caggcagcc gcgcctgcgc ctgaggacgc cctacagcag	1140
tgacaattta taccaaatga cttccctact tgaatgcac acctggaaatc agatgaacct	1200
aggagctacc tttaaggaa tggctgctgg gagctccagc tcagtggaaat ggacagaagg	1260
gcagagcaac cacggcacag ggtatgagag tgagaaccac acggccccc tcctctgtgg	1320
tgccctgtac agaatacaca cccacgggtt cttccgaggc attcaggatg tgccgcgtgt	1380
atctggagtgc ccccaactc ttgtccgtc agcatctgaa accagtggaa aacgtcctt	1440
catgtgtgca tacccaggct gcaataagag atattttaag ctgtccact tacagatgca	1500
tagccgaag cacactggtg agaaaccata ccagtgtac ttcaaggact gcgcgagaag	1560
gttttctgc tcagaccagc taaaagaca ccaaaggaga cacacagggtg taaaaccatt	1620
ccagtgtaaa acttgtcagc gaaagttttcccgatccgcacatctgaa cccacaccag	1680
gactcataca gtaaaacaa gtaaaagcc cttcagctgt cggggcaca gttgtcagaa	1740
aaagtttgcg cgctcagacg aattggtccg ccatcacaac atgcatacaga gaaacatgac	1800
caaactccag ctggcgctt gaggggtccg acacggagac agtccagcat cccaggcagg	1860
aaagtgtgca aactgcttcc aaatctgatt ttgaaattcc tccactcac ctttcaaagg	1920
acacgactgt ggtactacat ccgacttcca agacagcaca cctgattgac tgcatcctat	1980
cagggttgcc ggaaggagtc ggtgtccgc ccactttga ttaactcaca ggcctgaaaa	2040
aagtggttca cgggtgttagt aaagtccatt gctattgtct gaattttcta ctgttagaag	2100
aaccattgtt gataatgccc cccgcggcc ccccggtt tcccttctc ctttgtgatc	2160
atttcccgat gattagagag actgttacat ttctttcat gggatattta taggcagg	2220

catgtgtatg tgccctgctaa tgtaaactct gtcatacgatcc ccatttacta actgccctag 2280

aaagaataa atcagagac aaggcaccag gggcaagaat cgtgcagaat ttcagaggc 2340
 tggctgcaaa cctggaaacc tggaaggcca gatgttaattc tacaggcgat tgttaaagct 2400
 cataggttt gagtaactgc atagtaggtt ggtattaact agaactcctg tatagttagg 2460
 acagagagga gccttcctgc tcagcttattc actctgaaca ctgcactgg gctctaaga 2520
 aatgtatgtt taagagcaga gatcttttt taatgtctt gatttatttt ttagttgtaa 2580
 ttaggtacat cctcagagat gtactttcct cctcttggtc aggatgtggg ggactcagtt 2640
 ccatcatctg gggcatctt agagtgtata gaccacactg gttatgtggc ttcaagttgt 2700

aaaaattaaa atgactttaa aagaaactag gggctggtcc aggttca ctggtaagac 2760
 tgttcttaag taacttaagt atctttgaat ctgcaggat gttagggaaaa aaaaaagata 2820
 tattattgtg agggaaatcca ttgtttaaag gtgtgcgtgt gtgttgtt ttttttaaag 2880
 ggagggagtt tattatttac ttagcttga aatactgtgt aaatatatat gtatatatat 2940
 gatgtgtctt ttgtcaacta aaattaggag gtgtatggta ttagctgcatttgcactgtgtgg 3000
 atgtcaatct tacagtgtat ttagtataat actaaaaatg taacctgcattttccac 3060
 ttggctgtca attaaagtct attcaaagg aa 3092

<210> 22

<211> 517

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Met Asp Phe Leu Leu Ser Gln Glu Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Pro Ala Ser Gln His Thr Leu Arg Arg Glu Pro Gly Cys Val Gln Gln

20	25	30
----	----	----

Pro Glu Gln Pro Gly Asp Arg Gly Pro Arg Ser Ala Trp Ala Lys Ser

35	40	45
----	----	----

Ser Ala Glu Asn Pro Gln Asp Arg Arg Ser Gly Glu Pro Ser Ala Ser

50	55	60
----	----	----

Glu Pro His Leu Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu

65	70	75	80
----	----	----	----

Pro Ala Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Gly Cys Gly Leu Pro

85	90	95
Val Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro		
100	105	110
Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala		
115	120	125
Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro		
130	135	140
Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe		
145	150	155
Thr Leu His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg		
165	170	175
Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln		
180	185	190
Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser		
195	200	205
Gln Pro Thr Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly		
210	215	220
Ala Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro		
225	230	235
Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu		
245	250	255
Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr		
260	265	270
Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro		
275	280	285
Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met		
290	295	300
Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Met Ala Ala		
305	310	315
Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Gly		
325	330	335
Thr Gly Tyr Glu Ser Glu Asn His Thr Ala Pro Ile Leu Cys Gly Ala		

