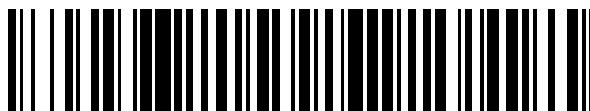


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 858 248**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2013** **PCT/US2013/039316**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013** **WO13166321**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2013** **E 13784884 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2021** **EP 2844743**

54 Título: **Receptores de linfocitos T con afinidad potenciada y métodos para preparar los mismos**

30 Prioridad:

03.05.2012 US 201261642358 P

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

29.09.2021

73 Titular/es:

**FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH
CENTER (100.0%)
1100 Fairview Avenue North
Seattle, WA 98109, US**

72 Inventor/es:

**SCHMITT, THOMAS M. y
GREENBERG, PHILIP D.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 858 248 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de linfocitos T con afinidad potenciada y métodos para preparar los mismos

5 **Antecedentes****Campo técnico**

10 La presente divulgación se refiere a receptores de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) con afinidad potenciada) y, más particularmente, al uso de selección agonista de células progenitoras hematopoyéticas que expresan un TCRα específico de antígeno para generar TCR con afinidad potenciada y a los usos de los mismos.

Descripción de la técnica relacionada

15 La terapia génica con TCR es un enfoque de tratamiento emergente que puede superar muchos de los obstáculos asociados con la inmunoterapia adoptiva con linfocitos T convencional, tal como el tiempo y la mano de obra extensos necesarios para aislar, caracterizar y expandir clones de linfocitos T específicos de antígenos tumorales (Schmitt, Ragnarsson, & Greenberg, 2009, Hum. Gene Ther. 20:1240-1248). Otros beneficios de la terapia génica incluyen la capacidad de utilizar poblaciones definidas de linfocitos T capaces de persistir a largo plazo. *in vivo* (Berger *et al.*, 2008, J. Clin. Invest. 118:294-305; Hinrichs *et al.*, 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:17469-17474). Estos linfocitos T se pueden transducir con genes que codifican TCR bien caracterizados que tienen una alta afinidad por antígenos tumorales, aumentando, de este modo, la probabilidad de mediar un efecto antitumoral. De hecho, un informe reciente de terapia dirigida a leucemia de linfocitos B avanzada con linfocitos T modificados genéticamente que expresan un receptor quimérico de alta afinidad dirigido a un antígeno propio/tumoral ha destacado el potencial de utilizar linfocitos T de alta avidez modificados por ingeniería para el tratamiento de la leucemia (Kalos *et al.*, 2011, Sci. Transl. Med. 3:95ra73). Sin embargo, debido a que la mayoría de los antígenos tumorales a los que se dirige la inmunoterapia con linfocitos T son autoproteínas sobreexpresadas, los linfocitos T de alta afinidad específicos para estos antígenos generalmente están sujetos a selección negativa en el timo. Por lo tanto, una limitación significativa de las inmunoterapias basadas en linfocitos T, en general, es la disponibilidad limitada de linfocitos T que expresan un TCR endógeno con una afinidad suficientemente alta por antígenos tumorales no mutados.

Se han creado varias estrategias para potenciar la afinidad de los TCR destinados a su uso en terapia génica con TCR (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). Estos enfoques generalmente implican la generación de bibliotecas de mutantes de TCR que se han sometido a rondas de mutagénesis y la posterior selección de mutaciones que confieren una mayor afinidad por el ligando diana péptido/MHC. Las mutaciones se realizan generalmente en las regiones CDR que se sabe que interactúan con el péptido/MHC. Las regiones CDR1 y CDR2 entran en contacto predominantemente con la molécula MHC, mientras que la región CDR3 hipervariable entra en contacto principalmente con el péptido (Wucherpennig *et al.*, 2010, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2:a005140-a005140). Las estrategias de mutagénesis dirigida generalmente se dirigen a porciones seleccionadas de estas tres regiones, pero, aun así, no siempre tienen éxito en la generación de una variante de mayor afinidad, y las mejoras se limitan solamente a cambios en las regiones específicamente dirigidas. Además, las mutaciones introducidas en los restos de contacto con MHC tienen el riesgo de aumentar potencialmente la afinidad del TCR por MHC al tiempo que disminuyen la especificidad general del receptor por su péptido afín. En el mejor de los casos, la mayoría de las mutaciones introducidas para potenciar la afinidad de un TCR estarían restringidas a la región CDR3 por esta razón. Sin embargo, las metodologías actuales tienen una capacidad limitada para generar diversidad de CDR3, porque la mutagénesis dirigida está limitada por la longitud original de la región CDR3.

50 Weber *et al.*, (PNAS (2005) 102(52): 19033-19038) describieron un receptor de linfocitos T restringido de clase II modificado por ingeniería *in vitro* para obtener una mayor afinidad que conserva la especificidad por el péptido y la función.

Li *et al.*, (Nature Biotech (2005) 23(3): 349-354) describieron la evolución dirigida de los receptores de linfocitos T humanos con afinidades picomolares mediante presentación en fagos.

55 Dada la dificultad de aislar linfocitos T de alta afinidad que reconocen antígenos asociados a tumores de interés, existe una necesidad continua de métodos alternativos para generar TCR con afinidad potenciada.

Breve resumen

60 La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para generar un TCR con afinidad potenciada que comprende: a) poner en contacto células progenitoras hematopoyéticas con células estromales y un antígeno peptídico, en condiciones y durante un tiempo suficiente para inducir la diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas en timocitos DN TCRαβ+, en donde las células progenitoras hematopoyéticas comprenden una

secuencia de un ácido nucleico no endógeno que codifica una cadena TCR α de un TCR precursor específico para el antígeno peptídico, y en donde las células estromales comprenden una secuencia de un ácido nucleico no endógeno que codifica Delta-like-1 o Delta-like-4 y una secuencia de un ácido nucleico que codifica una molécula MHC; b) aislar secuencias de los ácidos nucleicos que codifican las diversas cadenas TCR β de los timocitos DN TCR $\alpha\beta$ + e introducir las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas TCR β en células que son capaces de expresar un TCR en la superficie celular y que comprenden la secuencia del ácido nucleico que codifica la cadena TCR α de la etapa a); e identificar TCR con afinidad potenciada (por ejemplo, detectando o seleccionando un candidato de TCR $\alpha\beta$ de alta afinidad mediante un ensayo de tetrámeros de MHC, y midiendo después, la afinidad de unión en comparación con un TCR $\alpha\beta$ precursor).

En aspectos adicionales, se proporcionan TCR con afinidad potenciada generados por los métodos divulgados en el presente documento, que pueden estar unidos a células o en forma soluble, y pueden tener además codones optimizados para potenciar la expresión en linfocitos T.

En otros aspectos más, los TCR con afinidad potenciada de la presente divulgación pueden usarse para tratar una enfermedad (tal como cáncer, enfermedad infecciosa o enfermedad autoinmunitaria) en un sujeto mediante la administración de una composición que comprende los TCR con afinidad potenciada. En realizaciones adicionales, los TCR con afinidad potenciada de la presente divulgación pueden usarse en métodos de diagnóstico o en métodos de obtención de imágenes, incluyendo estos métodos usados en relación con las indicaciones o condiciones identificadas en el presente documento.

Estos y otros aspectos se harán evidentes al hacer referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos

Breve descripción de los dibujos

FIGURAS 1A-D: Los timocitos de ratones transgénicos OT-1 se clasificaron para obtener células progenitoras DN1 y DN2 TCR β -TCR $\gamma\delta$ -CD4⁻CD8⁻CD117⁺CD44⁺ y se cultivaron en células OP9-DL1 que expresan la molécula MHC de clase I H-2Kb durante 20 días en presencia de diversas concentraciones de péptido SIINFEKL de ovalbúmina (SEQ ID NO: 1) como se indica. **(A, B, C)** Los cultivos se analizaron mediante citometría de flujo en los puntos temporales indicados. **(D)** La celularidad total de cada cultivo se determinó en el día 20 de cultivo.

FIGURA 2: Se cultivaron timocitos DP CD69⁻ que aún no han pasado por la selección positiva clasificados a partir de ratones transgénicos B6 u OT-1 en células OP9-DL1 que expresan la molécula MHC de clase I H-2Kb en presencia de péptido SIINFEKL de ovalbúmina (SEQ ID NO: 1).

FIGURAS 3A-C: Los timocitos B6 se clasificaron para obtener células progenitoras DN1 y DN2 CD4⁻CD8⁻CD117⁺CD44⁺ y se transdujeron con la cadena TCR α del clon TCR 3D específico de WT1 con afinidad potenciada, y se cultivaron en células OP9-DL1 que expresan la molécula MHC de clase I H-2Db en presencia o ausencia de péptido WT 1 RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) 1 μ M. **(A)** El día 16 de cultivo, se analizaron células transducidas (hCD2⁺) y no transducidas (hCD2⁻) mediante citometría de flujo. **(B)** El día 21 de cultivo de OP9-DL1 en presencia de péptido RMFPNAPYL de WT1 1 μ M (SEQ ID NO: 2), las células DN TCR $\alpha\beta$ ⁺ se clasificaron de acuerdo con el esquema indicado. **(C)** Las células clasificadas se lisaron, se aisló el ADN y se realizó la PCR utilizando un cebador directo específico de Vb 10 y un cebador inverso específico de Cb2. El producto de PCR de Vb10 se clonó después direccionalmente con TOPO en el vector pENTR/D-TOPO, se transfirió al vector retroviral MigR1-attR usando tecnología Gateway®, y se generó el sobrenadante retroviral y se usó para transducir células murinas 58^{-/-} para el varias de la biblioteca como se describe.

FIGURAS 4A-C: La biblioteca de TCR β de retrovirus se utilizó para transducir células 58^{-/-} CD8⁺3D α ⁺. **(A)** Las células transducidas se clasificaron inicialmente solamente en función de la expresión de GFP (por sus siglas en inglés) (datos no mostrados), seguido de dos clasificaciones adicionales en función de la expresión de GFP y alta expresión de tetrámeros MHC-péptido WT1 como se indica. Las células 58^{-/-} clasificadas también se analizaron para la tinción con el tetrámero de MHC H2Db-péptido no específico pero específico para GP33 como control para determinar la unión no específica del tetrámero. **(B)** Análisis de secuencia de cadenas TCR β aisladas. **(C)** Se identificaron cuatro cadenas TCR β candidatas mediante análisis de secuencia y se transfirieron de nuevo al vector retroviral MigR1-attR. Se generó sobrenadante retroviral y se usó para transducir células 58^{-/-} CD8⁺3D α ⁺.

FIGURAS 5A-C: **(A)** La afinidad relativa de los tres TCR de mayor afinidad se determinó tiñendo cada línea celular transducida con tetrámero de MHC-péptido seguido por citometría de flujo. Las mediciones de K_D se realizaron utilizando seis diluciones dobles de tetrámeros conjugados con PE, y los valores de K_D aparente se determinaron a partir de curvas de unión por regresión no lineal, como la concentración de ligando que producía la mitad de la unión máxima. **(B)** La cadena TCR β de mayor afinidad (clon n.º 1) tenía codones optimizados, y la unión del tetrámero se comparó con la construcción 3D $\alpha\beta$ con afinidad potenciada original. **(C)** Las células 58^{-/-} transducidas con cada una de las cadenas TCR β candidatas emparejadas con 3D α se tiñeron con tetrámero de MHC-péptido WT1 específico, así como con varios tetrámeros MHC H-2Db-péptido no específicos para evaluar la posible reactividad independiente de péptidos hacia MHC.

FIGURAS 6A-B: Análisis de la expresión de CD4 y CD8 de timocitos TCR β ⁺**(A)** y esplenocitos **(B)** de ratones retrogénicos 3D-PYY α -IRES-hCD2 y 7431 α -IRES-hCD2. Expresión de V β 10 y V β 9 de timocitos de TCR β ⁺**(A)** de ratones retrogénicos 3D-PYY α -IRES-hCD2 y 7431 α -IRES-hCD2.

FIGURA 7: Análisis de esplenocitos de ratones retrogénicos después de 6 días de estimulación con péptido de mesotelina WT1 +IL2 *in vitro*.

Descripción detallada

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones para generar TCR potenciados o de alta afinidad, en los que la cadena TCR α de un TCR específico de antígeno se usa para seleccionar *de novo* cadenas TCR β generadas que se emparejan con una cadena TCR α específica de antígeno durante la producción de linfocitos T *in vitro*, para formar nuevos receptores con afinidad potenciada que puedan impulsar ventajosamente la maduración de linfocitos T independiente de selección negativa a través de un proceso de selección novedoso para dirigirse a un antígeno de interés.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para generar un receptor de linfocitos T (TCR) con afinidad potenciada cultivando células progenitoras hematopoyéticas (que contienen una secuencia de un ácido nucleico no endógeno que codifica una cadena TCR α específica de antígeno) con células estromales (que contienen una secuencia de un ácido nucleico no endógeno que codifica Delta-like-1 o Delta-like-4 y una secuencia de un ácido nucleico que codifica una molécula MHC) en presencia de un antígeno peptídico, que inducirá la diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas en timocitos DN TCR $\alpha\beta$ +. A continuación, las secuencias del ácido nucleico que codifican diversas cadenas TCR β de los timocitos DN TCR $\alpha\beta$ se aíslan y se introducen en células que son capaces de expresar un TCR en la superficie celular y también expresan la cadena TCR α indicada anteriormente. Finalmente, un TCR con afinidad potenciada se identifica comparando la afinidad de unión del TCR $\alpha\beta$ candidato con el TCR $\alpha\beta$ precursor.

Adicionalmente, esta divulgación proporciona TCR con afinidad potenciada generados utilizando tales métodos, así como composiciones y métodos para usar los TCR con afinidad potenciada de la presente divulgación en diversas aplicaciones terapéuticas, incluyendo el tratamiento de una enfermedad en un sujeto (por ejemplo, cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmunitaria).

Antes de exponer la presente divulgación con más detalle, puede ser útil para la comprensión de la misma, proporcionar definiciones de determinados términos que se utilizarán en el presente documento. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la presente divulgación.

En la presente descripción, los términos "aproximadamente" y "que consiste/n esencialmente en" significan ± 20 % del intervalo, valor o estructura indicados, a menos que se indique lo contrario. Debe entenderse que los términos "un", "una" y "uno" tal como se usan en el presente documento se refieren a "uno o más" de los componentes enumerados. El uso de la alternativa (*p.ej.*, "o") debe entenderse que significa bien uno, ambos o cualquier combinación de los mismos de las alternativas. Como se usa en el presente documento, los términos "incluir", "tener" y "comprender" se utilizan como sinónimos, y estos términos y variantes de los mismos deben interpretarse como no limitantes.

"Receptor de linfocitos T" (TCR) se refiere a una molécula que se encuentra en la superficie de los linfocitos T que, en asociación con CD3, generalmente es responsable de reconocer los antígenos unidos a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El TCR tiene un heterodímero de las cadenas α y β (también conocidas como TCR α y TCR β , respectivamente) altamente variables unidas por enlaces disulfuro en la mayoría de los linfocitos T. En un pequeño subconjunto de linfocitos T, el TCR está compuesto por un heterodímero de cadenas γ y δ variables (también conocidas como TCR γ y TCR δ , respectivamente). Cada cadena del TCR es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas y posee un dominio variable de inmunoglobulina aminoterminal, un dominio constante de inmunoglobulina, una región transmembrana y una cola citoplasmática corta en el extremo carboxiterminal (véase Janeway *et al.*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3ª ed., Current Biology Publications, págs. 4:33, 1997). El TCR, como se usa en la presente divulgación, puede ser de diversas especies animales, incluyendo ser humano, ratón, rata u otros mamíferos. Un TCR puede estar unido a células o en forma soluble.

Los TCR y los dominios de unión de los mismos de la presente divulgación pueden ser "inmunoespecíficos" o capaces de unirse en un grado deseado, incluyendo la "unión específica o selectiva" a una diana sin unirse de manera significativa a otros componentes presentes en una muestra de prueba, si se unen a una molécula diana con afinidad o con K_a (es decir, una constante de asociación en equilibrio de una interacción de unión particular con unidades de 1/M) de, por ejemplo, mayor que o igual a aproximadamente 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 $^{-1}$, o 10^{13} M $^{-1}$. Los dominios de unión de "alta afinidad" se refieren a los dominios de unión con una K_a de al menos 10^7 M $^{-1}$, al menos 10^8 M $^{-1}$, al menos 10^9 M $^{-1}$, al menos 10^{10} M $^{-1}$, al menos 10^{11} M $^{-1}$, al menos 10^{12} M $^{-1}$, al menos 10^{13} M $^{-1}$, o mayor. Como alternativa, la afinidad puede definirse como una constante de disociación en equilibrio (K_d) de una interacción de unión en particular con unidades de M (*p.ej.*, 10^{-5} M a 10^{-13} M). Las afinidades de los TCR y de los polipéptidos del dominio de unión de acuerdo con la presente divulgación se pueden determinar fácilmente usando técnicas convencionales (véase, *por ejemplo*, Scatchard *et al.* (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; y las patentes de EE.UU. N.º 5.283.173; 5.468.614, Análisis Biacore® o el equivalente). Por lo tanto, "receptor de linfocitos T con afinidad potenciada" (TCR con afinidad potenciada) se refiere a un TCR seleccionado o modificado por ingeniería con una unión más fuerte a un antígeno diana que el TCR de tipo silvestre (o precursor). La afinidad potenciada puede estar indicada por un TCR con una K_a (constante de asociación de equilibrio) por el antígeno diana más alta que la del TCR de tipo silvestre (también llamado precursor u original), un TCR con una K_d (constante de disociación) para el antígeno diana menor que la del TCR de tipo silvestre (también llamado precursor u original), o con una velocidad de disociación

(K_{off}) para el antígeno diana menor que la del TCR de tipo silvestre (o precursor).

Las "moléculas del complejo principal de histocompatibilidad" (moléculas MHC) se refieren a glicoproteínas que suministran antígenos peptídicos a la superficie celular. Las moléculas MHC de clase I son heterodímeros que consisten en una cadena α transmembrana (con tres dominios α) y una microglobulina $\beta 2$ asociada de manera no covalente. Las moléculas MHC de clase II están compuestas por dos glicoproteínas transmembrana, α y β , que atraviesan la membrana. Cada cadena tiene dos dominios. Las moléculas MHC de clase I suministran péptidos que se originan en el citosol a la superficie celular, donde el complejo péptido:MHC es reconocido por los linfocitos T CD8+. Las moléculas MHC de clase II suministran péptidos que se originan en el sistema vesicular a la superficie celular, donde son reconocidos por los linfocitos T CD4+. Una molécula MHC puede ser de diversas especies animales, incluyendo ser humano, ratón, rata u otros mamíferos.

Una "célula progenitora hematopoyética" es una célula derivada de células madre hematopoyéticas o de tejido fetal que es capaz de diferenciarse adicionalmente en tipos celulares maduros (por ejemplo, células del linaje de linfocitos T). En una realización particular, Se utilizan células progenitoras hematopoyéticas CD24^{lo} Lin⁻CD117⁺. Las células progenitoras hematopoyéticas pueden ser de diversas especies animales, incluyendo ser humano, ratón, rata u otros mamíferos.

Una "célula progenitora de timocitos" o "timocito" es una célula progenitora hematopoyética presente en el timo.

Las "células madre hematopoyéticas" se refieren a células hematopoyéticas indiferenciadas que son capaces de propagarse de forma esencialmente ilimitada. *in vivo* o *ex vivo* y capaces de diferenciarse a otros tipos celulares, incluyendo las células del linaje de linfocitos T. Las células madre hematopoyéticas pueden aislarse de, por ejemplo, hígado fetal, médula ósea y sangre del cordón.

"Células de linaje de linfocitos T" se refiere a células que muestran al menos una característica fenotípica de un linfocito T o un precursor o progenitor del mismo que distingue las células de otras células linfoides y células de los linajes eritroide o mielóide. Tales características fenotípicas pueden incluir la expresión de una o más proteínas específicas para los linfocitos T (por ejemplo, CD8⁺), o una característica fisiológica, morfológica, funcional o inmunitaria específica de un linfocito T. Por ejemplo, las células del linaje de linfocitos T pueden ser células progenitoras o precursoras comprometidas con el linaje de linfocitos T; linfocitos T CD25⁺ inmaduros e inactivados; células que han experimentado compromiso con el linaje CD4 o CD8; células progenitoras de timocitos que son doble positivas CD4⁺ CD8⁺; simples positivas CD4⁺ o CD8⁺; TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$; o linfocitos T maduros y funcionales o activados.