340	345	350
Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val		
355	360	365
Arg Arg Val Ser Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu		
370	375	380
Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys		
385	390	395
Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr		
405	410	415
Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe		
420	425	430
Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val		
435	440	445
Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp		
450	455	460
His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys		
465	470	475
Pro Phe Ser Cys Arg Trp His Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser		
485	490	495
Asp Glu Leu Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys		
500	505	510
Leu Gln Leu Ala Leu		
515		
<210> 23		
<211> 2126		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 23		
gccaggtct ccaccccac ttcccaattg aggaaaccga ggcagaggag gctcagagag 60		
ctaccggtgg acccacggtg cctccctccc tggatctac acagaccatg gccttgccaa 120		
cggtcgacc cctgttgggg tcctgtggga ccccgccct cggtcgacc ctgttcctgc 180		

tcttcagcct cggatgggtg cagccctcgaa ggacctggc tggagagaca gggcaggagg	240
ctgcgccctt ggacggagtc ctggccaacc cacctaacat ttccagcctc tcccctcgcc	300
aactccttgg ctccccgtgt gcggaggtgt ccggcctgag cacggagcgt gtccgggagc	360
tggctgtggc ctggcacag aagaatgtca agctctcaac agagcagctg cgctgtctgg	420
ctcacggct ctctgagccc cccgaggacc tggacgcctt cccattggac ctgctgttat	480
tcctcaaccc agatgcgttc tcggggccccc aggccgcac ccgtttcttc tcccgcata	540
cgaaggccaa tgtggacctg ctcccggggg gggctccga ggcacagcgg ctgctgcctg	600
cggctctggc ctgctgggt gtgcgggggt ctctgctgag cgaggctgat gtgcggcctc	660
tgggaggcct ggcttgcgac ctgcctggc gctttgtggc cgagtggcc gaagtgtgc	720
taccccggtt ggtgagctgc ccgggacccc tggaccagga ccagcaggag gcagccagg	780
cggctctgca gggcggggga cccccctacg gccccccgtc gacatggtct gtctccacga	840
tggacgctct gcggggcctg ctgcccgtgc tggccagcc catcatccgc agcatccgc	900
agggcatcggt gggccgtgg cggcaacgtt cctctggga cccatctgg cggcagcctg	960
aacggaccat cctcggccg cgggtccggc gggaaatggaa gaagacagcc tgtccttcag	1020
gcaagaaggc cgcgagata gacgagagcc tcatttcta caagaagtgg gagctgaaag	1080
cctgcgtgga tgccggccctg ctggccaccc agatggaccg cgtgaacgcc atcccttca	1140
cctacgagca gctggacgtc ctaaagcata aactggatga gctctaccca caaggtaacc	1200
ccgagtcgtt gatccagcac ctgggctacc tcttcctcaa gatgaggccct gaggacattc	1260
gcaagtgaa tgtgacgtcc ctggagaccc tgaaggctt gttgaagtc aacaaaggc	1320
acgaaatgag tcctcagggtg gccaccctga tcgaccgtt tgtgaaggga agggccagc	1380
tagacaaaga caccctagac accctgaccg ccttctaccc tgggtacctg tgctccctca	1440
gccccgagga gctgagctcc gtgcggccca gcagcatctg ggccgtcagg ccccaggacc	1500
tggacacgtg tgacccaagg cagctggacg tcctctatcc caaggcccgc cttgtttcc	1560
agaacatgaa cgggtccgaa tactcgtga agatccagtc cttectgggt gggggccca	1620
cggaggattt gaaggcgctc agtcagcaga atgtgagcat ggacttggcc acgttcatga	1680
agctgcccac ggtatgcgggt ctggcgttga ctgtggctga ggtgcagaaa cttctggac	1740
cccacgtgga gggcctgaag gcggaggacc ggcaccgccc ggtgcgggac tggatcctac	1800
ggcagcggca ggacgacactg gacacgctgg ggctgggct acagggcgc atcccaacg	1860
gctacctggt cctagacctc agcatgcaag aggcctctc gggacgccc tgcctctag	1920

gacctggacc ttttcacc gtcctggcac tgctccatgc ctccacccctg gcctgaggc 1980
 cccactccct tgcgtcccc agccctgctg gggatccccg cctggccagg agcaggcagc 2040
 ggtggtcccc gtccacccc aagagaactc gcgctcagta aacggaaaca tgccccctgc 2100
 agacacgtaa aaaaaaaaaaaaaaa 2126

<210> 24

<211> 622

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro

1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln

20 25 30

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu

35 40 45

Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg

50 55 60

Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu

65 70 75 80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu

85 90 95

Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro

100 105 110

Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Phe Leu Asn Pro

115 120 125

Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile

130 135 140

Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln

145 150 155 160

Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu

165 170 175

Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu

180	185	190
Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu		
195	200	205
Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg		
210	215	220
Ala Ala Leu Gln Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp		
225	230	235
240		
Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly		
245	250	255
Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg		
260	265	270
Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile		
275	280	285
Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser		
290	295	300
Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys		
305	310	315
320		
Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met		
325	330	335
Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu		
340	345	350
Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val		
355	360	365
Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile		
370	375	380
Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu		
385	390	395
400		
Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp		
405	410	415
Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr		
420	425	430
Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu		