Las "células estromales" son células de tejido conectivo de cualquier órgano. En una realización particular, las células estromales son células estromales de la médula ósea. Ejemplos de líneas de células estromales que pueden modificarse por ingeniería para expresar DLL1 o DLL4 incluyen la línea de células estromales de ratón MS5 (Itoh, *et al.*, Exp. Hematol. 1989, 17:145-153) y S17, y las líneas de células estromales humana HGS2.11, HGS2.52, HGS.18, HGS3.30, HGS3.65, HGS.3.66, HGS3.103 y HGS3.114 (disponibles en Human Genome Sciences Inc., MD, véase la solicitud publicada de Estados Unidos 20020001826). En una realización particular, células OP9 (Kodama *et al.*, 1994, Exp. Hematol. 22:979-984; disponibles en el depósito de células RIKEN). Las células OP9 que expresan DLL1 y DLL4 se han descrito previamente (véase, por ejemplo, Schmitt *et al.*, 2002, Immunity: 17:749-756; patente de Estados Unidos n.º 7.575.925)

Los "timocitos doble negativos TCR $\alpha\beta$ " (timocitos DN TCR $\alpha\beta$) se refieren a una población de timocitos que no expresan los correceptores CD4 y CD8, pero expresan cadenas TCR α y β .

"Antígeno peptídico" se refiere a una secuencia de aminoácidos, que varía desde aproximadamente 7 aminoácidos hasta aproximadamente 25 aminoácidos de longitud que se reconoce específicamente por un TCR, o dominios de unión del mismo, como un antígeno, y que puede derivar de o basarse en un fragmento de una molécula biológica diana más larga (*p.ej.*, polipéptido, proteína) o derivado de la misma. Un antígeno puede expresarse en la superficie de una célula, dentro de una célula, o como una proteína de membrana integral. Un antígeno puede proceder del hospedador (*p.ej.*, antígeno tumoral, antígeno autoinmunitario) o tienen un origen exógeno (*p.ej.*, bacteriano, vírico).

"Secuencia de un ácido nucleico", o polinucleótidos, puede estar en forma de ARN o ADN, que incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético. La secuencia de un ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria, y si es monocatenaria, puede ser la hebra codificante o la hebra no codificante (antisentido). Una secuencia codificante puede ser idéntica a la secuencia codificante conocida en la técnica o puede ser una secuencia codificante diferente, que, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, o mediante corte y empalme, codifica el mismo polipéptido.

"No endógeno/a" se refiere a una molécula (*p.ej.*, secuencia de un ácido nucleico) que no está presente en la o las células hospedadoras/muestra en la que se introduce una molécula, por ejemplo, introducida de forma recombinante. Una molécula no endógena puede ser de la misma especie o de una especie diferente.

Los ligandos de Notch "Delta-like-1" (DL1 o DLL1) y "Delta-like-4" (DL4 o DLL4) son homólogos del ligando de Notch

Delta y son miembros de la familia de proteínas delta/serrate/jagged. Desempeñan un papel en la mediación de las decisiones sobre el destino celular durante la hematopoyesis y pueden desempeñar un papel en la comunicación de célula a célula. Secuencias de Delta-like-1 ilustrativas incluyen los números de acceso de Genbank NM_005618.3 (SEQ ID NO: 3) y NP_005609.3 (SEQ ID NO: 4) (*secuencia de transcrito y de proteína de Homo sapiens*, respectivamente) y números de acceso de Genbank NM_007865.3 (SEQ ID NO: 5) y NP_031891.2 (SEQ ID NO: 6) (*secuencia de transcrito y de proteína de Mus musculus*, respectivamente). Secuencias de Delta-like-4 ilustrativas incluyen los números de acceso de Genbank NM_019074.3 (SEQ ID NO: 7) y NP_061947.1 (SEQ ID NO: 8) (*secuencias de transcrito y de proteína de Homo sapiens*, respectivamente) y números de acceso de Genbank NM_019454.3 (SEQ ID NO: 9) y NP_062327.2 (SEQ ID NO: 10) (*secuencias de transcrito y de proteína de Mus musculus*, respectivamente). Los ligandos de Notch están disponibles comercialmente o pueden producirse mediante técnicas convencionales de ADN recombinante y purificarse en diversos grados.

"Células madre embrionarias" o "células ES" o "ESC" se refieren a células madre embrionarias indiferenciadas que tienen la capacidad de integrarse y formar parte de la línea germinal de un embrión en formación. Las células madre embrionarias son capaces de diferenciarse en células progenitoras hematopoyéticas.

"WT1" se refiere al tumor de Wilm 1, un factor de transcripción que contiene cuatro motivos de dedos de zinc en el extremo carboxiterminal y un dominio de unión a ADN rico en prolina/glutamina en el extremo aminoterminal. WT1 tiene un papel esencial en el desarrollo normal del sistema urogenital y está mutado en un pequeño subconjunto de pacientes con tumores de Wilms. Se ha observado una alta expresión de WT1 en diversos cánceres, incluyendo, cáncer de mama, cáncer de ovario, leucemias agudas, neoplasias vasculares, melanomas, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, sarcoma de huesos y tejidos blandos y cáncer de esófago. Se ha observado un corte y empalme alternativo para WT1. Secuencias de WT1 ilustrativas incluyen los números de acceso de Genbank: NM_000378.4 (SEQ ID NO: 11) (transcrito humano, NP_000369.3 (SEQ ID NO: 12) (proteína humana); NM_024424.3 (SEQ ID NO: 13) (transcrito humano, NP_077742.2 (SEQ ID NO: 14) (proteína humana); NM_024426.4 (SEQ ID NO: 15) (transcrito humano, NP_077744.3 (SEQ ID NO: 16); NM_001198552.1 (SEQ ID NO: 17), NP_001185481.1 (SEQ ID NO: 18) (proteína humana); NM_001198551.1 (SEQ ID NO: 19) (transcrito humano, NP_001185480.1 (SEQ ID NO: 20) (proteína humana); NM_144783.2 (SEQ ID NO: 21) (transcrito de ratón) y NP_659032.3 (SEQ ID NO: 22) (proteína de ratón).

"Mesotelina" (MSLN) se refiere a un gen que codifica una proteína precursora que se escinde en dos productos, factor potenciador de megacariocitos y mesotelina. El factor de potenciación de megacariocitos funciona como una citocina que puede estimular la formación de colonias en los megacariocitos de la médula ósea. La mesotelina es una proteína de la superficie celular anclada al glicosilfosfatidilinositol que puede funcionar como una proteína de adhesión celular. Esta proteína se sobreexpresa en mesoteliomas epiteliales, cánceres de ovario y en carcinomas de células escamosas específicos. El corte y empalme alternativo da como resultado múltiples variantes de transcritos. Secuencias de mesotelina ilustrativas incluyen los números de acceso de Genbank: NM_001177355.1 (SEQ ID NO: 23), NP_001170826.1 (SEQ ID NO: 24) (secuencias de transcrito y de preproteína humanos, respectivamente); NM_005823.5 (SEQ ID NO: 25), NP_005814.2 (SEQ ID NO: 26) (secuencias de transcrito y de preproteína humanos, respectivamente); NM_013404.4 (SEQ ID NO: 27), NP_037536.2 (SEQ ID NO: 28) (secuencias de transcrito y de preproteína humanos, respectivamente); NM_018857.1 (SEQ ID NO: 29), NP_061345.1 (SEQ ID NO: 30) (secuencias de transcrito y de proteína precursora de ratón, respectivamente).

"Tinción de tetrámeros MHC-péptido" se refiere a un ensayo utilizado para detectar linfocitos T específicos de antígeno, que presenta un tetrámero de moléculas MHC, comprendiendo cada una un péptido idéntico que tiene una secuencia de aminoácidos que es afín (por ejemplo, idéntica a o relacionada con) a al menos un antígeno, en donde el complejo es capaz de unirse a linfocitos T específicos para el antígeno afín. Cada una de las moléculas de MHC se puede etiquetar con una molécula de biotina. Los MHC/péptidos biotinilados se tetramerizan mediante la adición de estreptavidina, que normalmente está marcada con fluorescencia. El tetrámero puede detectarse mediante citometría de flujo a través del marcador fluorescente. En determinadas realizaciones, se usa un ensayo de tetrámeros de MHC-péptido para detectar o seleccionar TCR de alta afinidad de la presente divulgación.

Métodos para generar TCR con afinidad potenciada

Como antecedente, durante la formación de linfocitos T en el timo, los timocitos progenitores están sujetos a varios puntos de control mediados por TCR. El primero de ellos se denomina selección β y se produce en la etapa 3 doble negativa (DN3) de la formación de los linfocitos T murinos. Las células DN3 que producen un reordenamiento exitoso en el locus del gen *Tcrb* pueden expresar la proteína TCR β en la superficie celular emparejada con la preproteína T α invariante. Este receptor se denomina pre-TCR y envía señales de manera independiente del ligando para promover la proliferación, diferenciación de las células del linaje $\alpha\beta$ a la etapa de doble positivo (DP) CD4/CD8, y el reordenamiento en el locus del gen *Tcra* (Boehmer *et al.*, 1999, Curr. Opin. Immunol. 11:135-142). Mientras que el locus TCR α está inactivo y cerrado a los reordenamientos del gen TCR antes de la selección β , tanto los loci TCR γ como δ también experimentan reordenamientos en la etapa de formación DN3, y los reordenamientos exitosos en ambos locus dan como resultado la expresión de un $\gamma\delta$ -TCR maduro que puede proporcionar señales que impulsan la diferenciación hacia el linaje $\gamma\delta$ de linfocitos T. Los linfocitos T no se diferencian a través de una etapa de DP durante la formación y generalmente permanecen DN o CD8 $\alpha\alpha$ +. La decisión del destino de las células $\alpha\beta/\gamma\delta$ está

determinada por la fuerza de la señal de TCR en esta etapa de formación, ya que el linfocito T en formación distingue entre una señal pre-TCR y una señal $\gamma\delta$ TCR por la señal más fuerte asociada con el $\gamma\delta$ TCR maduro (Pennington, Silva-Santos, & Hayday, 2005, Curr. Opin. Immunol. 17:108-115). Curiosamente, muchos ratones transgénicos con TCR $\alpha\beta$ tienen una gran población de células CD4/CD8 doble negativas (DN) CD24⁻ TCR $\alpha\beta$ positivas en el timo, que se ha demostrado que representan células "aspirantes a $\gamma\delta$ " que se forman como resultado de la señal más fuerte del TCR $\alpha\beta$ transgénico maduro en el punto de control de selección β (Egawa *et al.*, 2000, PLOS One 3:1512).

En el presente documento se divulga un método para generar TCR con afinidad potenciada, en donde la expresión ectópica de una cadena TCR α específica de antígeno antes de la selección β permite la formación de linfocitos T que expresan un TCR de alta afinidad por el mismo antígeno cuando se diferencian en presencia del antígeno afin durante la diferenciación de linfocitos T *in vitro*. Usando este método, Los linfocitos T que expresan receptores de alta afinidad evitan la selección negativa adoptando un destino de linaje DN TCR $\alpha\beta$ + en respuesta a señales agonistas en la etapa DN3 de la formación de los linfocitos T.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para generar un TCR con afinidad potenciada que comprende: a) poner en contacto células progenitoras hematopoyéticas con células estromales y un antígeno peptídico, en condiciones y durante un tiempo suficiente para inducir la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas en timocitos DN TCR $\alpha\beta$ +, en donde las células progenitoras hematopoyéticas comprenden una secuencia de un ácido nucleico no endógeno que codifica una cadena TCR α de un TCR precursor específico para el antígeno peptídico, y en donde las células estromales comprenden una secuencia de un ácido nucleico no endógeno que codifica Delta-like-1 o Delta-like-4 y una secuencia de un ácido nucleico que codifica una molécula MHC; b) aislar secuencias de los ácidos nucleicos que codifican las diversas cadenas TCR β de los timocitos DN TCR $\alpha\beta$ + e introducir las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas TCR β en células que son capaces de expresar un TCR en la superficie celular y comprenden la secuencia del ácido nucleico que codifica la cadena TCR α de la etapa a); e identificar el TCR con afinidad potenciada (por ejemplo, detectando o seleccionando candidatos de TCR $\alpha\beta$ de alta afinidad mediante un ensayo de tetrámeros de MHC, y midiendo después, la afinidad de unión en comparación con un TCR $\alpha\beta$ precursor).

En determinadas realizaciones, las células progenitoras hematopoyéticas comprenden células progenitoras de timocitos. En otras realizaciones, las células progenitoras hematopoyéticas derivan de tejido hepático fetal. En otras realizaciones, las células progenitoras hematopoyéticas comprenden células madre hematopoyéticas que derivan o se originan en la médula ósea, sangre del cordón umbilical o sangre periférica. En otras realizaciones más, las células progenitoras hematopoyéticas derivan de seres humanos, ratón, rata u otros mamíferos. En una realización particular, se utilizan células progenitoras de timocitos CD24^{lo} Lin⁻CD117⁺.

Las células progenitoras hematopoyéticas se han modificado para comprender una secuencia de un ácido nucleico no endógeno que codifica una cadena TCR α de un TCR precursor específico para el antígeno peptídico. En una realización específica, la cadena TCR β también se aísla del TCR precursor. La clonación de cadenas TCR α y β se puede realizar usando técnicas de biología molecular convencionales que se conocen en la técnica. Los métodos para clonar cadenas de TCR se conocen en la técnica (véanse, p.ej, Walchli *et al.*, 2011, PLoS ONE 6:e27930; Birkholz *et al.*, 2009, J. Immunol. Methods 346:45-54; Kurokawa *et al.*, 2001, Clin. Exp. Immunol. 123:340-345).

Una "célula estromal" es una célula de tejido conectivo de cualquier órgano. Las células estromales que pueden usarse de acuerdo con la invención incluyen células estromales humanas y de ratón. Ejemplos de líneas de células estromales que pueden modificarse por ingeniería para expresar DL1 o DL4 incluyen la línea de células estromales de ratón MS5 (Itoh, *et al.*, Exp. Hematol. 1989, 17:145-153) y S17, y las líneas de células estromales humana HGS2.11, HGS2.52, HGS.18, HGS3.30, HGS3.65, HGS.3.66, HGS3.103 y HGS3.114 (disponibles en Human Genome Sciences Inc., MD, véase la solicitud publicada de Estados Unidos 20020001826). En determinadas realizaciones, las células estromales son células estromales de la médula ósea. En realizaciones adicionales, se utilizan células OP9.

En determinadas realizaciones, las células estromales comprenden secuencias de los ácidos nucleicos no endógenos que codifican DL1, tal como DL1 humana. Secuencias de Delta-like-1 ilustrativas incluyen los números de acceso de Genbank NM_005618.3 (SEQ ID NO: 3) y NP_005609.3 (SEQ ID NO: 4) (*secuencia de transcrito y de proteína de Homo sapiens*, respectivamente) y números de acceso de Genbank NM_007865.3 (SEQ ID NO: 5) y NP_031891.2 (SEQ ID NO: 6) (*secuencia de transcrito y de proteína de Mus musculus*, respectivamente). En determinadas realizaciones, las células estromales comprenden secuencias de los ácidos nucleicos no endógenos que codifican DL4, tal como DL4 humana. Secuencias de Delta-like-4 ilustrativas incluyen los números de acceso de Genbank NM_019074.3 (SEQ ID NO: 7) y NP_061947.1 (SEQ ID NO: 8) (*secuencias de transcrito y de proteína de Homo sapiens*, respectivamente) y números de acceso de Genbank NM_019454.3 (SEQ ID NO: 9) y NP_062327.2 (SEQ ID NO: 10) (*secuencias de transcrito y de proteína de Mus musculus*, respectivamente). Los ligandos de Notch están disponibles comercialmente o pueden producirse mediante técnicas convencionales de ADN recombinante y purificarse en diversos grados.

En otras realizaciones adicionales, las células estromales son células OP9 o un derivado de las mismas que expresan DL1, tal como DL1 humana. Las células OP9 que expresan DL1 y DL4 se han descrito previamente (Schmitt *et al.*, 2002, Immunity 17:749-756; patente de EE.UU. N.º 7.575.925).

En determinadas realizaciones, las células estromales también comprenden una secuencia de un ácido nucleico que codifica una molécula MHC. En realizaciones particulares, las células estromales comprenden una secuencia de un ácido nucleico que codifica una molécula MHC de clase I y, opcionalmente, también pueden comprender una secuencia de un ácido nucleico que codifica una $\beta 2$ microglobulina. Las moléculas MHC de clase I y de $\beta 2$ microglobulina pueden derivar de moléculas MHC de clase I humanas, de ratón, de rata o de otras especies de mamíferos, cuyos genes y secuencias de proteínas se conocen en la técnica. En otras realizaciones, las células estromales comprenden una secuencia de un ácido nucleico que codifica una molécula MHC de clase II. La molécula MHC de clase II pueden derivar de moléculas MHC humanas, de ratón, de rata o de otras especies de mamíferos, cuyos genes y secuencias de proteínas se conocen en la técnica.

Un linfocito T determinado reconocerá un antígeno peptídico solamente cuando esté unido a la molécula MHC de una célula hospedadora (reconocimiento de antígeno restringido por MHC). Se selecciona un TCR precursor con especificidad por un antígeno peptídico conocido para potenciar la afinidad del TCR usando los métodos divulgados. Por lo tanto, también se selecciona una molécula MHC que se une al antígeno peptídico particular y se expresa en las células estromales para permitir el reconocimiento del antígeno restringido por MHC en el sistema *in vitro* divulgado. Los métodos para identificar una molécula MHC que se une a un antígeno peptídico se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Akatsuka *et al.*, 2002, Tissue Antigens 59:502-511). En determinadas realizaciones, una molécula MHC comprende HLA-A2 y beta-2 microglobulina, preferentemente de origen humano, que se puede unir a, por ejemplo, el péptido RMFPNAPYL de WT1 (SEQ ID NO: 2). En otras realizaciones, una molécula MHC comprende H-2D^B de ratón, que se puede unir a, por ejemplo, el péptido RMFPNAPYL de WT1 o a varios péptidos de mesotelina como se divulga en la fig. 3A de Hung *et al.*, 2007, Gene Therapy 14:921-929, o H-2K^B que se puede unir a, por ejemplo, varios péptidos de mesotelina como se divulga en la fig. 3A de Hung *et al.* Los posibles epítomos de mesotelina restringidos por H-2D^B divulgados en Hung *et al.* incluyen: ISKANVDVL (SEQ ID NO:42), GQKMNAQAI (SEQ ID NO:43), SAFQNVSGI (SEQ ID NO:44) y LLGPNIVDL (SEQ ID NO:45). Los posibles epítomos de mesotelina restringidos por H-2K^B divulgados en Hung *et al.* incluyen: EIPFTYEQL (SEQ ID NO:46) y GIPNGYLV (SEQ ID NO:47).

Un antígeno peptídico utilizado en los métodos divulgados se refiere a una secuencia peptídica de un antígeno o molécula biológica diana (por ejemplo, un polipéptido, proteína), al que el TCR precursor se une de manera específica. Una secuencia peptídica puede derivar de un antígeno que se expresa en la superficie celular, dentro de una célula, o que es una proteína de membrana integral. El antígeno puede ser un antígeno derivado del hospedador (*p.ej.*, un antígeno tumoral/canceroso y un antígeno autoinmunitario), o un antígeno exógeno (*p.ej.*, antígeno vírico, bacteriano, protozoario). Un antígeno tumoral o canceroso puede derivar de diversos cánceres, como los que se indican en el presente documento. En algunas realizaciones, un antígeno canceroso comprende un antígeno de leucemia. En determinadas realizaciones, un antígeno peptídico deriva del tumor de Wilms 1 (WT1), tal como un péptido de WT1 que comprende la secuencia de aminoácidos RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2). En otras realizaciones, un antígeno peptídico deriva de la mesotelina, tales como los péptidos de mesotelina descritos en la fig. 3A de Hung *et al.*, 2007, Gene Therapy 14:921-929. En algunas realizaciones, el péptido de mesotelina comprende la secuencia de aminoácidos GQKMNAQAI (SEQ ID NO: 31). En otras realizaciones, el péptido de mesotelina comprende una secuencia de aminoácidos que comprende ISKANVDVL (SEQ ID NO: 42), GQKMNAQAI (SEQ ID NO:43), SAFQNVSGI (SEQ ID NO:44) y LLGPNIVDL (SEQ ID NO:45), EIPFTYEQL (SEQ ID NO:46) o GIPNGYLV (SEQ ID NO:47). Los antígenos autoinmunitarios son antígenos que son reconocidos por TCR autorreactivos específicos para autoantígenos, con las consiguientes funciones efectoras inmunitarias que causan enfermedades autoinmunitarias, agravando la enfermedad autoinmunitaria, contribuyendo a la progresión de la enfermedad autoinmunitaria, causando o empeorando los síntomas asociados con la enfermedad autoinmunitaria. Por ejemplo, los TCR autorreactivos específicos para un péptido de colágeno pueden ser útiles para la terapia génica supresora de Treg en artritis reumatoide. Los antígenos autoinmunitarios también pueden ser antígenos localizados en otras células inmunitarias que causan enfermedades autoinmunitarias o median los síntomas de enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, linfocitos B que producen autoanticuerpos). Por ejemplo, los antígenos del péptido CD20 pueden ser útiles para generar TCR con afinidad potenciada que se dirigen a linfocitos B implicados o asociados con artritis reumatoide. Puede añadirse un antígeno peptídico a un sistema de cultivo de células progenitoras hematopoyéticas y células estromales como se describe en el presente documento. Como alternativa, se pueden usar células estromales que comprenden una secuencia de un ácido nucleico que codifica un antígeno peptídico de interés para expresar dicho antígeno en el cultivo celular. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, un antígeno peptídico, ya sea añadido como un antígeno peptídico exógeno al sistema de cultivo o expresado por células estromales, forma un complejo con una molécula MHC expresada por las células estromales para formar un complejo MHC-antígeno peptídico. El complejo MHC-antígeno peptídico permite el reconocimiento del antígeno peptídico restringido por MHC por los TCR en el sistema de cultivo. En determinadas realizaciones, las células OP9 se transducen con una secuencia de un ácido nucleico para expresar el péptido antigénico de WT1 RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2). En otras realizaciones, las células OP9 se transducen con una secuencia de un ácido nucleico para expresar el péptido antigénico de mesotelina GQKMNAQAI (SEQ ID NO: 31).

Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I tienen generalmente de aproximadamente 7 a aproximadamente 10 aminoácidos de longitud. Los péptidos que se unen a las moléculas del MHC de clase II son de longitud variable, por lo general de aproximadamente 10-25 aminoácidos de largo. En determinadas realizaciones, se conoce la especificidad del antígeno peptídico del TCR precursor. En otras realizaciones, la especificidad del antígeno

peptídico del TCR precursor necesita determinarse utilizando métodos conocidos en la técnica (Borras *et al.*, 2002, J. Immunol. Methods 267:79-97; Hiemstra *et al.*, 2000, Cur. Opin. Immunol. 12:80-4). Por ejemplo, si se conoce el antígeno diana de un TCR precursor, aunque no la secuencia peptídica específica, las bibliotecas de péptidos derivadas de la secuencia polipeptídica del antígeno diana pueden usarse para cribar e identificar el antígeno peptídico específico para el TCR precursor.

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico que es capaz de transportar otro ácido nucleico. Los vectores pueden ser, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, virus o fagos. Un "vector de expresión" es un vector que es capaz de dirigir la expresión de una proteína codificada por uno o más genes portados por el vector cuando está presente en el entorno apropiado.

Los "retrovirus" son virus que tienen un genoma de ARN. "Gammaretrovirus" se refiere a un género de la familia retroviridae. Gammaretrovirus ilustrativos incluyen, pero sin limitación, virus de células madre de ratón, virus de leucemia murina, virus de leucemia felina, virus de sarcoma felino y virus de reticuloendoteliosis aviar.

"Lentivirus" se refiere a un género de retrovirus que son capaces de infectar células en división y no en división. Varios ejemplos de lentivirus incluyen VIH (virus de inmunodeficiencia humana: incluyendo VIH de tipo 1 y VIH de tipo 2); virus de anemia infecciosa equina; virus de inmunodeficiencia felina (VIF); virus de inmunodeficiencia bovina (VIB); y virus de inmunodeficiencia de simios (VIS).

Un vector que codifica un virus central también se conoce como "vector vírico". Hay una gran cantidad de vectores víricos disponibles que son adecuados para su uso con la invención, incluyendo los identificados para aplicaciones de terapia génica en seres humanos, como los descritos por Pfeifer y Verma (Pfeifer, A. and I. M. Verma. 2001. Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 2:177-211). Los vectores víricos adecuados incluyen vectores basados en virus de ARN, tal como los vectores derivados de retrovirus, por ejemplo, vectores derivados del virus de leucemia murina (VLM) de Moloney, e incluyen vectores derivados de retrovirus más complejos, por ejemplo, vectores derivados de lentivirus. Los vectores derivados del VIH-1 pertenecen a esta categoría. Otros ejemplos incluyen vectores de lentivirus derivados del VIH-2, VIF, virus de anemia infecciosa equina, VIS y virus maedi/visna. Los métodos para usar vectores víricos retrovíricos y lentivíricos y células de empaquetamiento para transducir células diana de mamíferos con partículas víricas que contienen transgenes de TCR son bien conocidos en la técnica y se han descrito previamente, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 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. Las construcciones y los sistemas de expresión de vectores retrovíricos y lentivíricos también están disponibles comercialmente.

En una realización específica, se usa un vector vírico para introducir la secuencia de un ácido nucleico no endógeno que codifica la cadena TCR α específica para el antígeno peptídico en las células progenitoras hematopoyéticas. En otra realización, se usa un vector vírico para introducir una secuencia de un ácido nucleico no endógeno que codifica DL1 o DL4 y una secuencia de un ácido nucleico que codifica una molécula MHC en células estromales. El vector vírico puede ser un vector retrovírico o un vector lentivírico. El vector vírico también puede incluir una secuencia de un ácido nucleico que codifica un marcador para la transducción. Los marcadores de transducción para vectores víricos son conocidos en la técnica e incluyen marcadores de selección, que pueden conferir resistencia a fármacos o marcadores detectables, tales como proteínas de la superficie celular o marcadores fluorescentes que pueden detectarse mediante métodos como citometría de flujo. En una realización particular, el vector vírico comprende además un marcador génico para transducción que comprende proteína verde fluorescente o el dominio extracelular de CD2 humana. Cuando el genoma del vector vírico comprende más de una secuencia de un ácido nucleico para expresarse en la célula hospedadora como transcritos separados, el vector vírico también puede comprender una secuencia adicional entre los dos (o más) transcritos que permitan la expresión bicistónica o multicistónica. Ejemplos de dichas secuencias utilizadas en vectores víricos incluyen sitios internos de entrada al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés), sitios de escisión de furina, péptido 2A vírico.

También se pueden usar otros vectores para el suministro de polinucleótidos, incluyendo los vectores víricos de ADN, incluyendo, por ejemplo, vectores basados en adenovirus y vectores basados en virus adenoasociados (AAV, por sus siglas en inglés); vectores derivados de virus del herpes simple (VHS), incluyendo los vectores con amplicones, VHS con replicación defectuosa y VHS atenuado (Krisky *et al.*, 1998, Gene Ther. 5: 1517-30).

Otros vectores que se han producido recientemente para usos de terapia génica también pueden usarse con los métodos de esta divulgación. Dichos vectores incluyen los derivados de baculovirus y alfavirus. (Jolly D J. 1999. Emerging viral vectors. págs 209-40 en Friedmann T. ed. 1999. The development of human gene therapy. Nueva York: Cold Spring Harbor Lab).

Las células progenitoras hematopoyéticas se cultivan con células estromales que comprenden una secuencia de un ácido nucleico que codifica un DL1 o DL4 no endógenos y una secuencia de un ácido nucleico que codifica una molécula MHC en condiciones y durante un tiempo suficientes para inducir la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas en timocitos DN TCR $\alpha\beta$ +. En determinadas realizaciones, las células progenitoras hematopoyéticas se cultivan en una placa tratada con cultivo de tejidos de 6 cm o 10 cm. La concentración de células progenitoras

hematopoyéticas en el cultivo puede estar entre $1-10^9$ o 1×10^2 hasta 1×10^6 o 1×10^3 a 1×10^4 . En algunas realizaciones, las células progenitoras hematopoyéticas (aproximadamente de $1-5 \times 10^4$ células) se cultivan en una monocapa de células OP9 que expresan DL1.

- 5 También se pueden añadir al cultivo una o más citocinas que promueven el compromiso y la diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas. Las citocinas pueden derivar de seres humanos o de otras especies. La concentración de una citocina en cultivo puede oscilar entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 50 ng/ml. Ejemplos representativos de citocinas que pueden usarse incluyen: todos los miembros de la familia FGF, incluyendo FGF-4 y FGF-2; ligando Flt-3, factor citoblástico (SCF, por sus siglas en inglés, trombopoyetina (TPO) e IL-7. Las
- 10 citocinas se pueden usar en combinación con un glucosaminoglucano, tal como sulfato de heparina. Las citocinas están disponibles comercialmente o pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante y purificarse en diversos grados. Algunas citocinas pueden purificarse a partir de medios de cultivo de líneas celulares mediante técnicas bioquímicas convencionales.
- 15 Las células progenitoras hematopoyéticas se pueden cultivar en medio de cultivo que comprende medio acondicionado, medio no acondicionado o medio de células madre embrionarias. Ejemplos de medio acondicionado adecuado incluyen IMDM, DMEM o α MEM, condicionado con fibroblastos embrionarios (por ejemplo, fibroblastos embrionarios humanos), o medio equivalente. Ejemplos de medio no acondicionado adecuado incluyen medio de Dulbecco modificado de Iscove (IDMD, por sus siglas en inglés), DMEM, o α MEM, o medio equivalente. El medio de
- 20 cultivo puede comprender suero (*p.ej.*, suero bovino, suero bovino fetal, suero bovino de ternera, suero equino, suero humano o un sustituto de suero artificial) o puede ser sin suero.

Las condiciones de cultivo implican cultivar las células progenitoras hematopoyéticas durante un tiempo suficiente para inducir la diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas en timocitos DN TCR $\alpha\beta$ +. Las células se

25 mantienen en cultivo generalmente durante aproximadamente 4-5 días, preferentemente aproximadamente de 5 a 20 días. Se apreciará que las células se pueden mantener durante el tiempo necesario para lograr el resultado deseado, es decir, la composición celular deseada. Por ejemplo, para generar una composición celular que comprenda principalmente linfocitos T inmaduros e inactivados, las células se pueden mantener en cultivo durante aproximadamente 5 a 20 días. Las células se pueden mantener en cultivo durante 20 a 30 días para generar una

30 composición celular que comprenda principalmente linfocitos T maduros. Las células no adherentes también se pueden recoger del cultivo en varios puntos temporales, tal como desde aproximadamente varios días hasta aproximadamente 25 días. Se han descrito previamente métodos de cultivo para células madre hematopoyéticas en líneas de células estromales (patente de EE.UU. nº 7.575.925; Schmitt *et al.*, 2004, Nat. Immunol. 5:410-417; Schmitt *et al.*, 2002, Immunity 17:749-756).

35 Puede detectarse la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas en timocitos DN TCR $\alpha\beta$ y aislarse estas células usando métodos de citometría de flujo convencionales. Se pueden emplear una o más clasificaciones de células para aislar los timocitos DN TCR $\alpha\beta$ +. Por ejemplo, una primera clasificación celular puede identificar células progenitoras hematopoyéticas que expresan el marcador de transducción (es decir, marcador para la expresión de

40 TCR α). En determinadas realizaciones, un marcador de transducción es el dominio extracelular de CD2 humana. En realizaciones adicionales, las células positivas para el marcador de transducción pueden someterse a una segunda clasificación celular para cribar células que son CD4 $^{+}$ y CD8 $^{-}$. Una tercera clasificación de células en las células DN puede cribar células que expresen TCR β . Será evidente para un experto en la materia que se puede diseñar un subconjunto de estas clasificaciones, o clasificaciones de células sencillas o múltiples utilizando diferentes

45 combinaciones de marcadores de transducción o superficie celular, para identificar la subpoblación deseada de timocitos DN TCR $\alpha\beta$ +. Los métodos para clasificar células DN TCR $\alpha\beta$ se conocen en la técnica (documento US 7.575.925 y Schmitt *et al.*, 2002, Immunity: 17:749-756).

Las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican las diversas cadenas TCR β de los timocitos DN TCR $\alpha\beta$ se aíslan y se introducen en linfocitos T que comprenden la secuencia de un ácido nucleico que codifica la cadena TCR α del TCR precursor. Como se analiza en el presente documento, los métodos de clonación de cadenas TCR β a partir de células son bien conocidos en la técnica y se han descrito previamente. En determinadas realizaciones, una vez que las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas TCR β candidatas se han aislado de los timocitos DN TCR $\alpha\beta$ +, las secuencias de los ácidos nucleicos pueden someterse a un proceso de selección adicional mediante

55 el cual las cadenas TCR β con el mismo gen V β usado por la cadena TCR β precursor ase seleccionan para su introducción en linfocitos T. El gen V β precursor que contiene la cadena TCR β puede identificarse dentro de la población de células clasificadas usando cebadores específicos del gen V β para PCR. Una preocupación asociada con la potenciación de la afinidad de los TCR específicos de antígeno *in vitro* es que algunas modificaciones podrían aumentar la afinidad del receptor solamente por MHC, en lugar de por péptido/MHC, aumentando así la probabilidad

60 de que el TCR sea autorreactivo. Restringir las cadenas TCR β candidatas a las que contienen el gen V β precursor aumenta la probabilidad de conservar los dominios CDR1 y CDR2 de TCR que entran en contacto con el MHC, y limitar la variabilidad a CDR3. Como se analiza anteriormente, los vectores víricos, tal como vectores retrovíricos y lentivíricos, son adecuados para introducir las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican las diversas cadenas TCR β y/o el TCR α precursor en los linfocitos T. En algunas realizaciones, el vector vírico comprende además un

65 marcador génico para la transducción (por ejemplo, proteína verde fluorescente).

Las células que son capaces de expresar un TCR en la superficie celular se utilizan para la transformación o transducción con las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican las diversas cadenas TCR β de los timocitos DN TCR $\alpha\beta$.⁺ Las células que son capaces de expresar un TCR en la superficie celular expresan una molécula CD3. "CD3" es un complejo de múltiples proteínas de seis cadenas que están asociadas de forma estable con un TCR en la superficie celular. En mamíferos, el complejo comprende una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , dos CD3 ϵ y un homodímero de cadenas CD3 ζ . La CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ son proteínas de la superficie celular muy relacionadas de la superfamilia de inmunoglobulinas que contienen un solo dominio de inmunoglobulina. Las regiones transmembrana de CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ están cargadas negativamente, que es una característica que permite que estas cadenas se asocien con las cadenas de TCR cargadas positivamente. Los dominios citoplasmáticos de las cadenas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ contienen motivos de activación inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM, por sus siglas en inglés) que les permiten asociarse con proteínas tirosina cinasas citosólicas después de la estimulación de los receptores y, por lo tanto, enviar señales al interior de la célula. Las proteínas CD3 son necesarias para la expresión del TCR en la superficie celular (véase Janeway *et al.*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3ª ed., Current Biology Publications, págs. 4:39, 1997).

En algunas realizaciones, Las células que son capaces de expresar un TCR en la superficie celular son los linfocitos T, incluyendo células o líneas celulares primarias derivadas de seres humanos, ratón, rata u otros mamíferos. Si se obtiene de un mamífero, un linfocito T puede obtenerse de numerosas fuentes, incluyendo sangre, médula ósea, ganglio linfático, timo u otros tejidos o fluidos. Un linfocito T puede enriquecerse o purificarse. Las líneas de linfocitos T son bien conocidas en la técnica, algunos de los cuales se describen en Sandberg *et al.*, 2000, Leukemia 21:230-237. En determinadas realizaciones, se utilizan linfocitos T que carecen de expresión endógena de cadenas TCR α y β . Tales linfocitos T pueden carecer de forma natural de la expresión endógena de las cadenas TCR α y β o pueden haberse modificado para bloquear la expresión (*p.ej.*, linfocitos T de un ratón transgénico que no expresa cadenas α y β de TCR o una línea celular que se ha manipulado para inhibir la expresión de las cadenas α y β de TCR). En determinadas realizaciones, se utilizan células 58 $\alpha\beta$ -, una línea de linfocitos T murinas que carece de cadenas TCR α y TCR β endógenas, se utiliza (Letourneur y Malissen, 1989, Eur. J. Immunol. 19:2269-74). En otras realizaciones, se utiliza la línea de linfocitos T H9 (número de catálogo HTB-176, ATCC, Manassas, VA). En determinadas realizaciones, las células que son capaces de expresar un TCR en la superficie celular no son linfocitos T o células de un linaje de linfocitos T, sino células que se han modificado para expresar CD3, que permite la expresión de un TCR en la superficie celular (por ejemplo, células 293 o células 3T3). La expresión en la superficie celular de los TCR en células que no son de un linaje de linfocitos T se ha descrito previamente (Szymczak *et al.*, 2004, Nat. Biotechnol. 22:589-594).

Para identificar un posible TCR con afinidad potenciada, una vez que las células que son capaces de expresar un TCR en la superficie celular que también expresan la cadena TCR α precursora se han transformado o transducido con una biblioteca de cadenas TCR β candidatas, las células específicas de antígeno se clasifican o identifican usando tinción de tetrámeros de MHC-péptido. La tinción con tetrámeros de MHC-péptido presenta un tetrámero de moléculas MHC, comprendiendo cada una un péptido idéntico que tiene una secuencia de aminoácidos que es afín (*p.ej.*, idéntica o relacionada con) al menos a un antígeno, en donde el complejo es capaz de unirse a linfocitos T específicos para el antígeno afín. Cada una de las moléculas de MHC se puede etiquetar con una molécula de biotina. Los MHC/péptidos biotinilados se tetramerizan mediante la adición de estreptavidina, que normalmente está marcada con fluorescencia. El tetrámero puede detectarse mediante citometría de flujo a través del marcador fluorescente. Los métodos de tinción de tetrámeros de MHC-péptido para detectar linfocitos T específicos de antígeno son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Altman *et al.*, 1996, Science 274:94-96; Kalergis *et al.*, 2000, J. Immunol. Methods 234:61-70; Xu y Screaton, 2002, J. Immunol. Methods 268:21-8; James *et al.*, J. Vis. Exp.25:1167). En determinadas realizaciones, el tetrámero de MHC-péptido comprende moléculas MHC de clase I. En otras realizaciones, el tetrámero de MHC-péptido comprende moléculas MHC de clase II. En realizaciones adicionales, el mismo antígeno peptídico utilizado en la etapa de cultivo del método divulgado es el mismo que el péptido incorporado en el tetrámero de MHC-péptido. En otras realizaciones, la molécula MHC expresada por las células estromales en la etapa de cultivo del método divulgado es la misma que una molécula MHC en el tetrámero de MHC-péptido. Las células teñidas con tetrámeros de MHC-péptido pueden clasificarse mediante citometría de flujo una o más veces. Una primera clasificación puede seleccionar células transducidas que expresan un marcador de transducción detectable (por ejemplo, proteína verde fluorescente). Las células positivas a la transducción también pueden clasificarse una o más veces para determinar las células que expresan la misma cadena V β que el TCR precursor. Será evidente para un experto en la materia que se puede diseñar un subconjunto de estas clasificaciones, o clasificaciones de células sencillas o múltiples utilizando diferentes combinaciones de marcadores de transducción o superficie celular, para identificar la subpoblación deseada de células.