435

440

445

Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp

450

455

460

Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala

465 470 475 480

Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile

485

490

495

Gln Ser Phe Leu Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser

500

505

510

Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr

515

520

525

Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly

530

535

540

Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg

545 550 555 560

Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu

565

570

575

Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser

580

585

590

Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro

595

600

605

Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala

610

615

620

<210> 25

<211> 2187

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

tgcaggctc tccacccca cttccaatt gaggaaaccg aggcagagga ggctcagegc	60
cacgcactcc tcttctgcc tggccggcca ctcccgtctg ctgtgacgcg cggacagaga	120
gctaccggtg gaccacggt gcctccctcc ctggatcta cacagaccat ggccttgcca	180

acggctcgac ccctgttggg gtcctgtggg accccccccc tcggcagcct cctgttcctg	240
ctcttcagcc tcggatgggt gcagccctcg aggaccctgg ctggagagac agggcaggag	300
gctgcgcccc tggacggagt cctggccaac ccacctaaca tttccagcct ctcccctcgc	360
caactccttg gcttcccgtg tgccggaggtg tccggcctga gcacggagcg tgtccggag	420
ctggctgtgg ccttggcaca gaagaatgtc aagctctcaa cagagcagct gcgtgtctg	480
gctcaccggc tctctgagcc ccccgaggac ctggacgccc tcccattgga cctgctgcta	540
ttcctcaacc cagatgcgtt ctggggccc caggctgca cccgtttctt ctcccgcatc	600
acgaaggcca atgtggacct gctcccgagg ggggctcccg agcgacagcg gctgctgct	660
gcggctctgg cctgctgggg tgtgcggggg tctctgctga gcgaggctga tgtgcggct	720
ctgggaggcc tggcttcgca cctgcctggg cgcttgtgg ccgagtcggc cgaagtgctg	780
ctaccccccgc tggtagctg cccgggaccc ctggaccagg accagcagga ggcagccagg	840
gcggctctgc agggcggggg accccccctac ggcccccgt cgacatggtc tgtctccacg	900
atggacgctc tgcggggcct gctgccctg ctggccagc ccatcatccg cagcatcccg	960
caggcatcg tggccgcgtg gcccacgc tcctctcggg acccatctg gcggcagect	1020
gaacggacca tcctccggcc gcggttccgg cggaaagtgg agaagacagc ctgtccttca	1080
ggcaagaagg cccgcgagat agacgagagc ctcatcttct acaagaagtg ggagctggaa	1140
gcctgcgtgg atgcggccct gctggccacc cagaatggacc gcgtgaacgc catcccttc	1200
acctacgagc agctggacgt cctaaagcat aaactggatg agctctaccc acaaggttac	1260
cccgagctg tgatccagca cctggctac ctcttcctca agatgagccc tgaggacatt	1320
cgcaagtgga atgtgacgctc cctggagacc ctgaaggctt tgcttaagt caacaagggg	1380
cacgaaatga gtcttcaggt gcccacccctg atcgaccgct ttgtgaaggg aaggggccag	1440
ctagacaaag acaccctaga caccctgacc gccttctacc ctgggtacct gtgtccctc	1500
agccccgagg agctgagctc cgtccccccc agcagcatct gggcggtcag gccccaggac	1560
ctggacacgt gtgacccaag gcagctggac gtcctctatac ccaaggcccc cttgtttc	1620
cagaacatga acgggtccga atacttcgtg aagatccagt cttctctggg tggggcccc	1680
acggaggatt tgaaggcgct cagtcagcag aatgtgagca tggacttggc cactttcatg	1740
aagctgcca gggatgcgggt gctgccgtt actgtggctg aggtgcagaa acttctggga	1800
ccccacgtgg agggctgaa ggcggaggag cggcacccgc cggtgccggc ctggatccta	1860
cggcagcggc aggacgacact ggacacgctg gggctggggc tacagggcgg catccccaa	1920

ggctacctgg tcctagacct cagcatgcaa gagggcctct cggggacgcc ctgcctcta 1980
 ggacctggac ctgttctcac cgtcctggca ctgctcctag cctccaccct ggcctgaggg 2040
 ccccaactccc ttgctggccc cagccctgct gggatcccc gcctggccag gagcaggcac 2100
 gggtggtccc cggtccaccc caagagaact cgcgctcagt aaacggaaac atgccccctg 2160
 cagacacgta aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaa 2187