Un TCR con afinidad potenciada se identifica comparando la afinidad de unión del TCR $\alpha\beta$ candidato con el TCR $\alpha\beta$ precursor. Los linfocitos T específicos de antígeno pueden clonarse y secuenciarse después usando técnicas convencionales de biología molecular. Los clones de TCR β candidatas se pueden usar para transducir linfocitos T que comprenden la cadena TCR α precursora y puede utilizarse la tinción de tetrámeros de MHC-péptido para comparar los niveles de tinción con el TCR $\alpha\beta$ precursor, como se describe anteriormente. El aumento de tinción observado con una TCR β candidata puede ser indicativo de una afinidad potenciada en comparación con el TCR $\alpha\beta$ precursor. Sin embargo, si el TCR $\alpha\beta$ precursor tenía codones optimizados para aumentar la expresión en el linfocito T, puede que no sea posible la comparación directa de los niveles de tinción de los tetrámeros con la TCR β candidata. Las cadenas TCR β candidatas también pueden tener codones optimizados para la comparación directa con la TCR β precursora

Un TCR $\alpha\beta$ candidato tiene una afinidad potenciada en comparación con un TCR $\alpha\beta$ precursor si tiene una unión más fuerte al antígeno peptídico que el TCR $\alpha\beta$ precursor. La afinidad potenciada puede indicarse mediante un TCR con una K_a (constante de asociación en equilibrio) para el antígeno diana mayor que la del TCR precursor, un TCR con una K_D (constante de disociación) para el antígeno diana menor que la del TCR precursor, o con una velocidad de disociación (K_{off}) para el antígeno diana menor que la del TCR de tipo silvestre (o precursor). Se han descrito previamente métodos para medir la afinidad de unión de TCR (por ejemplo, Laugel *et al.*, 2007, J. Biol. Chem. 282:23799-23810; García *et al.*, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:6818-6823).

TCR con afinidad potenciada y composiciones

En otro aspecto, se proporcionan TCR con afinidad potenciada generados por los métodos divulgados en el presente documento. Un TCR con afinidad potenciada puede estar unido a células (*p.ej.*, expresado en la superficie de un linfocito T maduro) o en forma soluble. En determinadas realizaciones, los TCR con afinidad potenciada pueden tener codones optimizados para potenciar la expresión en los linfocitos T (Scholten *et al.*, 2006, Clin. Immunol. 119:135-145).

En otras realizaciones, los TCR con afinidad potenciada también pueden ser un componente de una proteína de fusión, que puede comprender además un componente citotóxico (por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos tal como vindesina, antifolatos; toxinas bacterianas, ricina, antivíricos), que es útil para destruir o inhabilitar de manera específica una célula cancerosa o una célula infectada o un componente detectable (por ejemplo, biotina, resto fluorescente, radionúclido), que es útil para obtener imágenes de células cancerosas, células infectadas o tejidos con crisis autoinmunitaria.

La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un TCR con afinidad potenciada generado por los métodos divulgados en el presente documento y un transportador, diluyentes o excipiente farmacéuticamente aceptables. Excipientes adecuados incluyen agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos.

Aplicaciones

Los TCR con afinidad potenciada generados por los métodos de la presente divulgación pueden usarse para tratar una enfermedad (tal como cáncer, enfermedad infecciosa o enfermedad autoinmunitaria) en un sujeto mediante la administración de una composición que comprende los TCR con afinidad potenciada.

Las enfermedades que pueden tratarse con terapia con TCR de afinidad potenciada incluyen cáncer, enfermedades infecciosas (infecciones víricas, bacterianas, protozoarias) y enfermedades autoinmunitarias. La terapia génica con TCR es un tratamiento prometedor para diversos tipos de cáncer (Morgan *et al.*, 2006, Science 314:126-129; revisado en Schmitt *et al.*, 2009, Human Gene Therapy; revisado en junio de 2007, J. Clin. Invest. 117:1466-1476) y enfermedades infecciosas (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). La terapia génica inmunosupresora para enfermedades autoinmunitarias utilizando linfocitos T reguladores que comprenden TCR autorreactivos también es un tratamiento emergente (Fujio *et al.*, 2006, J. Immunol. 177:8140-8147; Brusko *et al.*, 2008, Immunol. Rev. 223:371-390).

Una amplia variedad de cánceres, incluyendo los tumores sólidos y las leucemias, son susceptibles a las composiciones y métodos divulgados en el presente documento. Tipos de cáncer que se pueden tratar incluyen: adenocarcinoma de mama, próstata y colon; todas las formas de carcinoma broncogénico de pulmón; mieloides; melanoma; hepatoma; neuroblastoma; papiloma; apudoma; coristoma; branquioma; síndrome carcinoide maligno; enfermedad cardíaca carcinoide; y carcinoma (*p.ej.*, de Walker, de células basales, basoescamoso, de Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, Krebs 2, de células de merkel, mucinoso, de pulmón no microcítico, de células en avena, papilar, escirroso, bronquiolar, broncogénico, de células escamosas y de células transicionales). Tipos adicionales de cánceres que pueden tratarse incluyen: trastornos histiocíticos; leucemia; histiocitosis maligna; enfermedad de Hodgkin; inmunoproliferativo pequeño; linfoma no de Hodgkin; plasmacitoma; reticuloendoteliosis; melanoma; condroblastoma; condroma; condrosarcoma; fibroma; fibrosarcoma; tumor de células gigantes; histiocitoma; lipoma; liposarcoma; mesotelioma; mixoma; mixosarcoma; osteoma; osteosarcoma; cordoma; craneofaringioma; disgerminoma; hamartoma; mesenquimoma; mesonefoma; miosarcoma; ameloblastoma; cementoma; odontoma; teratoma; timoma; tumor trofoblástico. Adicionalmente, los siguientes tipos de cánceres también se contemplan como susceptibles al tratamiento: adenoma; colangioma; colesteatoma; cicindrroma; cistadenocarcinoma; cistoadenoma; tumor de células de la granulosa; ginandroblastoma; hepatoma; hidradenoma; tumores de células de los islotes; tumor de células de leydig; papiloma; tumor de células de sertoli; tumor de células de teca; leiomioma; liomiosarcoma; mioblastoma; mioma; miosarcoma; rabiomioma; rabiomiosarcoma; ependimoma; ganglioneuroma; glioma; meduloblastoma; meningioma; neurilemoma; neuroblastoma; neuroepitelioma; neurofibroma; neuroma; paraganglioma; paraganglioma no cromafin. Los tipos de cánceres que pueden tratarse también incluyen: angioqueratoma; hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia; angioma esclerosante; angiomatosis; glomangioma; hemangioendotelio; hemangioma; hemangiopericitoma; hemangiosarcoma; linfangioma; linfangiomioma;

linfangiosarcoma; pinealoma; carcinosarcoma; condrosarcoma; cistosarcoma filodes; fibrosarcoma; hemangiosarcoma; liomiosarcoma; leucosarcoma; liposarcoma; linfangiosarcoma; miosarcoma; mixosarcoma; carcinoma de ovarios; rabdomiosarcoma; sarcoma; neoplasias; neurofibromatosis; y displasia cervical.

- 5 Los cánceres de linfocitos B ilustran la variedad de trastornos hiperproliferativos susceptibles de una terapia con TCR potenciados, incluyendo los linfomas de linfocitos B (como diversas formas de la enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (LNH) o linfomas del sistema nervioso central), leucemias (tal como leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas y leucemia mioblástica crónica) y mielomas (tal como mieloma múltiple). Cánceres de linfocitos B adicionales incluyen linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma solitario de hueso, plasmacitoma extraóseo, linfoma extraganglionar de la zona marginal de linfocitos B de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés), linfoma nodal de zona marginal de linfocitos B, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de mediastino (tímico) de linfocitos B grandes, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma de efusión primario, linfoma/leucemia de Burkitt, proliferaciones de linfocitos B de potencial maligno incierto, granulomatosis linfomatoide y trastorno linfoproliferativo posterior a trasplante.

- Enfermedades autoinmunitarias incluyen: artritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, policondritis, artritis psoriásica, psoriasis, dermatitis, polimiositis/dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, miositis inflamatoria, necrólisis epidérmica tóxica, escleroderma y esclerosis sistémicas, síndrome de CREST, respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de dificultad respiratoria, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto (SDRA), meningitis, encefalitis, uveítis, colitis, glomerulonefritis, afecciones alérgicas, eccema, asma, afecciones que implican la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus eritematoso sistémico (LES), lupus eritematoso cutáneo subagudo, lupus discoide, mielitis lúpica, cerebritis lúpica, diabetes de inicio juvenil, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica, neuromielitis óptica, fiebre reumática, corea de Sydenham, respuestas inmunitarias asociadas con una hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis que incluye granulomatosis de Wegener y enfermedad de Churg-Strauss, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo vasculitis/angiitis por hipersensibilidad, ANCA y vasculitis reumatoide), anemia aplásica, anemia de Blackfan-Diamond, anemia hemolítica inmunitaria que incluye la anemia hemolítica autoinmunitaria (AHAI), anemia perniciosa, aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA, por sus siglas en inglés), deficiencia en factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican la diapedesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central (SNC), síndrome de lesión multiorgánica, miastenia grave, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, neuritis alérgica, enfermedad de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo al trasplante de órganos sólidos, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), penfigoide ampolloso, pénfigo, poliendocrinopatías autoinmunitarias, espondiloartropatías seronegativas, enfermedad de Reiter, síndrome del hombre rígido, arteritis de células gigantes, nefritis del complejo inmunitario, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM o polineuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), púrpura de Henoch-Schonlein, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del testículo y ovario incluyendo orquitis y ooforitis autoinmunitaria, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluyendo tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Graves, síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes poliglandulares endocrinopáticos), diabetes de tipo I también denominada diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmunitaria, neumonitis intersticial linfoide (VIH), bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barré, vasculitis de vasos grandes (incluyendo la polimialgia reumática y la arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de vasos intermedios (incluyendo enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa), espondilitis anquilosante con poliarteritis nodosa (PAN), enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), glomerulonefritis de progresión rápida, cirrosis biliar primaria, celiaquía (enteropatía por gluten), crioglobulinemia, crioglobulinemia asociada con hepatitis, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), arteriopatía coronaria, fiebre mediterránea familiar, poliangeítis microscópica, síndrome de Cogan, síndrome de Whiskott-Aldrich y tromboangitis obliterante.

- 55 En realizaciones particulares, un método para tratar a un sujeto con los TCR con afinidad potenciada generados por los métodos divulgados en el presente documento incluye un sujeto con leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica aguda o leucemia mielocítica crónica.

- Las enfermedades infecciosas incluyen las asociadas con agentes infecciosos e incluyen cualquiera de varias bacterias (*p.ej.*, *E. coli* patógena, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *B. anthracis*, *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *H. pylori*, *V. cholerae*, *Listeria spp.*, *Rickettsia spp.*, *Chlamydia spp.*, y similares), micobacterias y parásitos (incluyendo cualquier miembro parásito conocido de los protozoos). Los virus infecciosos incluyen virus eucariotas (*p.ej.*, adenovirus, buniavirus, herpesvirus, papovavirus, paramixovirus, picornavirus, rabdovirus (*p.ej.*, rabia), ortomixovirus (*p.ej.*, gripe), poxvirus (*p.ej.*, vaccinia), reovirus, retrovirus, lentivirus (por ejemplo, VIH), flavivirus (*p.ej.*, HCV) y similares). En determinadas realizaciones, la infección con patógenos citosólicos cuyos antígenos se procesan y muestran con moléculas MHC de clase I, se tratan con los TCR con afinidad potenciada de la invención.

Los TCR con afinidad potenciada se pueden administrar a un sujeto unidos células (es decir, terapia génica de la población de células diana (linfocitos T maduros (por ejemplo, linfocitos T CD8⁺) u otras células del linaje de linfocitos T)). En una realización particular, las células del linaje de linfocitos T que comprenden TCR con afinidad potenciada administradas al sujeto son células autólogas. En otra realización, los TCR con afinidad potenciada se pueden administrar a un sujeto en forma soluble. Los TCR solubles son conocidos en la técnica. (véase, por ejemplo, Molloy *et al.*, 2005, Curr. Opin. Pharmacol. 5:438-443; patente de Estados Unidos 6.759.243).

"Tratar" y "tratamiento" se refieren al manejo médico de una enfermedad, trastorno o afección de un sujeto (es decir, individuo que puede ser un mamífero humano o no humano (por ejemplo, primate, rata, ratón)). En general, una dosis y un régimen de tratamiento apropiados proporcionan los TCR con afinidad potenciada descritos en el presente documento y, opcionalmente, un adyuvante, en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico o profiláctico. Los beneficios terapéuticos y profilácticos incluyen un mejor resultado clínico; reducción o alivio de los síntomas asociados con la enfermedad; disminución de la aparición de síntomas; mejora de la calidad de vida; estado sin enfermedad más prolongado; disminución del grado de enfermedad, estabilización del estado de enfermedad; retraso de la progresión de la enfermedad; remisión; supervivencia; o prolongar la supervivencia.

Las composiciones farmacéuticas que incluyen los receptores con afinidad potenciada se pueden administrar de una manera apropiada a la enfermedad o afección que se va a tratar (o prevenir) según lo determinen los expertos en la materia médica. Una dosis apropiada, duración adecuada y frecuencia de administración de las composiciones ser determinarán por factores tales como el estado del paciente, tamaño, tipo y gravedad de la enfermedad, forma particular del principio activo y método de administración.

En realizaciones adicionales, los TCR con afinidad potenciada de la presente divulgación pueden usarse en métodos de diagnóstico o en métodos de obtención de imágenes, incluyendo estos métodos usados en relación con las indicaciones o condiciones identificadas en el presente documento.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos demuestran que, según lo dispuesto por la presente divulgación, por ejemplo, los timocitos con TCR transgénicos se diferencian de manera eficaz en un linaje CD4⁺CD8⁺CD24⁺TCRβ⁺ "similar a γδ" cuando se exponen a su antígeno afín en cultivos OP9-DL1. Asimismo, los timocitos progenitores que expresan solamente la cadena TCRα de un clon de linfocitos T específico para el antígeno tumoral WT1 también pueden diferenciarse en este linaje TCRαβ⁺ maduro en cultivo OP9-DL1. Se generó una biblioteca de cadenas TCRβ a partir de una población de células DN TCRαβ⁺ clasificadas a partir de estos cultivos, y se cribó para determinar la reactividad de los tetrámeros de MHC con WT1 cuando se emparejaban con la cadena TCRα específica de antígeno. Usando este enfoque, se identificaron diversas cadenas TCRβ que pueden emparejarse con una cadena TCRα específica de antígeno para generar TCR con una afinidad hasta 10 veces mayor por el péptido WT1 en comparación con el TCR original.

Ejemplo 1: La participación del agonista peptídico durante la diferenciación en células OP9-DL1 puede impulsar la diferenciación de células DN TCRαβ⁺ maduras a partir de los progenitores de linfocitos T purificados de ratones con TCR transgénicos.

Las señales agonistas a través de un TCR αβ antes de la selección β dan como resultado la diferenciación de células doble negativas (DN) TCRαβ⁺ "similares a γδ" durante la formación de los linfocitos T *in vivo*, y la reticulación de TCR en la etapa DN3 conduce a la diferenciación de un linaje similar durante la diferenciación de linfocitos T en células OP9-DL1 *in vitro*. Para determinar si los linfocitos T progenitores de ratones con TCR transgénicos también podrían diferenciarse en un linaje DN TCRαβ⁺ en respuesta al antígeno peptídico afín en la etapa DN3, se clasificaron timocitos progenitores DN1 y DN2 TCRαβ⁺CD4⁺CD8⁺CD117⁺CD44⁺ de ratones OT-1 transgénicos (expresan TCR específico para la secuencia del péptido SIINFEKL de ovoalbúmina (SEQ ID NO: 1) presentada en la MHC de clase I H-2K^B; reserva n.º 003831, Jackson Laboratory, ME; véase *también* Hogquist *et al.*, 1994, Cell 76:17-27) y se cultivaron con células OP9-DL1 (Schmitt *et al.*, 2002, Immunity 17:749-756; patente de Estados Unidos N.º 7.575.925) transducidas para expresar la molécula MHC de clase I H-2K^B de ratón, ya sea en ausencia de péptido o con concentraciones crecientes de péptido específico de ovoalbúmina (SEQ ID NO: 1) durante 20 días y se analizaron en diversos puntos temporales mediante citometría de flujo. En ausencia de péptido, los linfocitos T doble positivos (DP) pudieron detectarse el día 16 y constituyeron una fracción importante del cultivo el día 20 (fig. 1A). Sin embargo, la formación o la supervivencia de los linfocitos T DP disminuyó incluso con concentraciones muy bajas de péptido (0,0001 μM), y los DP estaban completamente ausentes en los cultivos que contenían 0,01 μM o más de péptido (fig. 1A), lo que demuestra que las células DP se seleccionan de manera negativa por señalización agonista fuerte en cultivos OP9-DL1.

Para determinar si las señales agonistas cada vez más fuertes impulsan la formación de células DN TCRαβ⁺, la población DN se analizó para determinar la expresión de CD24, un marcador de maduración que se expresa a niveles elevados en todas las poblaciones de linfocitos T progenitores inmaduros y de TCRβ. Se encontró que la mayoría de las células expresaban niveles altos de CD24 y carecían de expresión de TCRβ en el día 5 (fig. 1B), pero el día 16, la mayoría de las células DN de todas las condiciones de cultivo expresaron TCRβ, aunque se observó un número

sustancialmente mayor de células CD24⁻ a partir de cultivos que contenían 0,01 μ M o más de péptido (38,2 % y 31,4 % de células TCR+CD24⁻ en cultivos que contenían 0,01 y 1,0 μ M de péptido, respectivamente, en comparación con el 6,9 % de TCR+CD24⁻ en el cultivo sin péptidos) (fig. 1B). El día 20, ~ 60 % de todas las células DN eran TCR β +CD24⁻ a partir de cultivos que contenían péptido 0,01 μ M o 1,0 μ M, mientras que en cultivos que no recibieron péptido o recibieron una concentración baja (0,0001 μ M) de péptido, solamente el ~20 % de los DN eran TCR β +CD24⁻, y cerca del 50 % eran TCR β ⁻ (fig. 1B, 1C). Asimismo, cuando se compara el nivel de expresión en la superficie de TCR entre las diferentes condiciones de cultivo, las células TCR β + que se formaron en respuesta a altos niveles de péptido expresaron niveles más altos de TCR β en la superficie celular (fig. 1C). Sin desear quedar ligados a teoría alguna, es posible que la formación de algunas células DN TCR $\alpha\beta$ + en cultivos sin péptido añadido se deba a la reactividad cruzada con otros ligandos de péptido-MHC en el sistema de cultivo OP9-DL1. Para confirmar que las células DN TCR $\alpha\beta$ + observadas en estos cultivos no se formaron a través de una etapa de DP, las células DP CD69⁻ que aún no se han seleccionado positivamente se clasificaron a partir de timo B6 u OT-1 y se cultivaron en presencia o ausencia del péptido SIINFEKL de ovoalbúmina (SEQ ID NO: 1). Las células B6 DP no se vieron afectadas por la presencia del péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 1), pero cuando los timocitos OT-1 DP se cultivaron en células OP9-DL1 en presencia de SIINFEKL (SEQ ID NO: 1), se observaron todas las evidencias de selección negativa, incluyendo una pérdida masiva de celularidad y modulación negativa del correceptor (fig. 2). De manera importante, las células DN observadas en estos cultivos fueron de manera uniforme TCR negativas (fig. 2).

Estos datos indican que la participación de un agonista peptídico durante la diferenciación en células OP9-DL1 puede impulsar la diferenciación de células DN TCR $\alpha\beta$ + maduras de progenitores de linfocitos T purificados de ratones con TCR transgénicos.

Ejemplo 2: Una cadena TCR α transgénica se empareja con cadenas TCR β endógenas para impulsar la formación de células DN CD24⁻ TCR $\alpha\beta$ + "aspirantes a $\gamma\delta$ " en el sistema de cultivo OP9-DL1

Para determinar si la expresión solamente de una cadena TCR α antes de la selección β también debería dar como resultado la desviación del linaje de los progenitores de linfocitos T DN3 que expresan una cadena TCR β endógena que se empareja con la cadena TCR α introducida capaz de acoplarse a un ligando de péptido-MHC en el sistema de cultivo OP9-DL1 por encima de un determinado umbral de afinidad, se clasificaron timocitos progenitores DN1 y DN2 CD4⁻CD8⁻ CD117⁺CD44⁺ de ratones B6 y se transdujeron con una cadena TCR α del clon 3D de linfocitos T específicos del antígeno tumoral de Wilm (WT1) que se había identificado previamente como una variante con afinidad potenciada aislada de una biblioteca de mutagénesis por saturación de la región CDR3 de la 3D α . La construcción de expresión de 3D α contiene un motivo de secuencia de entrada intrarribosómico, seguido del dominio extracelular de CD2 humano (números de acceso de Genbank NM_001767.3 (SEQ ID NO: 48) y NP_001758.2 (SEQ ID NO: 49) (secuencias de transcrito y proteína para CD2 de longitud completa, respectivamente)) (IRES- hCD2) como una transducción de marcador. Se cultivaron timocitos progenitores transducidos en presencia o ausencia de 1,0 μ M del péptido RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) de WT1 restringido por la MHC de clase I H-2D^B durante 14 días, y después se analizó mediante citometría de flujo. Las células DN dentro de la fracción negativa de hCD2 contenían pocas células TCR $\alpha\beta$ +, independientemente de la presencia de péptido en las condiciones de cultivo. Por el contrario, la fracción positiva de hCD2 (que expresó el gen 3D α) de cultivos que no recibieron péptido contenía 6,8 % células TCR β + y el número de células TCR $\alpha\beta$ + aumentó a 16,6 % cuando se añadió péptido WT1 1,0 μ M (fig. 3A). Estos datos indican que una población significativa de células DN TCR $\alpha\beta$ + puede formarse a partir de timocitos progenitores tempranos que expresan ectópicamente una cadena TCR α antes de la selección β . Asimismo, el hecho de que esta población de células DN TCR $\alpha\beta$ + aumente cuando está presente el péptido afín (para la cadena TCR α introducida) sugiere que una fracción sustancial de estas células se formó en respuesta a señales específicas del antígeno WT1.

Tomados en conjunto, estos datos indican que la población de DN TCR $\alpha\beta$ + podría contener potencialmente células que expresan una cadena TCR β que puede emparejarse con la 3D α introducida para formar un TCR con una mayor afinidad por el tetrámero de MHC-péptido-WT1 que el receptor de afinidad potenciado original, y significativamente mayor que podría aislarse del repertorio de linfocitos T normales.

Por lo tanto, los timocitos progenitores DN1 y DN2 CD4⁻CD8⁻CD117⁺CD44⁺ transducidos con 3D α se diferenciaron en células OP9-DL1 que expresaban la MHC de Clase I H-2D^B de ratón y también se transdujeron para expresar WT1. Las células no adherentes se recogieron durante varios días hasta el día 21 y se clasificaron para determinar células hCD2⁺CD4⁻CD8⁻TCR β + en reactivo Trizol (Invitrogen) (fig. 3B). Se agruparon los tipos de células clasificados de días individuales; se purificó ARN y se generó ADNc. El TCR 3D precursor utiliza la región variable V β 10. Para conservar los dominios CDR1 y CDR2 de TCR que entran en contacto con MHC, las cadenas TCR β candidatas se restringieron a las que contenían esta región variable. Por lo tanto, las cadenas TCR β que contienen V β 10 dentro de la población de células clasificadas se aislaron mediante PCR usando un cebador directo específico de V β 10 y un cebador inverso específico de C β 2 (fig. 3C). El cebador directo específico de V β 10 se diseñó para contener una secuencia CACC que permite la clonación TOPO direccional en el vector pENTRTM/D-TOPO® (Invitrogen), seguida de la transferencia utilizando la tecnología Gateway® para la recombinación (Invitrogen) en el vector retroviral MigR1-attR (una versión del vector MigR1 (Pear *et al.*, 1998, Blood 92:3780-3792) que se ha modificado para contener sitios attR y el gen ccdB para la clonación Gateway®). La biblioteca MigR1-TCR β se utilizó para transducir células de empaquetamiento retroviral PlatE (Morita *et al.*, 2000, Gene Therapy 7:1063-1066; Cell Biolabs, Inc.) para generar sobrenadante retroviral, que se utilizó después para transducir de manera retroviral células 58 $\alpha\beta$ ⁻, una línea de linfocitos T

murinos que carece de cadenas TCR α y TCR β endógenas, (58^{-/-}) (Letourneur y Malissen, 1989, Eur. J. Immunol. 19:2269-74).

Se tituló el sobrenadante de la biblioteca de TCR β retroviral, y se usó una dilución que dio como resultado menos del 20 % de células transducidas después de la transducción para asegurar que la mayoría de las células contuvieran solamente una integración retroviral. Las células transducidas se clasificaron primero en células GFP positivas, y después se volvieron a clasificar dos veces más en las células V β 10+ que también tenían altos niveles de tinción con tetrameros de MHC-péptido WT1 (fig. 4A). Después de la segunda clasificación, las células se analizaron para determinar la tinción con un tetramero de MHC H-2D^B-péptido específico para GP33, con el fin de evaluar si las células positivas al tetramero de MHC-péptido WT1 se unían de una manera independiente del péptido a los restos de MHC (fig. 4A).

Después de la tercera clasificación de células 58^{-/-} transducidas con la biblioteca con alto contenido de tetrameros de MHC-péptido WT1, las células clasificadas se expandieron, se lisaron y se aisló el ADN. Los insertos retrovirales se recuperaron mediante PCR utilizando cebadores específicos del vector MigR1-attR, diseñado para incluir sitios de clonación AttB Gateway® del vector. Usando un enfoque de dos etapas, los insertos se clonaron primero en el vector pDONR™ (Invitrogen) usando la tecnología de clonación por recombinación Gateway®, y después, de nuevo en MigR1-attR. Se recogieron colonias bacterianas individuales de la reacción de clonación por recombinación y se secuenciaron. Después del análisis de secuencia de > 30 clones, se identificaron las cuatro cadenas TCR β más predominantes para realizar un análisis adicional. Curiosamente, varios de los clones tenían secuencias de CDR3 β que compartían múltiples restos conservados con la cadena 3D β original (fig. 4B). Se encontró que uno de los clones (Clon n.º 1) era casi idéntico al 3D β original, excepto por una sustitución P108Q y una sustitución G112S (fig. 4B). Las cuatro cadenas TCR β candidatas se transdujeron de manera retroviral en células 58^{-/-}3D α y se analizaron por citometría de flujo (fig. 4C). Los cuatro clones candidatos se unieron al tetramero de MHC-péptido WT1 cuando se transdujeron en células 58^{-/-}3D α , aunque el clon n.º 4 se unió al tetramero de MHC-péptido WT1 a niveles significativamente más bajos que los otros y no se analizó adicionalmente. La cadena 3D β precursora se había optimizado con codones previamente y, por lo tanto, expresaba niveles más altos de TCR en la superficie celular, excluyendo la comparación directa de los niveles de tinción de tetrameros entre 3D β y los clones aislados.

Para evaluar de manera más directa la afinidad relativa de cada una de las cadenas TCR β por el tetramero de MHC-péptido WT1, las células 58^{-/-}3D α transducidas con 3D α , y cada una de las cadenas TCR β candidatas se tiñeron con seis diluciones dobles en serie de tetrameros de MHC-péptido WT1 y los valores de MFI se ajustaron a una curva de unión de saturación mediante regresión no lineal, como la concentración de ligando que produjo la mitad de la unión máxima (fig. 5A). Se encontró que las afinidades aparentes de las tres cadenas TCR β candidatas, cuando se emparejan con 3D α , eran mayores que la 3D β precursora, y el Clon n.º 1 tenía una afinidad ~ 10 veces mayor (fig. 5A). Por lo tanto, para comparar directamente la tinción de tetrameros de 3D α emparejada con el Clon n.º 1 frente a la 3D β precursora, El clon n.º 1 tenía codones optimizados de modo que las únicas diferencias de secuencia entre la 3D β original y el clon n.º 1 estaban en la región CDR3. Ambas construcciones se transdujeron en células 58^{-/-} y se evaluaron por citometría de flujo para determinar la tinción de tetrameros de MHC-péptido WT1. Cuando el clon n.º 1 tenía codones optimizados, se encontró que se unía al tetramero a un nivel más alto que la 3D β original como se esperaba (fig. 5B).

Una preocupación asociada con la potenciación de la afinidad de los TCR específicos de antígeno *in vitro* es que algunas modificaciones podrían aumentar la afinidad del receptor solamente por MHC, en lugar de por péptido/MHC, aumentando así la probabilidad de que el TCR sea autorreactivo. Este riesgo se minimizó restringiendo la biblioteca de TCR β a las cadenas TCR β que comparten el mismo dominio variable (V β 10) para restringir la variabilidad a CDR3. Para determinar si alguna de las cadenas TCR β candidatas confería una mayor propensión a unirse a la molécula MHC H-2D^B de forma independiente del péptido, las células 58^{-/-} transducidas se tiñeron con un grupo de tetrameros de MHC H-2D^B tetrameros (péptidos: WT1, GP33, E4, MESN, SQV). Las tres cadenas TCR β candidatas se tiñeron con el tetramero de MHC-péptido WT1 a niveles altos cuando se emparejaron con 3D α , similar a la 3D β original (fig. 5C). Cuando se tiñe con otros cuatro tetrameros de MHC H-2D^B-péptido, las tres cadenas TCR β fueron uniformemente negativas para la tinción de los tetrameros, lo que sugiere que el aumento de afinidad observado por estos receptores no es el resultado de una mayor afinidad por MHC solo (fig. 5C).

Ejemplo 3: Generación de linfocitos T específicos de WT1 de alta afinidad mediante expresión ectópica de una cadena TCR α específica de antígeno durante la formación temprana de los linfocitos T humanos *in vitro*.

El antígeno del tumor de Wilm (WT1) se expresa en niveles anormalmente altos en la superficie de las células leucémicas. Los clones de linfocitos T específicos de HLA A2/WT1 se han cribado en busca de clones con alta actividad específica. Se aislaron las cadenas TCR α y TCR β del clon C4, que se determinó que tenían la mayor afinidad por WT1. Un vector lentiviral que comprende el TCR de C4 y que confiere un alto nivel de expresión es objeto de un ensayo clínico de terapia génica con TCR programado para 2012. Para potenciar adicionalmente la afinidad del TCR de C4 por el antígeno WT1, se utiliza el sistema de diferenciación *in vitro* descrito en los ejemplos anteriores con células progenitoras de sangre de cordón humano que expresan la cadena TCR α de C4.

Generación de linfocitos T específicos de WT1:

Se generó una variante de la línea celular OP9-DL1 descrita en el ejemplo 1, que expresaba la molécula MHC de clase I humana HLA-A2 (números de acceso de Genbank U18930.1 (SEQ ID NO: 50) y AAA87076.1 (SEQ ID NO: 51), secuencias de transcrito y proteína, respectivamente) y la molécula MHC de clase I humana $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2M$) (números de acceso de Genbank NM_004048.2 (SEQ ID NO: 52) y NP_004039.1 (SEQ ID NO: 53), secuencias de transcrito y proteína, respectivamente). La cadena TCR α del clon C4 de TCR se transduce de manera estable en células progenitoras hematopoyéticas derivadas de la sangre del cordón umbilical mediante transducción retroviral, utilizando un vector retroviral que también codifica la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador de transducción. Las células progenitoras que expresan GFP se clasifican mediante citometría de flujo y se cultivan en células de estroma OP9-DL1-A2/ $\beta 2M$ en presencia o ausencia del péptido RMFPNAPYL de WT1 (SEQ ID NO: 2). Las células progenitoras hematopoyéticas humanas proliferan y se diferencian fácilmente en el cultivo con OP9-DL1 a una etapa de formación de linfocitos T humanos caracterizada por el fenotipo CD34+CD1a+CD4+ (La Motte-Mohs *et al.*, 2005, Blood 105:1431-1439), momento en el que experimentan reordenamientos del gen TCR en los locus β , γ y δ (Spits, 2002, Nat. Rev. Immunol. 2:760-772). Se formula la hipótesis de que, como sus homólogos murinos, los progenitores de linfocitos T humanos que expresan TCR α que producen un reordenamiento en el locus de TCR β adaptarán uno de dos destinos celulares: aquellos que expresan una cadena TCR β que no se empareja bien con la TCR α transgénica, o que se empareja con la TCR α transgénica pero no recibe una señal fuerte a través de este $\alpha\beta$ TCR, se diferenciará a la etapa DP en respuesta a la señalización a través del pre-TCR; por otro lado, aquellos que generan una cadena TCR β que puede emparejarse con la TCR α transgénica y reciben una señal suficientemente fuerte a través de este $\alpha\beta$ TCR maduro se señalarán para diferenciarse hacia un linaje DN TCR $\alpha\beta$ + similar a $\gamma\delta$. Debido a que las células DP solo sobreviven durante ~ 3-4 días sin una señal de selección positiva, y debido a que no se produce una selección positiva eficaz en cultivos OP9-DL1, la gran mayoría de las células que no reciben una señal agonista a través del TCR $\alpha\beta$ se eliminarán del cultivo, permitiendo que las células similares a $\gamma\delta$ que se forman debido a la señalización temprana de TCR $\alpha\beta$ se acumulen.

Aislamiento de cadenas TCR β candidatas:

En diversos momentos del cultivo, las células no adherentes que tienen un fenotipo DN TCR $\alpha\beta$ + similar a $\gamma\delta$ y son positivas para los tetrámeros de MHC A2/péptido WT1 se recogen mediante clasificación celular. Puede que no sea posible detectar células positivas para tetrámeros de WT1, ya que la presencia continua de antígeno en los cultivos puede dar como resultado una modulación negativa de TCR que podría disminuir la tinción de tetrámeros por debajo de la detección. Asimismo, debido a que es probable que estas células no expresen CD8 $\alpha\beta$, los receptores de alta afinidad que no son independientes de CD8 son indetectables mediante tinción de tetrámeros. Por lo tanto, puede ser necesario cribar las cadenas TCR β de todas las células DN TCR $\alpha\beta$ + que emergen en el cultivo (véase a continuación). También puede ser deseable restringir los linfocitos T candidatos a aquellos que usan el mismo segmento V β utilizado por la cadena TCR β de C4 original (V β 17), para conservar los contactos de MHC con CDR1 y CDR2 del TCR de C4 precursor.

Después de la clasificación de células, las cadenas TCR β endógenas se clonan purificando el ARN total, realizando RT-PCR RACE de longitud completa con cebadores C- β 1 o C- β 2 y clonando los productos de PCR en el vector pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen), que permite la clonación TOPO direccional e incorpora sitios attL que permiten una transferencia rápida y eficaz al vector retroviral Mig-attR (una variante de MigR1 (Pear *et al.*, 1998, Blood 92:3780-3792) que contiene sitios attR para la inserción del gen de interés) utilizando el sistema de recombinación de tecnología Gateway® de Invitrogen. Los productos de la reacción de recombinación se someten a electroporación en bacterias de alta eficacia, y las colonias se recogen con un asa de cultivo juntas y se maximizan para generar una biblioteca retroviral de cadenas TCR β potencialmente reactivas con WT1.

Varias de TCR específicos de WT1 de alta afinidad:

Las cadenas TCR β que pueden emparejarse con la cadena TCR α de C4 para formar un TCR específico de WT1 de alta afinidad se identifican mediante la transducción de la biblioteca de TCR β en la línea de linfocitos T humanos H9 (número de catálogo HTB-176, ATCC, Manassas, VA) que se ha transducido para expresar la cadena TCR α de C4 (H9-C4 α). Las células transducidas se clasifican mediante citometría de flujo para determinar niveles altos de tinción con tetrámeros de MHC-péptido WT1 y los insertos retrovirales se amplificarán mediante PCR a partir de la población clasificada. Las cadenas TCR β candidatas se identifican mediante clonación TOPO del producto de PCR seguido de análisis de secuencia. Las cadenas TCR β seleccionadas y la C4 α precursora se transducen en células H9-C4 α y las afinidades relativas por el tetrámero de MHC-péptido WT1 se calcularán mediante tinción de células transducidas con diluciones dobles en serie de tetrámeros conjugados con PE (como se describe en el ejemplo 2). Los valores de afinidad se determinan ajustando la MFI para cada dilución a una curva de unión mediante regresión no lineal y la KD definida como concentración de tetrámeros que produce la mitad de la unión máxima. Las cadenas TCR β que pueden emparejarse con TCR α de C4 para generar un TCR con mayor afinidad mediante tinción con tetrámeros de MHC-péptido que el receptor C4 de tipo silvestre se caracterizan además por su seguridad y eficacia.

Ejemplo 4: Caracterización de la eficacia y seguridad de los candidatos a TCR de alta afinidad utilizando un modelo de terapia génica con TCR dirigido a WT1 en ratones *in vivo*.

Los TCR específicos de WT1 humano con afinidad potenciada que se identifican como en el ejemplo 3 se prueban para determinar su seguridad y eficacia en un modelo de terapia génica dirigida a WT1 en ratones transgénicos HLA-A2.

5 Evaluación de TCR potenciados para determinar actividad inespecífica:

La activación fugaz de TCR de alta afinidad se evalúa midiendo la producción de citocinas por linfocitos T transducidos con TCR en respuesta a un grupo de células diana que expresan A2 en presencia o ausencia del péptido WT1. Los TCR que muestran un reconocimiento inespecífico de células diana WT1 negativas en comparación con el TCR de C4 precursor no están especializados para estudios adicionales.

Actividad de TCR con afinidad potenciada en tejido normal *in vivo*:

La expresión de WT1 en tejido normal es similar tanto en el ratón como en el hombre, y el péptido WT1 reconocido por el TCR de C4 es idéntico en ratones y se sabe que se procesa y presenta mediante las células de ratón (Gaiger *et al.*, 2000, Blood 96:1480-9). Se han utilizado ratones transgénicos HLA-A2 para probar el reconocimiento de tejidos normales por linfocitos T que expresan TCR humanos específicos de WT1 de alta afinidad (Kuball *et al.*, 2009, J. Exp. Med. 206:463-475).

Para evaluar la seguridad de los TCR con afinidad potenciada generados *in vitro* como se divulga en el ejemplo anterior, los linfocitos T CD8⁺ de ratones B6.A2/D^b, que expresan un transgén que codifica los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de A2 fusionados con $\alpha 3$ de D^b (para la unión de CD8 de ratón) (Newberg *et al.*, 1996, J. Immunol. 156:2473-2480), se transducen a TCR con afinidad potenciada candidatos expresados. Los TCR se modifican antes de la transducción para contener dominios C α y C β de ratón en lugar de humanos, que aumenta la expresión en los linfocitos T de ratón (Pouw *et al.*, 2007, J. Gene Med. 9:561-570). Aproximadamente 4-6 semanas después de la transferencia de linfocitos T transducidos con TCR a ratones, los tejidos que se sabe que expresan WT1 de forma natural (por ejemplo, pulmones y riñón) se analizan mediante histología en busca de evidencia de infiltración de linfocitos T y daño tisular, y la médula ósea se evalúa mediante citometría de flujo para determinar el agotamiento de las células progenitoras hematopoyéticas de expresión de WT1.

Correlación de afinidad potenciada con función y reconocimiento de dianas mejorados:

Existe evidencia de que puede existir un umbral de afinidad para los TCR, por encima del cual las potenciaciones adicionales no aumentarán la función de los linfocitos T y, de hecho, pueden disminuir la sensibilidad al antígeno (Schmid *et al.*, 2010, J. Immunol. 184:4936-46). Por lo tanto, la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ transducidos con TCR de alta afinidad a las células diana pulsadas con concentraciones de péptidos limitantes se compara con los linfocitos T que expresan el TCR de C4 precursor. Se analizan la producción y proliferación de citocinas (IFN γ /IL-2), así como la actividad lítica. Los TCR que muestran una mayor afinidad y una función potenciada están especializados para su estudio adicional y para su posible uso en ensayos de terapia génica con TCR.

Ejemplo 5: Generación de linfocitos T específicos de WT1 de alta afinidad *in vivo*.