<210> 26

<211> 622

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro

1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln

20 25 30

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu

35 40 45

Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg

50 55 60

Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu

65 70 75 80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu

85 90 95

Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro

100 105 110

Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Phe Leu Asn Pro

115 120 125

Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile

130 135 140

Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln

145 150 155 160

Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu

165 170 175

Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu

180 185 190

Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu

195 200 205

Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg

210 215 220

Ala Ala Leu Gln Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp

225 230 235 240

Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly

245 250 255

Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg

260 265 270

Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile

275 280 285

Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser

290 295 300

Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys

305 310 315 320

Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met

325 330 335

Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu

340 345 350

Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val

355 360 365

Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile

370 375 380

Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu

385 390 395 400

Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp

405 410 415

Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr

420 425 430

Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu

435 440 445

Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp

450 455 460

Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala

465 470 475 480

Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile

485 490 495

Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser

500 505 510

Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr

515 520 525

Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly

530 535 540

Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg

545 550 555 560

Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu

565 570 575

Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser

580 585 590

Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro

595 600 605

Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala

610 615 620

<210> 27

<211> 2154

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

cgcacacgac tccttttct gcctggccgg ccactccgt ctgctgtgac gcgccggacag 60
agagctaccg gtggacccac ggtgcctccc tccctggat ctacacagac catggccttg 120

ccaacggctc gaccctgtt ggggtcctgt gggaccccg ccctggcag ctcctgttc	180
ctgctttca gcctcgatg ggtgcagccc tcgaggaccc tggctggaga gacagggcag	240
gaggctgcgc ccctgacgg agtcctggcc aacccaccta acatttccag ccttccct	300
cgcacactcc ttggcttccc gtgtcggag gtgtccggcc tgagcacgga gcgtgtccgg	360
gagctggctg tggccttggc acagaagaat gtcaagctct caacagagca gctgcgtgt	420
ctggctcacc ggctctctga gccccccgag gacctggacg ccctccatt ggacctgctg	480
ctattcctca acccagatgc gttctcgggg ccccaggcct gcacccgttt ctttcccg	540
atcacgaagg ccaatgtgga cctgctcccg aggggggctc ccgagcgaca gcggctgctg	600
cctgcggctc tggcctgctg ggggtgtgcgg gggctctgc tgagcgaggc tggatgtgcgg	660
gctctggag gcctggcttg cgacctgcct gggcgcttg tggccgagtc ggccgaagt	720
ctgctacccc ggctggtag ctgcccggga cccctggacc aggaccagca ggaggcagcc	780
agggcggctc tgcaggcgg gggacccccc tacggccccc cgtcgacatg gtctgtctcc	840
acgatggacg ctctgcgggg cctgctgcc tgcgtggcc ageccatcat ccgcagcatc	900
ccgcaggcga tgcgtggccgc gtggcggcaa cgctctctc gggaccatc ctggcggcag	960
cctgaacgga ccatacctccg gccgcggttc cggcgggaag tggagaagac agcctgtcct	1020
tcaaggcaaga aggcccgcga gatagacgag agcctcatct tctacaagaa gtggagctg	1080
gaaggcctgcg tggatgcggc cctgctggcc acccagatgg accgcgtgaa cgccatcccc	1140
ttcacctacg agcagctgga cgtcctaaag cataaaactgg atgagctcta cccacaaggt	1200
taccccgagt ctgtgatcca gcacctgggc tacctttcc tcaagatgag ccctgaggac	1260
attcgcaagt ggaatgtgac gtccctggag accctgaagg ctttgcttga agtcaacaaa	1320
gggcacgaaa tggatcctca ggctcctgg cggccctcc cacaggtggc caccctgatc	1380
gaccgccttg tgaagggaag gggccagcta gacaaagaca ccctagacac cctgaccgcc	1440
ttctaccctg ggtacctgtc ctccctcagc cccgaggagc tgagctccgt gccccccagc	1500
agcatctggg cggteaggcc ccaggacatg gacacgtgtg acccaaggca gctggacgtc	1560
ctctatccca aggeccgcct tgctttccag aacatgaacg ggtccgaata cttcgtgaag	1620
atccagtctt tcctgggtgg ggcccccacg gaggattta aggcgctcag tcagcagaat	1680
gtgagcatgg acttggccac gttcatgaag ctgcggacgg atgcggtgct gccgttgact	1740
gtggctgagg tgcagaaact tctggaccc cacgtggagg gcctgaaggc ggaggagcgg	1800
caccgcggcgg tgcgggactg gatcctacgg cagcggcagg acgacctgga cacgctgggg	1860

ctggggctac agggcggcat ccccaacggc tacctggtcc tagacctcgatgcagag 1920
 gcccctctgg ggacgcccgt cctccttagga cctggacctg ttctcaccgt cctggactg 1980
 ctccctagcct ccaccctggc ctgagggccc cactcccttg ctggcccccag ccctgctggg 2040
 gatccccccc tggccaggag caggcacggg tggtccccgt tccaccccaa gagaactcgc 2100
 gctcagtaaa cgaaaaacatg cccctgcag acacgtaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2154

<210> 28

<211> 630

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro

1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln

20 25 30

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu

35 40 45

Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg

50 55 60

Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu

65 70 75 80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu

85 90 95

Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro

100 105 110

Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Phe Leu Asn Pro

115 120 125

Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile

130 135 140

Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln

145 150 155 160

Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu

165 170 175

Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
 180 185 190
 Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
 195 200 205
 Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg
 210 215 220

 Ala Ala Leu Gln Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp
 225 230 235 240
 Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly
 245 250 255
 Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg
 260 265 270
 Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile
 275 280 285
 Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser

 290 295 300
 Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys
 305 310 315 320
 Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met
 325 330 335
 Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu
 340 345 350
 Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val
 355 360 365

 Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile
 370 375 380
 Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu
 385 390 395 400
 Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu
 405 410 415
 Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln
 420 425 430

Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr

435 440 445

Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser

450 455 460

Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln

465 470 475 480

Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn

485 490 495

Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro

500 505 510

Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu

515 520 525

Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val

530 535 540

Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala

545 550 555 560

Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln

565 570 575

Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn

580 585 590

Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr

595 600 605

Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu

610 615 620

Leu Ala Ser Thr Leu Ala

625 630

<210> 29

<211> 2135

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 29

ggacagctgc ttcccaggc caaaaagccc ctgcgttgc tccaaacagt ggtgtggtt 60

gaggggtggg acaagtgggg acctcagagt cattgttatac cacagaccat ggccttgcca	120
acagctcgac ccctgctggg gtcctgtgga agtcccatct gcagccgaag cttcctactg	180
cttccctta gtcttgggtg gataccacgt ctgcagaccc agactacaaa gacaagccag	240
gaggccacac tcctccatgc tgtgaacggt gccgctgact ttgccagct ccccacaggc	300
ctcttttg gcctcacatg tgaggaggt tctgacactga gcatgaaaca agccaagggg	360
ctggctatgg ctgtaagaca gaagaacatt acactccggg gacatcagct gcgttgtctg	420
gcacgtcgcc ttcttaggca ctcaccgac gaggaactga atgtcttcc actggacctg	480
ctgctcttcc tcaacccagc catgttcca gggcaacagg ctgtgccc cttcttcc	540
ctcatctcta aagccaatgt ggatgtactc ccacggaggt ctctggagcg ccagaggctg	600
ctgatggagg ctctgaagtg ccagggcgtg tatggattc aagtggatgt ggcagatgt	660
cgggctctcg gaggcctggc ctgtgacctg cctggaaat ttgtggccag atcttccaa	720
gttctccccc cctggctggc aggatgccaa ggaccctgg accagagcca ggaaaaggca	780
gtcagggagg ttctgaggag tggagaacc caatatggcc cccatcgaa gtggtagtc	840
tccaccctgg atgcctgca gagcttggta gcagtgttgg atgagttccat cgtccagagc	900
atccccaaagg atgtcaaagc tgaatggctg caacacatct ccagagaccc ctccaggctg	960
gggtctaagc tgaccgtcat acacccaagg ttccgacggg atgcagaaca gaaaggctgc	1020
cctccaggga aggagcccta caaggtggat gaagacacta tcttctacca gaattggag	1080
ctggaggctt gtgttagatgg caccatgctg gccagacaaa tggacctgt gaacgagatt	1140
cccttcacct atgagcagct cagtatctt aagcacaaac tggacaagac ctacccacaa	1200
ggctatcctg agtccctgat ccagcagctg ggtcacttct tcagatatgt tagccctgaa	1260
gacatccacc agtggaatgt gacctcacca gacacagtgaa aaactctgtg caaagtgc	1320
aaaggacaaa agatgaatgc tcaggcgatt gccttggctg cctgctatct tcggggagga	1380
ggccagctgg acgaggatata ggtaaaagcc ctgggcaca tcccgtaag ctatctatgt	1440
gacttcagcc cccaggatct gcactcggtt ccctccagtg tcatgtggct ggttggccc	1500
caagacctgg acaagtgcag ccagaggcat ctgggtctcc tctaccagaa ggcctgctca	1560
gccttccaga atgtgagcgg cctagaatac tttgagaaaa tcaagacatt cctgggtgg	1620
gcctccgtga aggacctgctg ggcctcagc cagcacaatg tgagcatgga catagccact	1680
ttcaagaggc tgcaggtgga ttccctggtg gggctgagtg tggctgaggt acagaaaactt	1740
ctggggccaa acattgtgga cctgaagacc gaggaggata aaagccctgt ccgtgactgg	1800

ctgtccggc agcatcagaa agaccttagac aggctgggtt tggacttca gggtgccatc 1860
 cccaatggct acctggtcct ggacttcaat gtccgagagg cttctccag cagagctca 1920
 ctccctggc caggatttgt attaatatgg attccagctc tgcccagc tttaaggctg 1980
 agctgagacc accaccctgc aaggctcctg gtcccagctc tactgggcc ctctgacca 2040
 ggagtggta ccaggggtca ttgccaaagt ttgaggactc ttgaactcaa taaacagtgg 2100
 catatgtcc ctgtaaaaaaaaaaaaaaa aaaaa 2135

<210> 30

<211> 625

<212> PRT

<213> Mus musculus

<

400> 30

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Ser Pro

1 5 10 15

Ile Cys Ser Arg Ser Phe Leu Leu Leu Leu Ser Leu Gly Trp Ile

20 25 30

Pro Arg Leu Gln Thr Gln Thr Lys Thr Ser Gln Glu Ala Thr Leu

35 40 45

Leu His Ala Val Asn Gly Ala Ala Asp Phe Ala Ser Leu Pro Thr Gly

50 55 60

Leu Phe Leu Gly Leu Thr Cys Glu Glu Val Ser Asp Leu Ser Met Glu

65 70 75 80

Gln Ala Lys Gly Leu Ala Met Ala Val Arg Gln Lys Asn Ile Thr Leu

85 90 95

Arg Gly His Gln Leu Arg Cys Leu Ala Arg Arg Leu Pro Arg His Leu

100 105 110

Thr Asp Glu Glu Leu Asn Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Phe Leu