Se utilizó un modelo en ratones (ratones retrogénicos TCR α) *in vivo* para determinar si las células doble negativas (DN) TCR β ⁺ pueden formarse en el timo. Los ratones retrogénicos (transducidos de manera retroviral) permiten una generación rápida, en comparación con los métodos transgénicos, de ratones que expresan un transgén de TCR específico. Se conocen en la técnica métodos para producir ratones retrogénicos (véanse, p.ej, 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). Brevemente, se purificaron células madre/progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea de ratones B6 y se transdujeron para expresar la cadena TCR α del TCR 3D-PYY específico de WT1 de alta afinidad o del TCR 7431 específico de mesotelina de baja afinidad. El TCR 3D-PYY es un TCR de mayor afinidad modificado por ingeniería a partir del TCR 3D, identificado utilizando un sistema de presentación de linfocitos T y selección con Dímero X WT1/Ig D^b (BD Biosciences) (Stone *et al.*, 2011, J. Immunol. 186:5193-5200; Chervin *et al.*, 2008, J. Immunol. Methods 339:175-184). Las construcciones retrovirales que comprenden los transgenes de TCR α 3D-PYY o 7431 α también incluyen el dominio extracelular de CD2 humano como marcador de transducción, con un IRES entre los dos transgenes. Los progenitores derivados de médula ósea transducidos se transfirieron a ratones hospedadores B6 irradiados de forma letal para generar quimeras de médula ósea que expresaban las cadenas TCR α introducidas. Seis semanas después de la transferencia *in vivo* de las células de la médula ósea transducidas con TCR α , se sacrificó a los ratones. Las células del timo y el bazo se analizaron para determinar la expresión de CD4 y CD8 mediante citometría de flujo (figuras 6A, 6B). El análisis de la expresión de CD4 y CD8 por células TCR β ⁺ en el timo (figura 6A) muestra que se puede detectar una gran población de células doble negativas TCR β ⁺ *in vivo* en los timocitos transducidos que expresan ectópicamente una cadena TCR α temprano en la formación, y que esta población es más acentuada en ratones que expresan una TCR α de un TCR de alta afinidad (por ejemplo, 3D-PYY α). Los timocitos DN TCR β ⁺ de ratones retrogénicos 3D-PYY α y 7431 α también se analizaron para determinar la expresión de V β 10 y V β 9, respectivamente (figura 6A). Estos datos muestran que la población de DN TCR β ⁺ está enriquecida por células que utilizan el mismo segmento génico V β que el TCR específico de antígeno original. Tomados en conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de que las células DN TCR β ⁺ se forman en respuesta a una señalización de TCR

relativamente fuerte que es el resultado de interacciones afines con el antígeno diana (es decir, WT1 o mesotelina) expresado en el timo. El análisis de la expresión de CD4 y CD8 de esplenocitos retrogénicos TCRβ+ muestra que estas células DN TCRβ+ también están presentes en la periferia de ratones retrogénicos (figura 6B).

- 5 Los esplenocitos de ratones retrogénicos 3D-PYYα y 7431α se estimularon con péptido WT1 y péptido de mesotelina, respectivamente, y se cultivaron *in vitro* en presencia de IL-2 durante 6 días. Se añadió IL-2 al cultivo para expandir potencialmente las células específicas de antígeno para que pudieran detectarse mediante tinción de tetrámeros. Los cultivos se analizaron para determinar la expresión de CD4 y CD8 mediante citometría de flujo dentro de la selección TCRβ+, así como para determinar la expresión del gen Vβ de TCR precursor (figura 7). De nuevo, se observa
- 10 enriquecimiento para la familia de genes Vβ precursores, especialmente para el 3D-PYY de alta afinidad. Los linfocitos T cultivados también se analizaron para determinar la presencia de linfocitos T específicos de antígeno mediante tinción con tetrámeros de MHC/péptido WT1 o de mesotelina (figura 7). Estos datos muestran que, especialmente para los ratones retrogénicos 3D-PYYα de alta afinidad, en estos cultivos está presente un número significativo de linfocitos T específicos de antígeno. El hecho de que las células positivas para los tetrámeros se encuentren dentro
- 15 de la población transducida con TCRα (hCD2+) indica que estas células se formaron como resultado de la expresión temprana de la cadena TCRα. Esto demuestra que las células DN TCRβ+ que se forman en estos ratones contienen realmente linfocitos T específicos de antígeno de alta afinidad. Debido a que se trata de células DN, no tienen la contribución de CD8 para ayudar con la unión al tetrámero; estos TCR son por lo tanto, "CD8- independientes", la unión al tetrámero independiente de CD8 necesita un TCR de alta afinidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> Fred Hutchinson Cancer Research Center
Schmitt, Thomas M.
Greenberg, Philip D.
- <120> RECEPTORES DE LINFOCITOS T CON AFINIDAD POTENCIADA Y MÉTODOS PARA PREPARAR LOS MISMOS
- 30 <130> 360056.412WO
- <140> US
<141>
- 35 <150> US 61/642.358
<151> 03/05/2012
- <160> 53
- 40 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
<211> 8
<212> PRT
- 45 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> péptido de ovoalbúmina sintético
- 50 <400> 1
- Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5
- 55 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> péptido WT1 sintético
- 60 <400> 2

ES 2 858 248 T3

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

<210> 3
<211> 3366
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

cgtgggattt	ccagaccgcg	gcttttcta	cggctcggga	ggaagctctg	cagctctctt	60
gggaattaag	ctcaatctct	ggactctctc	tcttttctct	tctccccctc	cctctcctgc	120
gaagaagctc	aagacaaaac	caggaagccg	gcgaccctca	cctcctcggg	ggctgggagg	180
aaggaggaaa	acgaaagtcg	ccgccgccgc	gctgtcccc	gagagctgcc	tttcctcggg	240
catccctggg	gctgcccgcg	gacctcgag	ggcggatata	aagaaccgcg	gccttgggaa	300
gaggcggaga	ccggctttta	aagaaagaag	tcctgggtcc	tgcggtctgg	ggcgaggcaa	360
gggcgctttt	ctgcccacgc	tccccgtggc	ccatcgatcc	cccgcgcgtc	cgccgctgtt	420
ctaaggagag	aagtgggggc	ccccaggct	cgcgcgtgga	gcgaagcagc	atgggcagtc	480
ggtgcgcgct	ggccctggcg	gtgctctcgg	ccttgctgtg	tcaggtctgg	agctctgggg	540
tgttcgaact	gaagctgcag	gagttcgtca	acaagaaggg	gctgctgggg	aaccgcaact	600

gctgccgcgg	ggggcgccggg	ccaccgccgt	gcgccctgccg	gaccttcttc	cgcgtgtgcc	660
tcaagcacta	ccaggccagc	gtgtcccccg	agccgcctcg	cacctacggc	agcgccgtca	720
cccccggtg	ggggcgctgac	tccttcagtc	tgcccgacgg	cgggggcgcc	gactccgcgt	780
tcagcaaccc	catccgcttc	cccttcggct	tcacctggcc	gggcaccttc	tctctgatta	840
ttgaagctct	ccacacagat	tctcctgatg	acctcgcaac	agaaaaccca	gaaagactca	900
tcagccgcct	ggccacccag	aggcacctga	cgggtggcga	ggagtgggtcc	caggacctgc	960
acagcagcgg	ccgcacggac	ctcaagtact	cctaccgctt	cgtgtgtgac	gaacactact	1020
acggagaggg	ctgctccgtt	ttctgccgtc	cccgggacga	tgcccttcggc	cacttcacct	1080
gtggggagcg	tggggagaaa	gtgtgcaacc	ctggctggaa	agggccctac	tgacacagac	1140
cgatctgcct	gcctggatgt	gatgagcagc	atggatcttg	tgacaaacca	ggggaatgca	1200
agtgcagagt	gggctggcag	ggccggtact	gtgacgagtg	tatccgctat	ccaggctgtc	1260
tccatggcac	ctgccagcag	ccctggcagt	gcaactgcca	ggaaggctgg	gggggccttt	1320
tctgcaacca	ggacctgaac	tactgcacac	accataagcc	ctgcaagaat	ggagccacct	1380
gcaccaacac	gggccagggg	agctacactt	gctcttgccg	gcctgggtac	acagggtgcca	1440
cctgcgagct	ggggattgac	gagtgtgacc	ccagcccttg	taagaacgga	gggagctgca	1500
cggatctcga	gaacagctac	tcctgtacct	gcccacccgg	cttctacggc	aaaatctgtg	1560
aattgagtgc	catgacctgt	gcggacggcc	cttgctttta	cgggggtcgg	tgctcagaca	1620
gccccgatgg	agggtagacg	tgccgctgcc	ccgtgggcta	ctccggcttc	aactgtgaga	1680
agaaaattga	ctactgcagc	tcttcacctc	gttctaatgg	tgccaagtgt	gtggacctcg	1740
gtgatgccta	cctgtgccgc	tgccaggccg	gcttctcggg	gaggcaactgt	gacgacaacg	1800
tggacgactg	cgcctcctcc	ccgtgcgccca	acgggggcac	ctgccgggat	ggcgtgaacg	1860
acttctcctg	cacctgcccg	cctggctaca	cgggcaggaa	ctgcagtgcc	cccgtcagca	1920
ggtgcgagca	cgcaccctgc	cacaatgggg	ccactgcca	cgagaggggc	caccgctatg	1980
tgtgcgagtg	tgcccagagg	tacgggggtc	ccaactgcca	gttcctgctc	cccagactgc	2040
ccccggggccc	agcgggtggtg	gacctcactg	agaagctaga	gggccagggc	ggggcattcc	2100
cctgggtggc	cgtgtgcgcc	ggggtcatcc	ttgtcctcat	gctgctgctg	ggctgtgccg	2160
ctgtggtggc	ctgcgtccgg	ctgaggctgc	agaagcaccg	gccccagcc	gacccttgcc	2220
ggggggagac	ggagaccatg	aacaacctgg	ccaactgcca	gcgtgagaag	gacatctcag	2280
tcagcatcat	cggggccacg	cagatcaaga	acaccaacaa	gaaggcggac	ttccacgggg	2340
accacagcgc	cgacaagaat	ggcttcaagg	cccgtacctc	agcgggtggac	tataacctcg	2400
tgacggacct	caaggttgac	gacaccgccg	tcagggacgc	gcacagcaag	cgtgacacca	2460
agtgccagcc	ccagggctcc	tcaggggagg	agaaggggac	cccgaaccaca	ctcaggggtg	2520
gagaagcatc	tgaagaaaaa	aggccggact	cgggctgttc	aacttcaaaa	gacaccaagt	2580
accagtcggt	gtacgtcata	tcggaggaga	aggatgagtg	cgtcatagca	actgagggtg	2640
aaaatggaag	tgagatggca	agactcccgt	ttctcttaaa	ataagtaaaa	ttccaaggat	2700
atatgccccca	acgaatgctg	ctgaagagga	gggaggcctc	gtggactgct	gctgagaaac	2760
cagagttcaga	ccgagcagggt	tctcctcctg	aggctcctcga	cgcctgccga	cagcctgtcg	2820
cggcccgggc	gcctgcggca	ctgccttccg	tgacgtcgcc	gttgcaactat	ggacagttgc	2880
tcttaagaga	atatatatatt	aatgggtga	actgaattac	gcataagaag	catgcaactgc	2940
ctgagtgtat	atcttggtatt	cttatgagcc	agtcttttct	tgaattagaa	acacaaacac	3000
tgccctttatt	gtccctttttg	atacgaagat	gtgctttttc	tagatggaaa	agatgtgtgt	3060
tatttttttg	atctgtaaaa	atatttttca	tgatatctgt	aaagcttgag	tattttgtga	3120
tgttcgtttt	ttataattta	aatttttggt	aatatgtaca	aaggcacttc	gggtctatgt	3180
gactatattt	ttttgtatat	aaatgtattt	atggaatatt	gtgcaaatgt	tattttgagtt	3240
ttttactgtt	ttgttaaatga	agaaattcct	ttttaaaata	tttttccaaa	ataaatttta	3300
tgaatgacaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	3360
aaaaaa						3366

<210> 4
 <211> 723
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 858 248 T3

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

ES 2 858 248 T3

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	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	

ES 2 858 248 T3

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	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	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	taccgggtcta	gaacactctg	ggagcggcag	cggctgccga	60
gtgacgccgg	gccgggaaac	cagggcgcg	gccgcagtc	ttgccaccac	cgttcccacc	120
gcgcccctcg	gggccccgga	ttatcgctc	accggtggga	tttccagacc	gccgcttcct	180
aataggcctg	cgaaggaagc	cactgcaagc	tctcttggga	attaagctga	acatctgggc	240
tctcttccct	ctgtgtctta	tctcctttct	cctcctttccc	tccgcgaaga	agcttaagac	300
aaaaccagaa	agcaggagac	actcacctct	ccgtggactg	aaagccagac	gaagaggaaa	360
ccgaaagtgt	tccttttctca	gtgcctcgta	gagctcttgc	cggggaccta	gctgaaggca	420
ccgcaccctc	ctgaagcgac	ctggccctga	tagcacacct	ggagccgaga	gacgcctttc	480
cggcagtact	cctcgggtca	tatagacttt	cctggcatcc	ctgggtcttt	gaagaagaaa	540
gaaaagagga	tactctagga	gagcaagggc	gtccagcggg	accatggggc	gtcggagcgc	600
gctagccctt	gccgtggtct	ctgccctgct	gtgccagggtc	tggagctccg	gcgtatttga	660
gctgaagctg	caggagtctg	tcaacaagaa	ggggctgctg	gggaaccgca	actgctgccg	720
cgggggtctc	ggcccgcctt	gcgcctgcag	gaccttcttt	cgcgtatgcc	tcaagcacta	780
ccaggccagc	gtgtcacccg	agccaccctg	cacctacggc	agtgtgttca	cggcagtgtc	840
gggtgtcgac	tccttcagcc	tgcctgatgg	cgcaggcatc	gaccccgcc	tcagcaaccc	900
catccgattc	cccttcggct	tcacctggcc	aggtaccttc	tctctgatca	ttgaagccct	960
ccatacagac	tctcccgatg	acctcgcaac	agaaaaccca	gaaagactca	tcagccgcct	1020
gaccacacag	aggcacctca	ctgtgggaga	agaatggtct	caggaccttc	acagtagcgg	1080
ccgcacagac	ctccgggtact	cttaccggtt	tgtgtgtgac	gagcactact	acggagaagg	1140
ttgctctgtg	ttctgccgac	ctcgggatga	cgcctttggc	cacttcacct	gcggggacag	1200
aggggagaag	atgtgcgacc	ctggctggaa	aggccagtac	tgcactgacc	caatctgtct	1260
gccagggtgt	gatgaccaac	atggatactg	tgacaaacca	ggggagtgca	agtgcagagt	1320
tggctggcag	ggccgctact	gcgatgagt	catccgatac	ccagggtgtc	tccatggcac	1380
ctgccagcaa	ccctggcagt	gtaactgcc	ggaaggctgg	gggggccttt	tctgcaacca	1440
agacctgaac	tactgtactc	accataagcc	gtgcaggaat	ggagccacct	gcaccaacac	1500
gggccagggg	agctacacat	gttcctgccc	acctgggtat	acaggtgcca	actgtgagct	1560
ggaagttagat	gagtgtgtct	ctagcccctg	caagaacgga	gcgagctgca	cggaccttga	1620
ggacagcttc	tcttgccacct	gccctcccgg	cttctatggc	aaggctctgt	agctgagcgc	1680
catgacctgt	gcagatggcc	cttgcttcaa	tggaggacga	tgttcagata	accctgacgg	1740
aggctacacc	tgccattgcc	ccttgggctt	ctctggcttc	aactgtgaga	agaagatgga	1800
tctctgcggc	tcttcccctt	gttctaaccg	tgccaagtgt	gtggacctcg	gcaactctta	1860
cctgtgccgg	tgccaggctg	gcttctccgg	gaggtactgc	gaggacaatg	tggatgactg	1920
tgcctcctcc	ccgtgtgcaa	atgggggcac	ctgccgggac	agtgtgaacg	acttctcctg	1980
tacctgcca	ctggctaca	cgggcaagaa	cctgtcagcc	ggtgtgagca	ggtgtgagca	2040
tgcaccctgc	cataatgggg	ccacctgcca	ccagaggggc	cagcgcctaca	tgtgtgagtg	2100
cggccagggc	tatggcgggc	ccaactgcca	gtttctgctc	cctgagccac	caccagggcc	2160

catggtggtg	gacctcagtg	agaggcatat	ggagagccag	ggcgggccct	tcccctgggt	2220
ggccgtgtgt	gccgggggtg	tgcctgtcct	cctgctgctg	ctgggctgtg	ctgctgtggt	2280
ggtctgcgtc	cggctgaagc	tacagaaaca	ccagcctcca	cctgaaccct	gtgggggaga	2340
gacagaaacc	atgaacaacc	tagccaattg	ccagcgcgag	aaggacgttt	ctgttagcat	2400
cattggggct	accagatca	agaacaccaa	caagaaggcg	gactttcacg	gggaccatgg	2460
agccgagaag	agcagcttta	aggtccgata	ccccactgtg	gactataacc	tcgttcgaga	2520
cctcaaggga	gatgaagcca	cggctcaggga	tacacacagc	aaacgtgaca	ccaagtgcc	2580
gtcacagagc	tctgcaggag	aagagaagat	cgcaccaaca	cttaggggtg	gggagattcc	2640
tgacagaaaa	aggccagagt	ctgtctactc	tacttcaaag	gacaccaagt	accagtcggt	2700
gtatgttctg	tctgcagaaa	aggatgagt	tgttatagcg	actgaggtgt	aagatggaag	2760
cgatgtggca	aaattcccat	ttctcttaaa	taaaattcca	aggatatagc	cccgatgaat	2820
gctgctgaga	gaggaaggga	gaggaacccc	agggactgct	gctgagaacc	aggttcaggc	2880
gaagctggtt	ctctcagagt	tagcagaggc	gcccgcact	gccagcctag	gctttggctg	2940
ccgctggact	gcctgctggt	tgttcccatt	gcactatgga	cagttgcttt	gaagagtata	3000
tattttaaag	gacgagtga	ttgattcata	taggaagcac	gcactgcca	cacgtctatc	3060
ttggattact	atgagccagt	ctttccttga	actagaaaca	caactgcctt	tattgtcctt	3120
tttgatactg	agatgtgttt	ttttttttcc	tagacgggaa	aaagaaaacg	tgtgttattt	3180
ttttgggatt	tgtaaaaaata	tttttcatga	tatctgtaaa	gcttgagtat	tttgtgacgt	3240
tcattttttt	ataattttaa	ttttggtaaa	tatgtacaaa	ggcacttcgg	gtctatgtga	3300
ctatattttt	ttgtatataa	atgtatttat	ggaatatatt	gcaaatgtta	tttgagtttt	3360
ttactgtttt	gttaaatgaag	aaattcattt	taaaaatatt	tttccaaaat	aaatataatg	3420
aactacaaaa	aaaaaaaaaa	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      240
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	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					320
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					400
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	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	Leu
545					550					555					560
Gly	Cys	Ala	Ala	Val	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	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