115 120 125

Asn Pro Ala Met Phe Pro Gly Gln Gln Ala Cys Ala His Phe Phe Ser

130 135 140

Leu Ile Ser Lys Ala Asn Val Asp Val Leu Pro Arg Arg Ser Leu Glu

145 150 155 160

Arg Gln Arg Leu Leu Met Glu Ala Leu Lys Cys Gln Gly Val Tyr Gly

165	170	175
Phe Gln Val Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys		
180	185	190
Asp Leu Pro Gly Lys Phe Val Ala Arg Ser Ser Glu Val Leu Leu Pro		
195	200	205
Trp Leu Ala Gly Cys Gln Gly Pro Leu Asp Gln Ser Gln Glu Lys Ala		
210	215	220
Val Arg Glu Val Leu Arg Ser Gly Arg Thr Gln Tyr Gly Pro Pro Ser		
225	230	235
Lys Trp Ser Val Ser Thr Leu Asp Ala Leu Gln Ser Leu Val Ala Val		
245	250	255
Leu Asp Glu Ser Ile Val Gln Ser Ile Pro Lys Asp Val Lys Ala Glu		
260	265	270
Trp Leu Gln His Ile Ser Arg Asp Pro Ser Arg Leu Gly Ser Lys Leu		
275	280	285
Thr Val Ile His Pro Arg Phe Arg Arg Asp Ala Glu Gln Lys Ala Cys		
290	295	300
Pro Pro Gly Lys Glu Pro Tyr Lys Val Asp Glu Asp Leu Ile Phe Tyr		
305	310	315
Gln Asn Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Gly Thr Met Leu Ala Arg		
325	330	335
Gln Met Asp Leu Val Asn Glu Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Ser		
340	345	350
Ile Phe Lys His Lys Leu Asp Lys Thr Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu		
355	360	365
Ser Leu Ile Gln Gln Leu Gly His Phe Phe Arg Tyr Val Ser Pro Glu		
370	375	380
Asp Ile His Gln Trp Asn Val Thr Ser Pro Asp Thr Val Lys Thr Leu		
385	390	395
Leu Lys Val Ser Lys Gly Gln Lys Met Asn Ala Gln Ala Ile Ala Leu		
405	410	415
Val Ala Cys Tyr Leu Arg Gly Gly Gln Leu Asp Glu Asp Met Val		

420	425	430
-----	-----	-----

Lys Ala Leu Gly Asp Ile Pro Leu Ser Tyr Leu Cys Asp Phe Ser Pro

435	440	445
-----	-----	-----

Gln Asp Leu His Ser Val Pro Ser Ser Val Met Trp Leu Val Gly Pro

450	455	460
-----	-----	-----

Gln Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg His Leu Gly Leu Leu Tyr Gln

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu Glu Tyr Phe Glu

485	490	495
-----	-----	-----

Lys Ile Lys Thr Phe Leu Gly Gly Ala Ser Val Lys Asp Leu Arg Ala

500	505	510
-----	-----	-----

Leu Ser Gln His Asn Val Ser Met Asp Ile Ala Thr Phe Lys Arg Leu

515	520	525
-----	-----	-----

Gln Val Asp Ser Leu Val Gly Leu Ser Val Ala Glu Val Gln Lys Leu

530	535	540
-----	-----	-----

Leu Gly Pro Asn Ile Val Asp Leu Lys Thr Glu Glu Asp Lys Ser Pro

545	550	555	560
-----	-----	-----	-----

Val Arg Asp Trp Leu Phe Arg Gln His Gln Lys Asp Leu Asp Arg Leu

565	570	575
-----	-----	-----

Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp

580	585	590
-----	-----	-----

Phe Asn Val Arg Glu Ala Phe Ser Ser Arg Ala Ser Leu Leu Gly Pro

595	600	605
-----	-----	-----

Gly Phe Val Leu Ile Trp Ile Pro Ala Leu Leu Pro Ala Leu Arg Leu

610	615	620
-----	-----	-----

Ser

625

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic mesothelin peptide

<400> 31

Gly Gln Lys Met Asn Ala Gln Ala Ile

1 5

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3D beta peptide clone from Mus musculus

<400> 32

Cys Ala Ser Ser Pro Gly Leu Gly Gly Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10 15

<210> 33

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3D beta nucleotide clone from Mus musculus

<400> 33

tgtgccagca gccctggact gggggatcc tatgaacagt acttc 45

<210> 34

<

211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V beta 10 clone #1 peptide clone from Mus
musculus

<400> 34

Cys Ala Ser Ser Gln Gly Leu Gly Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 35