aggtttcagt	agcggcgctg	cgcgcaggcc	gggaacacga	ggccaagagc	cgcagcccca	60
gccgccttgg	tgcagcgta	accggcacta	gcccgccttg	agccccagga	ttagacagaa	120
gacgcgtcct	cggcgcggtc	gccgcccagc	cgtagtcacc	tggattacct	acagcggcag	180
ctgcagcggg	gccagcgaga	aggccaaaag	ggagcagcgt	cccagagagga	gcgcctcttt	240
tcagggaccc	cgcgggctgg	cggacgcgcg	ggaaagcggc	gtcgcgaaca	gagccagatt	300
gagggcccg	gggtggagag	agcgacgccc	gaggggatgg	cggcagcgtc	ccggagcgcc	360
tctggctggg	cgtactgct	gctggtggca	ctttggcagc	agcgcgcggc	cggctccggc	420
gtcttccagc	tgcagctgca	ggagttcatc	aacgagcgcg	gcgtactggc	cagtgggcgg	480
ccttgcgagc	ccggctgccg	gactttcttc	cgcgtctgcc	ttaagcactt	ccaggcggtc	540
gtctcgcccg	gacctgcac	cttcgggacc	gtctccacgc	cggatttggg	caccaactcc	600
ttcgctgtcc	gggacgacag	tagcggcggg	gggcgcaacc	ctctccaact	gcccttcaat	660
ttcacctggc	cgggtacctt	ctcgctcatc	atcgaagctt	ggcacgcgcc	aggagacgac	720
ctgcggccag	aggccttgcc	accagatgca	ctcatcagca	agatcgccat	ccagggctcc	780
ctagctgtgg	gtcagaactg	gttattggat	gagcaaacca	gcacctcac	aaggctcggc	840
tactcttacc	gggtcatctg	cagtgacaac	tactatggag	acaactgctc	ccgcctgtgc	900
aagaagcgca	atgaccactt	cggccactat	gtgtgccagc	cagatggcaa	cttgtcctgc	960
ctgcccgggt	ggactgggga	atattgccaa	cagcctatct	gtctttcggg	ctgtcatgaa	1020
cagaatggct	actgcagcaa	gccagcagag	tgcctctgcc	gcccaggctg	gcagggccgg	1080
ctgtgtaacg	aatgcatccc	ccacaatggc	tgtcgccacg	gcacctgcag	cactccctgg	1140
caatgtactt	gtgatgaggg	ctggggaggc	ctggtttgtg	accaagatct	caactactgc	1200
accaccact	ccccatgcaa	gaatggggca	acgtgtcca	acagtgggca	gcgaagctac	1260
acctgcacct	gtcgcccagg	ctacactggt	gtggactgtg	agctggagct	cagcgagtgt	1320
gacagcaacc	cctgtcgcaa	tggaggcagc	tgtgaaggacc	aggaggatgg	ctaccactgc	1380
ctgtgtcctc	cgggctacta	tggcctgcat	tgtgaacaca	gcaccttgag	ctgcgcgac	1440
tccccctgct	tcaatggggg	ctcctgccgg	gagcgcaacc	agggggccaa	ctatgcttgt	1500
gaatgtcccc	ccaacttcac	cggctccaac	tgcgagaaga	aagtggacag	gtgcaccagc	1560
aaccctctgt	ccaacggggg	acagtgcctg	aaccgaggtc	caagccgcat	gtgccgctgc	1620
cgtcctggat	tcacgggcac	ctactgtgaa	ctccacgtca	gcgactgtgc	ccgtaaccct	1680
tgcgccacg	gtggcacttg	ccatgacctg	gagaatgggc	tcatgtgcac	ctgccctgcc	1740
ggcttctctg	gocgacgctg	tgaggtgcgg	acatccatcg	atgcctgtgc	ctcgagtccc	1800
tgcttcaaca	gggccacctg	ctacaccgac	ctctccacag	acacctttgt	gtgcaactgc	1860
ccttatggct	ttgtgggcag	ccgctgcgag	ttccccgtgg	gcttgccgcc	cagcttcccc	1920
tgggtggccg	tctcgctggg	tgtggggctg	gcagtgtctg	tggtagctgt	gggcatgggt	1980
gcagtggctg	tgcggcagct	gcggcttcga	cggccggacg	acggcagcag	ggaagccatg	2040
aacaacttgt	cggacttcca	gaaggacaac	ctgattccctg	ccgcccagct	taaaaacaca	2100
aaccagaaga	aggagctgga	agtggactgt	ggcctggaca	agtccaactg	tggcaaacag	2160
caaaaccaca	cattggacta	taatctggcc	ccagggcccc	tggggcgggg	gaccatgcca	2220
ggaaagtttc	cccacagtga	caagagctta	ggagagaagg	cgccactgcg	gttacacagt	2280
gaaaagccag	agtgtcggat	atcagcgata	tgtctcccca	gggactccat	gtaccagtct	2340
gtgtgtttga	tatcagagga	gaggaatgaa	tgtgtcattg	ccacggaggt	ataaggcagg	2400
agcctacctg	gacatccctg	ctcagccccg	cggctggacc	ttccttctgc	attgtttaca	2460
ttgcacccctg	gatgggacgt	ttttcatatg	caacgtgctg	ctctcaggag	gaggagggaa	2520
tggcaggaac	cggacagact	gtgaacttgc	caagagatgc	aatacccttc	cacacctttg	2580
ggtgtctgtc	tggcatcaga	ttggcagctg	caccaaccag	aggaacagaa	gagaagagag	2640
atgccactgg	gcactgccct	gccagtagtg	gccttcaggg	ggctccttcc	ggggctccgg	2700
cctgttttcc	agagagagtg	gcagttagccc	catggggccc	ggagctgctg	tggcctccac	2760
tggcatccgt	gtttccaaaa	gtgccttttg	cccaggctcc	acggcgacag	ttgggcccac	2820
atcagaaaag	agagaggggg	ccaatgaggg	cagggcctcc	tgtgggctgg	aaaaccactg	2880
ggtgcgtctc	ttgctggggg	ttgccctgga	ggtgaggtga	gtgctcgagg	gaggggagtg	2940
ctttctgccc	catgcctcca	actactgtat	gcaggcctgg	ctctctggtc	taggcccttt	3000
gggcaagaat	gtccgtctac	ccggcttcca	ccacctctg	gccctgggct	tctgtaagca	3060
gacaggcaga	gggcctgccc	ctcccaccag	ccaaggggtg	caggcctaac	tggggcactc	3120
agggcagtg	gttggaat	ccactgaggg	ggaaatcagg	tgctgcggcc	gcctgggccc	3180
tttcctccct	caagcccctc	tccacaacct	cagacctggg	ctctggtcca	ctactgcccc	3240
agaccaccct	caaagctggg	cttcagaaa	caataatatg	agtttttatt	ttgttttttt	3300
tttttttttt	ctagtttatt	ttggagtcta	gtatttcaat	aatttaagaa	tcagaagcac	3360
tgacctttct	acattttata	acattatttt	gtatataatg	tgtattttata	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	Asp	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	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	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
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
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

ES 2 858 248 T3

atataagaaa	ggctctggag	caagcaggtt	tcagtagcgg	cgctgctcgc	aggctaggaa	60
cccagggcc	agagctgcag	ccaaagtcac	ttgggtgcag	tgtactccct	cactagcccc	120
ctcgagaccc	taggatttgc	tccaggacac	gtacttagag	cagccaccgc	ccagtgcgcc	180
tcacctggat	tacctaccga	ggcatcgagc	agcggagttt	ttgagaaggc	gacaaggggag	240
cagcgtccc	aggggaatca	gcttttcagg	aactcggctg	gcagacggga	cttgcggggag	300
agcgacatcc	ctaacaagca	gattcggagt	cccggagtgg	agaggacacc	ccaagggatg	360
acgcctgcgt	cccggagcgc	ctgtcgcgtg	gcgctactgc	tgtcggcggg	actgtggccg	420
cagcagcgcg	ctgcgggctc	cggcatcttc	cagctgcggc	tgcaggagtt	cgtcaaccag	480
cgcggtatgc	tggccaatgg	gcagtccctg	gaaccgggct	gccggacttt	cttccgcctc	540
tgccttaagc	acttccaggc	aacctttctc	gagggaccct	gcacctttgg	caatgtctcc	600
acgccgggat	tgggcaccaa	ctccttcgtc	gtcagggaca	agaatagcgg	cagtgtgcgc	660
aacctctgc	agttgccctt	caatttcacc	tggccgggaa	ccttctcact	caacatccaa	720
gcttggcaca	caccgggaga	cgacctgcgg	ccagagactt	cgccaggaaa	ctctctcatc	780
agccaaatca	atctccaagg	ctctcttgct	gtgggtaaga	tttggcgaac	agacgagcaa	840
aatgacaccc	tcaccagact	gagctactct	taccgggtca	tctgcagtga	caactactat	900
ggagagagct	gttctcgcct	atgcaagaag	cgcgatgacc	acttcggaca	ttatgagtgc	960
cagccagatg	gcagcctgtc	ctgcctgccg	ggctggactg	ggaagtactg	tgaccagcct	1020
atatgtcttt	ctggctgtca	tgagcagaat	ggttactgca	gcaagccaga	tgagtgcctc	1080
tgcctccag	gttggcaggg	tcgcctgtgc	aatgaatgta	tccccacaa	tggctgtcgt	1140
catggcacct	gcagcatccc	ctggcagtg	gcctgcgatg	agggatgggg	aggctctgtt	1200
tgtgaccaag	atctcaacta	ctgtactcac	cactctccgt	gcaagaatgg	atcaacgtgt	1260
tccaacagt	ggccaaagg	ttatacctgc	acctgtctcc	caggctacac	tggtagcac	1320
tgtgagctgg	gactcagcaa	gtgtgccagc	aacctctgtc	gaaatggtgg	cagctgtaag	1380
gaccaggaga	atagctacca	ctgcctgtgt	ccccaggct	actatggcca	gcactgtgag	1440
catagtacct	tgacctgcgc	ggactcaccc	tgcttcaatg	ggggtctctg	ccgggagcgc	1500
aaccaggggt	ccagttatgc	ctgcgaatgc	cccccaact	ttaccggctc	taactgtgag	1560
aagaaagtag	acaggtgtac	cagcaaccgc	tgtgccaatg	gaggccagt	ccagaacaga	1620
ggccaagcc	gaacctgccg	ctgccggcct	ggattcacag	gcacccactg	tgaactgcac	1680
atcagcgatt	gtgccgaag	tcctgtgtgc	cacgggggca	cttgccacga	tctggagaat	1740
gggcctgtgt	gcacctgccc	cgctggcttc	tctggaaggc	gctgcgaggt	gcggataaac	1800

cacgatgcct	gtgcctccgg	accctgcttc	aatggggcca	cctgctacac	tggcctctcc	1860
ccaaacaact	tcgtctgcaa	ctgtccttat	ggctttgtgg	gcagccgctg	cgagtttccc	1920
gtgggcttgc	caccagctt	cccctgggta	gctgtctcgc	tgggcgtggg	gctagtggta	1980
ctgctggtgc	tcctggtcat	ggtggtagt	gctgtgcggc	agctgcggct	tcggaggccc	2040
gatgacgaga	gcagggaagc	catgaacaat	ctgtcagact	tccagaagga	caacctaatc	2100
cctgccgccc	agctcaaaaa	cacaaaccag	aagaaggagc	tggaaagtga	ctgtggtctg	2160
gacaagtcca	attgtggcaa	actgcagaac	cacacattgg	actacaatct	agccccggga	2220
ctcctaggac	ggggcggtcat	gcctgggaag	tatcctcaca	gtgacaagag	cttaggagag	2280
aaggtgccac	ttcgggttaca	cagtgagaag	ccagagtgtc	gaatatcagc	catttgctct	2340
cccagggact	ctatgtacca	atcagtgtgt	ttgatatcag	aagagaggaa	cgagtgtgtg	2400
attgccacag	aggtataagg	caggagccta	ctcagacacc	cagctccggc	ccagcagctg	2460
ggccttcctt	ctgcattgtt	tacattgcat	cctgtatggg	acatctttag	tatgcacagt	2520
gctgctctgc	ggaggaggag	gaaatggcat	gaactgaaca	gactgtgaac	ccgccaagag	2580
tcgcaccggc	tctgcacacc	tccaggagtc	tgcttggtct	cagatgggca	gccccgcca	2640
gggaacagag	ttgaggagtt	agaggagcat	cagttgagct	gatatctaag	gtgcctctcg	2700
aacttgagct	tgtcttgcca	acagtgtgca	tcatggagct	cttgactgtt	ctccagagag	2760
tggcagtgcc	cctagtgggt	cttggcgctg	ctgtagctcc	tgtgggcatc	tgtatttcca	2820
aagtgccttt	gcccagactc	catcctcaca	gctggggcca	aatgagaaa	cagagaggag	2880
gcttgcaaa	gataggcctc	ccgcaggcag	aacagccttg	gagtttggca	ttaagcagga	2940
gctactctgc	aggtgaggaa	agcccagga	ggggacacgt	gtgactcctg	cctccaaccc	3000
cagtaggtgg	agtgccacct	gtagcctcta	ggcaagagtt	ggtccttccc	ctggctcctg	3060
tgcctctggg	ctcatgtgaa	cagatgggct	tagggcacgc	cccttttgcc	agccaggggt	3120
acaggcctca	ctggggagct	cagggccttc	atgctaaact	cccaataagg	gagatggggg	3180
gaagggggct	gtggcctagg	cccttcctc	cctcacacc	atttctgggc	ccttgagcct	3240
gggtccacc	agtgccact	gctgccccga	gaccaacctt	gaagccgatc	ttcaaaaatc	3300
aataatatga	ggttttgttt	tgtagtttat	tttggaatct	agtattttga	taatttaaga	3360
atcagaagca	ctggcctttc	tacattttat	aacattat	tgtatataat	gtgtatttat	3420
aatatgaaac	agatgtgtac	aggaatttat	t			3451

5 <210> 10
 <211> 686
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

ES 2 858 248 T3

<400> 10

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

Ser	Gly	Cys	His	Glu	Gln	Asn	Gly	Tyr	Cys	Ser	Lys	Pro	Asp	Glu	Cys
225					230					235					240
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	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					320
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					400
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	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*

ES 2 858 248 T3

<400> 11

```

agctggggta aggagttcaa ggcagcgccc acacccgggg gctctccgca acccgaccgc      60
ctgtccgctc cccacttcc cgccctccct cccacctact cattcaccca cccaccacc      120
cagagccggg acggcagccc aggcgcccgg gccccgcccgt ctccctcgccg cgatcctgga      180
cttcctcttg ctgcaggacc cggcttccac gtgtgtcccg gagccggcgt ctcagcacac      240
gctccgctcc gggcctgggt gcctacagca gccagagcag cagggagtc ccggacccggg      300
cggcatctgg gccaaagttag gcgccgccga ggccagcgt gaacgtctcc agggccggag      360
gagccgcggg gcgtccgggt ctgagccgca gcaaatgggc tccgacgtgc gggacctgaa      420
cgcgctgctg cccgccgtcc cctccctggg tggcggcgcc ggctgtgccc tgcctgtgag      480
cggcgcgggc cagtggcgcg cgggtgctgga ctttgcgccc ccggcgcgctt cggcttacgg      540
gtcgttgggc ggccccgcgc cgccaccggc tccgcgcgca ccccgccgc cgccgcctca      600
ctccttcatc aaacaggagc cgagctgggg cggcgcgagg ccgcacgagg agcagtgcc      660
gagcgccttc actgtccact tttccggcca gttcactggc acagccggag cctgtcgcta      720
cgggcccctt ggtcctcctc cgcccagcca ggctcatcc ggccaggcca ggatgtttcc      780
taacgcgccc tacctgccc gctgcctcga gagccagccc gctattcgca atcagggtta      840
cagcacggtc acctcgacg ggacgcccag ctacggctac acgcccctcg accatgcggc      900
gcagttcccc aacctcatc tcaagcatga ggatcccatg ggccagcagg gctcgtgagg      960
tgagcagcag tactcgggtc cgccccgggt ctatggctgc cacaccccca ccgacagctg     1020
caccggcagc caggctttgc tgctgaggac gccctacagc agtgacaatt tataccaaat     1080
gacatcccag ctgtaagca tgacctgaa tcagatgaac ttaggagcca ccttaaaggg     1140
ccacagcaca ggttacgaga gcgataacca cacaacgccc atcctctgag gagccaata     1200
cagaatacac acgcacgggt tcttcagagg cattcaggat gtgcgacgtg tgcctggagt     1260
agccccgact cttgtacggt cggcatctga gaccagttag aaacgcccct tcatgtgtgc     1320
ttaccagggc tgcaataaga gatattttaa gctgtcccac ttacagatgc acagcaggaa     1380
gcacactggg gagaaacat accagtgtga cttcaaggac tgtgaacgaa ggttttctcg     1440
ttcagaccag ctcaaaagac accaaaggag acatacaggt gtgaaacat tccagtgtaa     1500
aacttgtcag cgaaagttct cccggtccga ccactgaag acccacacca ggactcatc     1560
aggtgaaaag cccctcagct gtcggtggcc aagttgtcag aaaaagtttg cccggtcaga     1620
tgaattagtc cgccatcaca acatgcatca gagaaacatg accaaactcc agctggcgct     1680
ttgaggggtc tccctcgggg accgttcagt gtcccaggca gcacagtgtg tgaactgctt     1740
tcaagtctga ctctccactc ctccctacta aaaaggaaac ttcagttgat cttcttcatc     1800
caacttccaa gacaagatac cgggtgcttct ggaaactacc aggtgtgcct ggaagagttg     1860
gtctctgccc tgcctacttt tagttgactc acaggccctg gagaagcagc taacaatgtc     1920
tggttagtta aaagccatt gccatttggg gtggattttc tactgtaaga agagccatag     1980
ctgatcatgt cccctgacc cttcccttct ttttttatgc tcgttttcgc tggggatgga     2040
attattgtac cattttctat catggaatat ttataggcca gggcatgtgt atgtgtctgc     2100
taatgtaaac tttgtcatgg tttccattta ctaacagcaa cagcaagaaa taaatcagag     2160
agcaaggcat cgggggtgaa tcttgtctaa cattcccag gtccagccagg ctgctaacct     2220
ggaaaagcag atgtagttct gccaggcaac ttttaaagct catgcatttc aagcagctga     2280
agaaaaaatc agaactaacc agtacctctg tatagaaatc taaaagaatt ttaccattca     2340
gttaattcaa tgtgaacact ggcacactgc tcttaagaaa ctatgaagat ctgagatttt     2400
tttgtgtatg ttttgtactc ttttgagtgg taatcatatg tgtctttata gatgtacata     2460
ctccttgcga caaatggagg ggaattcatt ttcactactg ggagtgtcct tagtgtataa     2520
aaaccatgct ggtatatggc ttcaagtgtg aaaaatgaaa gtgactttaa aagaaaatag     2580
gggatgggtc aggatctcca ctgataagac tgttttttaag taacttaagg acctttgggt     2640
ctacaagtat atgtgaaaaa aatgagactt actgggtgag gaaatccatt gtttaaaagat     2700
ggtcgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt tgttgtgttt tgttttttaa     2760
gggaggggaa ttattattta ccgttgcttg aaattactgt gtaaataatg gtctgataat     2820
gatttgctct ttgacaacta aaattaggac tgtataagta ctagatgcat cactgggtgt     2880
tgatcttaca agatattgat gataacactt aaaattgtaa cctgcatttt tcactttgct     2940
ctcaattaaa gtctattcaa aaggaaaaaa aaaaaaa      2977

```

5 <210> 12
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <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	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	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	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Pro			
		115					120					125					
Pro	Pro	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	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	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	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