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V beta 10 clone #1 nucleotide clone from Mus

musculus

<400> 35

tgtgccagca gccaggact ggggagctcc tatgaacagt acttc	45
--	----

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V beta 10 clone #2 peptide from Mus musculus

<400> 36

Cys Ala Ser Ser Tyr Ile Leu Gly Ala Tyr Glu Gln Tyr Phe

1	5	10	
---	---	----	--

<210> 37

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V beta 10 clone #2 nucleotide from Mus musculus

<400> 37

tgtgccagca gctataact gggggcctat gaacagtaact tc	42
--	----

<210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V beta 10 clone #3 peptide from Mus musculus

<400> 38

Cys Ala Ser Ser Ser Trp Thr Val Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 39

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V beta 10 clone #3 nucleotide from Mus musculus

<400> 39

tgtgccagca gctcctggac agtctatgaa cagtacttc 39

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V beta 10 clone #4 peptide from Mus musculus

<400> 40

Cys Ala Ser Ser Trp Thr Gly Ala Asn Thr Gly Gln Leu Tyr Phe

1 5 10 15

<210> 41

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V beta 10 clone #4 nucleotide from Mus musculus

<400> 41

tgtgccagca gctggacagg ggcaaacacc gggcagctct acttt 45

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223

> synthetic mesothelin peptide

<400> 42

Ile Ser Lys Ala Asn Val Asp Val Leu

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic mesothelin peptide

<400> 43

Gly Gln Lys Met Asn Ala Gln Ala Ile

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic mesothelin peptide

<400> 44

Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu

1 5

<210

> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic mesothelin peptide

<400> 45

Leu Leu Gly Pro Asn Ile Val Asp Leu

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic mesothelin peptide

<400> 46

Glu Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic mesothelin peptide

<400

> 47

Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu

1 5

<210> 48

<211> 1595

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

agaatcaaaa gaggaaacca acccctaaga tgagcttcc atgtaaattt gtagccagct	60
tccttctgat ttcaatgtt tcttccaaag gtgcagtctc caaagagatt acgaatgcct	120
tggaaacctg gggtgccctg ggtcaggaca tcaacttgg a cattccatgt tttcaatga	180
gtgatgatata tgacgatata aaatggaaa aaacttcaga caagaaaaag attgcacaat	240
tcagaaaaaga gaaagagact ttcaaggaaa aagatacata taagctattt aaaaatggaa	300

ctctgaaaat taagcatctg aagaccgatg atcaggatat ctacaaggta tcaatatatg	360
atacaaaagg aaaaaatgtt ttggaaaaaa tatttattt gaagattcaa gagagggct	420
caaaacccaa gatctcctgg acttgtatca acacaacccct gacctgtgag gtaatgaatg	480
gaactgaccc cgaattaaac ctgttatcaag atggaaaca tctaaaactt tctcagaggg	540
tcatcacaca caagtggacc accagcctga gtgcaaaatt caagtgcaca gcagggaaaca	600
aagtcaagaa ggaatccagt gtcgagcctg tcagctgtcc agagaaaggt ctggacatct	660
atctcatcat tggcatatgt ggaggaggca gcctttgtat ggtctttgtc gcactgctcg	720

ttttctatat cacaaaaagg aaaaaacaga ggagtcggag aaatgtatgag gagctggaga	780
caagagccca cagatgtactt actgaagaaa gggccggaa gccccaccaa attccagctt	840
caacccctca gaatccagca acttccaaac atcctcctcc accaccttgtt catgttccc	900
aggcacctag tcatgtccc ccgcctcctg gacaccgtgt tcagcaccag cctcagaaga	960
ggcctctgc tccgtcggc acacaagtcc accagcagaa aggccccccc ctccccagac	1020
ctcgagttca gccaacacct ccccatgggg cagcagaaaa ctcattgtcc ctttcctcta	1080
attaaaaaaag atagaaactg tcttttcaa taaaaagcac tgtggatttc tgccctctg	1140

atgtgcatac ccgtacttcc atgaggtttt ttctgtgtc agaacattgt cacccctga	1200
ggctgtggc cacagccacc tctgcattt cgaactcagc catgtggta acatctggag	1260
tttttgtct cctcagagag ctccatcaca ccagtaagga gaagcaatat aagtgtatt	1320
gcaagaatgg tagaggaccg agcacagaaa tcttagagat tcttgccc ctctcaggta	1380
atgtgttagat gcgataaatc aagtgtttgg tgcctggg tctcaactaca agcagcctat	1440
ctgcttaaga gactctggag tttttatgt gccctggg acacttgccc accatctgt	1500
gagtaaaagt gaaataaaag ctttgactag aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1560

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa	1595
--	------

<210> 49

<211> 351

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn

1 5 10 15

Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu

20 25 30

Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe

35 40 45

Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp

50 55 60

Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu

65 70 75 80

Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His

85 90 95

Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr

100 105 110

Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu

115 120 125

Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu

130 135 140

Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln

145	150	155	160
Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp			
165	170	175	
Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val			
180	185	190	
Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu			
195	200	205	
Asp Ile Tyr Leu Ile Ile Gly Ile Cys Gly Gly Ser Leu Leu Met			
210	215	220	
Val Phe Val Ala Leu Leu Val Phe Tyr Ile Thr Lys Arg Lys Lys Gln			
225	230	235	240
Arg Ser Arg Arg Asn Asp Glu Glu Leu Glu Thr Arg Ala His Arg Val			
245	250	255	
Ala Thr Glu Glu Arg Gly Arg Lys Pro His Gln Ile Pro Ala Ser Thr			
260	265	270	
Pro Gln Asn Pro Ala Thr Ser Gln His Pro Pro Pro Pro Gly His			
275	280	285	
Arg Ser Gln Ala Pro Ser His Arg Pro Pro Pro Gly His Arg Val			
290	295	300	
Gln His Gln Pro Gln Lys Arg Pro Pro Ala Pro Ser Gly Thr Gln Val			
305	310	315	320
His Gln Gln Lys Gly Pro Pro Leu Pro Arg Pro Arg Val Gln Pro Lys			
325	330	335	
Pro Pro His Gly Ala Ala Glu Asn Ser Leu Ser Pro Ser Ser Asn			
340	345	350	
<210> 50			
<211> 1098			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 50			
atggccgtca tggctccccg aaccctcgta ctgctactct cgggggtctt ggccttgacc			60
cagacctggg cggctctca ctccatgagg tatttttca catccgtgtc ccggccggc			120

cgcggggagc cccgcttcat cgcaagtggc tacgtggacg acacgcagtt cgtgcggttc	180
gacagcgacg ccgcgagcca gaggatggag ccgcgggcgc cgtggataga gcaggagggt	240
ccggagtatt gggacgggaa gacacggaaa gtgaaggccc actcacagac tcaccgagtg	300
gacctggga ccctgtcgctactacaac cagagcgagg ccggttctca caccctccag	360

atgatgtttg gctgcgacgt ggggtcgac tggcgcttcc tccgcggta ccaccgtac	420
gcctacgacg gcaaggatta catcgccctg aaagaggacc tgcgcttgc gaccgcggcg	480
gacatggcgac ctcaagaccac caagcacaag tgggaggccgg cccatgtggc ggagcagtgc	540
agagcctacc tggagggcac gtgcgtggag tggctccgca gatacctgga gaacggaaag	600
gagacgtgc agcgcacgga cggcccaaa acgcatatga ctaccacgc tgtctctgac	660
catgaagcca ccctgaggtg ctggccctg agcttctacc ctgcggagat cacactgacc	720
tggcagcggg atggggagga ccagacccag gacacggagc tcgtggagac caggcctgca	780

ggggatggaa cttccagaa gtggcggct gtgggtggc cttctggaca ggagcagaga	840
tacacctgcc atgtgcagca tgagggttg cccaagcccc tcaccctgag atgggagccg	900
tcttcccagc ccaccatccc catcggtggc atcattgctg gcctggttct ctttggagct	960
gtgatcaactg gagctgtggt cgctgctgtg atgtggagga ggaagagctc agatagaaaa	1020
ggagggagct acttcagggc tgcaagcagt gacagtgcggcc agggctctga tgtgtctctc	1080
acagcttgtaa aagtgtga	1098

<210> 51

<211> 365

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<

400> 51

Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Ser Gly Ala

1 5 10 15

Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe

20 25 30

Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala

35 40 45

Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala

50 55 60

Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly

65	70	75	80
Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln			
85	90	95	
Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser			
100	105	110	
Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Met Met Phe Gly Cys Asp Val Gly			
115	120	125	
Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly			
130	135	140	
Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala			
145	150	155	160
Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val			
165	170	175	
Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu			
180	185	190	
Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala			
195	200	205	
Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr			
210	215	220	
Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr			
225	230	235	240
Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu			
245	250	255	
Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val			
260	265	270	
Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu			
275	280	285	
Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro			
290	295	300	
Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala			
305	310	315	320
Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser			

325	330	335
Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser		
340	345	350
Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val		

<210> 52

<211> 987

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

aatataagt gaggcgtcgc gctggcgccc attcctgaag ctgacagcat tcgggccag	60
atgtctcgct ccgtggccctt agctgtgctc gcgcgtactct ctctttctgg cctggaggct	120
atccagcgta ctccaaagat tcaggtttac tcacgtcatc cagcagagaa tggaaagtca	180
aatttcctga attgctatgt gtctgggtt catccatccg acattgaagt tgacttactg	240
aagaatggag agagaattga aaaagtggag cattcagact tgtctttcag caaggactgg	300
tctttctatc tcttgtacta cactgaattc accccccactg aaaaagatga gtatgcctgc	360

catactctgc ttagaatttg gggaaaatt tagaaatata attgacagga ttattggaaa	840
tttgttataa tgaatgaaac atttgtcat ataagattca tatttacttc ttatacattt	900
gataaagttaa ggcatggttg tggttaatct ggtttathtt tgccacaa gttaaataaa	960
tctaaaact tcatgtgtta tctctta	987

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Ser Leu Ser

1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg

20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser

35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu

50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp

65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp

85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile

100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met

115