5

agctggggta	aggagttcaa	ggcagcgccc	acacccgggg	gctctccgca	acccgaccgc	60
ctgtccgctc	ccccacttcc	cgccctccct	cccactact	cattcaccga	cccacccacc	120
cagagccggg	acggcagccc	aggcgcccg	gccccgcgt	ctcctcgccg	cgatcctgga	180
cttcctcttg	ctgcaggacc	cggttccac	gtgtgtccc	gagccggcgt	ctcagcacac	240
gctccgctcc	gggcctgggt	gcctacagca	gccagagcag	cagggagtc	gggacccggg	300
cggcacatctg	gccaagttag	gcgcgcgca	ggccagcgct	gaacgtctcc	agggccggag	360
gagccgcggg	gcgtccgggt	ctgagccgca	gcaaatgggc	tccgacgtgc	gggacctgaa	420
cgcgctgctg	cccgccgtcc	cctccctggg	tggcgggcgc	ggctgtgccc	tgcctgtgag	480
cggcgccggc	cagtggggcg	cggtgtgga	ctttgcgccc	ccggcgctt	cggcttacgg	540
gtcgtttggc	ggccccgcgc	cgccaccggc	tccgcgcga	ccccgcgcg	cgccgcctca	600
ctccttcac	aaacaggagc	cgagtcggg	cggcgcggag	ccgcacgag	agcagtgcc	660
gagcgccttc	actgtcca	tttccggcca	gttactggc	acagccggag	cctgtcgcta	720
cgggcccttc	ggtcctcctc	cgcccagcca	ggcgtcatcc	ggccaggcca	ggatgtttcc	780
taacgcgccc	tactgccc	gctgcctcga	gagccagccc	gctattcgca	atcagggtta	840
cagcacggtc	accttcgacg	ggacgcccag	ctacggtcac	acgccctcgc	accatgcggc	900
gcagttcccc	aaccactcat	tcaagcatga	ggatcccag	ggccagcagg	gctcgctggg	960
tgagcagcag	tactcggtgc	cgccccggg	ctatggctgc	cacaccccca	ccgacagctg	1020
caccggcagc	caggctttgc	tgctgaggac	gccctacagc	agtgacaatt	tataccaaat	1080
gacatcccag	cttgaatgca	tgacctggaa	tcagatgaac	ttaggagcca	ccttaaaggg	1140
agttgctgct	gggagctcca	gctcagtga	atggacagaa	gggagagca	accacagcac	1200
agggtacgag	agcgataacc	acacaacgcc	catcctctgc	ggagcccaat	acagaataca	1260
cacgcacggt	gtcttcagag	gcattcagga	tgtgcgacgt	gtgcctggag	tagccccgac	1320
tcttgtacgg	tcggcatctg	agaccagtga	gaaacgcccc	ttcatgtgtg	cttaccagg	1380
ctgcaataag	agatatttta	agctgtccca	cttacagatg	cacagcagga	agcacactgg	1440
tgagaaccca	taccagtgtg	acttcaagga	ctgtgaacga	aggttttctc	gttcagacca	1500
gctcaaaaga	taccaaagga	gacatacagg	tgtgaaacca	ttccagtgtg	aaacttgtca	1560
gcgaaagttc	tcccggtccg	accacctgaa	gaccacaccc	aggactcata	cagggtgaaa	1620
gcccttcagc	tgtcgggtgg	caagttgtca	gaaaaagttt	gcccgggtcag	atgaattagt	1680
ccgccatcac	aacatgcac	agagaaacat	gaccaaactc	cagctggcgc	tttgaggggt	1740
ctccctcggg	gaccgttcag	tgtcccaggc	agcacagtgt	gtgaactgct	ttcaagtctg	1800
actctccact	cctcctcact	aaaaaggaaa	cttcagttga	tcttcttcat	ccaacttcca	1860
agacaagata	ccggtgcttc	tggaaactac	cagggtgtgc	tggaaagatt	ggtctctgcc	1920
ctgcataact	ttagttgact	cacagccct	ggagaagcag	ctaacaatgt	ctggttagtt	1980
aaaagcccat	tgcattttgg	tgtggatttt	ctactgtaag	aagagccata	gctgatcatg	2040
tccccctgac	ccttcccttc	tttttttatg	ctcgttttgc	ctggggatgg	aattattgta	2100
ccattttcta	tcatggaata	tttataggcc	agggcatgtg	tatgtgtctg	ctaattgtaa	2160
ctttgtcatg	gtttccattt	actaacagca	acagcaagaa	ataaatcaga	gagcaaggca	2220
tcgggggtga	atcttgtcta	acattcccga	ggtcagccag	gctgctaacc	tggaaagcag	2280
gatgtagttc	tgccaggcaa	cttttaaaag	tcatgcattt	caagcagctg	aagaaaaaat	2340
cagaactaac	cagtacctct	gtatagaaat	ctaaaagaat	tttaccattc	agtttaattca	2400
atgtgaacac	tggcacactg	ctcttaagaa	actatgaaga	tctgagattt	ttttgtgtat	2460
gtttttgact	cttttgagtg	gtaatcatat	gtgtctttat	agatgtacat	acctccttgc	2520
acaaatggag	gggaattcat	tttcatcact	gggagtgtcc	ttagtgtata	aaaaccatgc	2580
tgggtatatg	cttcaagttg	taaaaatgaa	agtgaactta	aaagaaaata	ggggtgggtc	2640
caggatctcc	actgataaga	ctgtttttta	gtaacttaag	gacctttggg	tctacaagta	2700
tatgtgaaaa	aatgagact	tactgggtga	ggaaatccat	tgttttaaga	tggtcgtgtg	2760
tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtt	gtgtgtgtgt	ttgtttttta	agggagggaa	2820
tttattattt	accgttgctt	gaaattactg	tgttaatatata	tgtctgataa	tgattttgctc	2880
tttgacaact	aaaattagga	ctgtataaag	actagatgca	tcactgggtg	ttgatcttac	2940
aagatattga	tgataaacact	taaaattgta	acctgcattt	ttcactttgc	tctcaattaa	3000
agtctattca	aaaggaaaaa	aaaaaaaa				3028

<210> 14
<211> 514
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

10

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	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	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	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	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	Glu	Lys	Pro	Phe	Ser
465					470					475					480
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

```

agctggggta aggagttcaa ggcagcgccc acacccgggg gctctccgca acccgaccgc      60
ctgtccgctc cccacttcc cgccctccct cccactact cattcaccce cccaccacc      120
cagagccggg acggcagccc aggcgcccgg gcccgcgggt ctccctcgccg cgatcctgga      180
cttcctcttg ctgcaggacc cggcttccac gtgtgtcccg gagccggcgt ctcagcacac      240
gctccgctcc gggcctgggt gcctacagca gccagagcag cagggagtcc gggacccggg      300
cggcatctgg gccaaagttag gcgcccgcga ggccagcgct gaacgtctcc agggccggag      360
gagcccgggg gcgtccgggt ctgagccgca gcaaattgggc tccgacgtgc gggacctgaa      420
cgcgctgctg cccgcggtcc cctccctggg tggcgcgggc ggctgtgccc tgcctgtgag      480
cggcgcgggc cagtgggcgc cgggtgctga ctttgcgccc ccgggcgctt cggcttacgg      540
gtcgttgggc ggccccgcgc cgccaccggc tccgcccga ccccgccgc cgccgcctca      600
ctccttcata aaacaggagc cgagctgggg cggcgcgagg ccgcacgagg agcagtgcct      660
gagcgccctc actgtccact tttccggcca gttcactggc acagccggag cctgtcgcta      720
cgggcccctc ggtcctcctc cgcccagcca ggcgatccc ggccaggcca ggaattttcc      780
taacgcgccc tacctgccc gctgcctcga gagccagccc gctattcgca atcagggtta      840
cagcacggtc accttcgacg ggacgcccag ctacggtcac acgcccctgc accatgcggc      900
gcagttcccc aaccactcat tcaagcatga ggatcccatg ggccagcagg gctcgctggg      960
tgagcagcag tactcggtgc cgccccgggt ctatggctgc cacaccccca ccgacagctg     1020
caccggcagc caggctttgc tgctgaggac gccctacagc agtgacaatt tataccaaat     1080
gacatcccag cttgaatgca tgacctggaa tcagatgaac ttaggagcca ccttaaaggg     1140
agttgctgct gggagctcca gctcagtga atggacagaa gggcagagca accacagcac     1200
agggtacagc agcgataacc acacaacgcc catcctctgc ggagccaat acagaatata     1260
cacgcacggg gtcttcagag gcattcagga tgtgcgacgt gtgcctggag tagccccgac     1320
tcttgtagcg tcggcatctg agaccagtga gaaacgcccc ttcagtgtgt cttaccagg     1380
ctgcaataag agatatttta agctgtccca cttacagatg cacagcagga agcacactgg     1440
tgagaaacca taccagtgtg acttcaagga ctgtgaacga aggttttctc gttcagacca     1500
gctcaaaaga caccaaagga gacatacagg tgtgaaacca ttccagtgtg aaacttgtca     1560
gcgaaagtgc tcccgggtccg accacctgaa gaccacacac aggactcata caggtaaaac     1620
aagtgaagag cccttcagct gtcgggtggc aagttgtcag aaaaagtttg cccgggtcaga     1680
tgaattagtc cgccatcaca acatgcata gagaaacatg accaaactcc agctggcgct     1740
ttgaggggtc tccctcgggg accgttcagt gtcccagcca gcacagtgtg tgaactgctt     1800
tcaagtctga ctctccactc ctccctacta aaaaggaaac ttcagttgat cttcttcata     1860
caacttccaa gacaagatac cgggtgcttct ggaaactacc aggtgtgcct ggaagagttg     1920
gtctctgccc tgcctacttt tagttgactc acaggcctcg gagaagcagc taacaatgtc     1980
tggttagtta aaagcccatt gccatttggt gtggattttc tactgtaaga agagccatag     2040
ctgatcatgt cccctgacc cttcccttct ttttttatgc tcgttttcgc tggggatgga     2100
attattgtac cattttctat catggaatat ttataggcca gggcatgtgt atgtgtctgc     2160
taatgtaaac tttgtcatgg tttccattta ctaacagcaa cagcaagaaa taaatcagag     2220
agcaaggcat cgggggtgaa tcttgtctaa cattcccag gtcagccagg ctgctaacct     2280
ggaaagcagg atgtagttct gccaggcaac ttttaaagct catgcatttc aagcagctga     2340
agaaaaaatc agaactaacc agtacctctg tatagaaatc taaaagaatt ttaccattca     2400
gttaattcaa tgtgaacact ggcacactgc tcttaagaaa ctatgaagat ctgagatttt     2460
tttggtgatg tttttgactc ttttgagtgg taatcatatg tgtctttata gatgtacata     2520
cctccttgca caaatggagg ggaattcatt ttcactactg ggagtgtcct tagtgtataa     2580
aaaccatgct ggtatatggc ttcaagttgt aaaaatgaaa gtgactttta aagaaaaatag     2640
gggatggctc aggatctcca ctgataagac tgtttttaag taacttaagg acctttgggt     2700
ctacaagtat atgtgaaaaa aatgagactt actgggtgag gaaatccatt gtttaaagat     2760
ggtcgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt tgttgtgttt tgttttttaa     2820
gggaggggaat ttattattta ccgttgcttg aaattactgt gtaaatatat gtctgataat     2880
gatttgctct ttgacaacta aaattaggac tgtataagta ctagatgcat cactgggtgt     2940
tgatcttaca agatattgat gataacactt aaaattgtaa cctgcatttt tcactttgct     3000
ctcaattaaa gtctattcaa aaggaaaaaa aaaaaaa      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 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 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 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 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 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

```

ES 2 858 248 T3

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

aggcgctttc	accactgccc	ctcccggggg	gacctgaagg	agaggggttg	aggccggtct	60
ttgcccgccg	aggtctgctg	gtccggtctg	ggaggaggcc	taggagggct	cgcgggccac	120
gggcatcctt	ggggccgagt	tctggggtgc	ggacggacgt	ctcgagagtg	ggtgccgcga	180
ctcgggaccc	acggccctcg	ccgggcacgg	acagttgcgg	agcagggctc	tgaggattgt	240
gcagtgccct	gggtccctgc	ctactcctgg	gctcaggaat	ggagaagggt	tacagcacgg	300
tcaccttcga	cgggacgccc	agctacggtc	acacgcccctc	gcaccatgcg	gcgcagttcc	360
ccaaccactc	attcaagcat	gaggatccca	tggggccagca	gggctcgctg	ggtgagcagc	420
agtactcggt	gcccggccccg	gtctatggct	gccacacccc	caccgacagc	tgcaccggca	480
gccaggcttt	gctgctgagg	acgcccata	gcagtgacaa	tttataccaa	atgacatccc	540
agcttgaatg	catgacctgg	aatcagatga	acttaggagc	caccttaaag	ggccacagca	600
caggggtacga	gagcgataac	cacacaacgc	ccatcctctg	cggagcccaa	tacagaatac	660
acacgcacgg	tgtcttcaga	ggcattcagg	atgtgcgacg	tgtgcctgga	gtagccccga	720
ctcttgtagc	gtcggcatct	gagaccagt	agaaacgccc	cttcatgtgt	gcttaccag	780
gctgcaataa	gagatatattt	aagctgtccc	acttacagat	gcacagcagg	aagcacactg	840
gtgagaaacc	ataccagtgt	gacttcaagg	actgtgaacg	aaggttttct	cgttcagacc	900
agctcaaaaag	acaccaaagg	agacatacag	gtgtgaaacc	attccagtgt	aaaacttgtc	960
agcgaaagtt	ctcccgggtcc	gaccacctga	agaccacac	caggactcat	acaggtaaaa	1020
caagtgaaaa	gcccttcagc	tgtcgggtggc	caagttgtca	gaaaaagttt	gcccggtcag	1080
atgaattagt	ccgccaatcac	aacatgcatc	agagaaacat	gaccaaactc	cagctggcgc	1140
tttgagggggt	ctccctcggg	gaccgttcag	tgtcccaggc	agcacagtgt	gtgaactgct	1200
ttcaagtctg	actctccact	cctcctcact	aaaaaggaaa	cttcagttga	tcttcttcat	1260
ccaacttcca	agacaagata	ccggtgcttc	tggaaactac	caggtgtgcc	tggaaagagt	1320
ggtctctgcc	ctgcctactt	ttagttgact	cacaggccct	ggagaagcag	ctaacaatgt	1380
ctggttagtt	aaaagcccat	tgccatttgg	tgtggatttt	ctactgtaag	aagagccata	1440
gctgatcatg	tccccctgac	ccttcccttc	tttttttatg	ctcgttttcg	ctggggatgg	1500
aattattgta	ccatttttcta	tcatggaata	tttataggcc	agggcatgtg	tatgtgtctg	1560
ctaattgtaa	ctttgtcatg	gtttccattt	actaacagca	acagcaagaa	ataaatcaga	1620
gagcaaggca	tcggggggtga	atcttgtcta	acattcccga	ggtcagccag	gctgctaacc	1680
tggaaagcag	gatgtagttc	tgccaggcaa	cttttaaagc	tcatgcattt	caagcagctg	1740
aagaaaaaat	cagaactaac	cagtacctct	gtatagaaat	ctaaaagaat	tttaccattc	1800
agttaattca	atgtgaacac	tggcacactg	ctcttaagaa	actatgaaga	tctgagattt	1860
ttttgtgtat	gtttttgact	cttttgagt	gtaatcatat	gtgtctttat	agatgtacat	1920
acctccttgc	acaaatggag	gggaattcat	tttcatcact	gggagtgtcc	ttagtgtata	1980
aaaacccatgc	tggatatatg	cttcaagttg	taaaaatgaa	agtgacttta	aaagaaaata	2040
ggggatggtc	caggatctcc	actgataaga	ctgtttttta	gtaacttaag	gacctttggg	2100
tctacaagta	tatgtgaaaa	aaatgagact	tactgggtga	ggaaatccat	tgttttaaga	2160
tggtcgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtt	gtgttgtgtt	ttgtttttta	2220
agggaggggaa	tttattattt	accgttgctt	gaaattactg	tgtaaatata	tgtctgataa	2280
tgatttgctc	tttgacaact	aaaattagga	ctgtataagt	actagatgca	tcactgggtg	2340
ttgatcttac	aagatatattg	tgataacact	taaaattgta	acctgcattt	ttcactttgc	2400
tctcaattaa	agtctattca	aaaggaaaaa	aaaaaaa			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 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	160
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	240
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 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

5 <210> 19
 <211> 2480
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 19

ES 2 858 248 T3

aggcgctttc	accactgccc	ctcccggggg	gacctgaagg	agagggtttg	aggccggtct	60
ttgcccgcgc	aggtctgcgt	gtccggtctg	ggaggaggcc	taggagggtc	cgccggccac	120
gggcatcctt	gggcccagat	tctggggtgc	ggacggacgt	ctcgagagt	ggtgccgcga	180
ctcgggaccc	acggccctcg	ccgggcacgg	acagttgcgg	agcagggtc	tgaggattgt	240
gcagtgccct	gggtccctgc	ctactcctgg	gctcaggaat	ggagaagggt	tacagcacgg	300
tcaccttcga	cgggacgccc	agctacggtc	acacgccctc	gcaccatgcg	gcgcagttcc	360
ccaaccactc	attcaagcat	gaggatccca	tgggccagca	gggctcgctg	ggtgagcagc	420
agtactcgtg	gcccggcccg	gtctatggct	gccacacccc	caccgacagc	tgcaccggca	480
gccaggcttt	gctgctgagg	acgccctaca	gcagtgacaa	tttatacca	atgacatccc	540
agcttgaatg	catgacctgg	aatcagatga	acttaggagc	caccttaaag	ggagttgctg	600
ctgggagctc	cagctcagtg	aaatggacag	aagggcagag	caaccacagc	acagggtacg	660
agagcgataa	ccacacaacg	cccacctct	gcggagccca	atacagaata	cacacgcacg	720
gtgtcttcag	aggcattcag	gatgtgcgac	gtgtgcctgg	agtagccccg	actcttgtag	780
ggtcggcatc	tgagaccagt	gagaaacgcc	ccttcattgtg	tgcttaccga	ggctgcaata	840
agagatattt	taagctgtcc	cacttacaga	tgcacagcag	gaagcacact	ggtgagaaac	900
cataccagtg	tgacttcaag	gactgtgaac	gaagggtttc	tcgttcagac	cagctcaaaa	960
gacaccaaag	gagacataca	ggtgtgaaac	cattccagt	taaaacttgt	cagcgaaagt	1020
tctcccggtc	cgaccacctg	aagaccacac	ccaggactca	tacagggtgaa	aagcccttca	1080
gctgtcggtg	gccaagttgt	cagaaaaagt	ttgcccggtc	agatgaatta	gtccgccatc	1140
acaacatgca	tcagagaaac	atgaccaaac	tccagctggc	gctttgaggg	gtctccctcg	1200
gggaccgttc	agtgtcccag	gcagcacagt	gtgtgaactg	ctttcaagtc	tgactctcca	1260
ctcctcctca	ctaaaaagga	aacttcagtt	gatcttcttc	atccaacttc	caagacaaga	1320
taccggtgct	tctggaaact	accaggtgtg	cctggaagag	ttggtctctg	ccctgcctac	1380
ttttagttga	ctcacaggcc	ctggagaagc	agctaacaat	gtctggttag	ttaaaagccc	1440
attgccattt	ggtgtggatt	ttctactgta	agaagagcca	tagctgatca	tgtccccctg	1500
acccttccct	tcttttttta	tgctcgtttt	cgctggggat	ggaattattg	taccattttc	1560
tatcatggaa	tatttatagg	ccagggcatg	tgtatgtgtc	tgctaattga	aactttgtca	1620
tggtttccat	ttactaacag	caacagcaag	aaataaatca	gagagcaagg	catcgggggt	1680
gaatcttgtc	taacattccc	gaggtcagcc	aggctgctaa	cctggaaagc	aggatgtagt	1740
tctgccaggc	aactttttaa	gctcatgcat	ttcaagcagc	tgaagaaaaa	atcagaacta	1800
accagtacct	ctgtatagaa	atctaaaaga	attttaccat	tcagtttaatt	caatgtgaac	1860
actggcacac	tgctcttaag	aaactatgaa	gatctgagat	ttttttgtgt	atgtttttga	1920
ctcttttgag	tggtaatcat	atgtgtcttt	atagatgtac	atacctcctt	gcacaaatgg	1980
aggggaattc	attttcatca	ctgggagtgt	ccttagtgta	taaaaacccat	gctggtatat	2040
ggcttcaagt	tgtaaaaatg	aaagtgactt	taaaagaaaa	taggggatgg	tccaggatct	2100
ccactgataa	gactgttttt	aagtaactta	aggacctttg	ggtctacaag	tatatgtgaa	2160
aaaaatgaga	cttactgggt	gaggaaatcc	attgttttaa	gatggtcgtg	tgtgtgtgtg	2220
tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	ttgtgttgtg	ttttgttttt	taaggagggg	aattttattat	2280
ttaccgttgc	ttgaaattac	tgtgtaaata	tatgtctgat	aatgatttgc	tctttgacaa	2340
ctaaaattag	gactgtataa	gtactagatg	catcactggg	tgttgatctt	acaagatatt	2400
gatgataaca	cttaaaattg	taacctgcat	ttttcacttt	gctctcaatt	aaagtctatt	2460
caaaaaggaaa	aaaaaaaaaa					2480

5 <210> 20
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 20

Met 1	Glu	Lys	Gly	Tyr 5	Ser	Thr	Val	Thr	Phe 10	Asp	Gly	Thr	Pro	Ser 15	Tyr
Gly	His	Thr	Pro 20	Ser	His	His	Ala	Ala 25	Gln	Phe	Pro	Asn 30	His	Ser	Phe
Lys	His	Glu 35	Asp	Pro	Met	Gly	Gln 40	Gln	Gly	Ser	Leu	Gly 45	Glu	Gln	Gln
Tyr	Ser 50	Val	Pro	Pro	Pro	Val 55	Tyr	Gly	Cys	His	Thr 60	Pro	Thr	Asp	Ser
Cys 65	Thr	Gly	Ser	Gln 70	Ala	Leu	Leu	Leu	Arg	Thr 75	Pro	Tyr	Ser	Ser	Asp 80
Asn	Leu	Tyr	Gln 85	Met	Thr	Ser	Gln	Leu	Glu 90	Cys	Met	Thr	Trp 95	Asn	Gln
Met	Asn	Leu	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Lys	Gly 105	Val	Ala	Ala	Gly 110	Ser	Ser	Ser
Ser	Val	Lys 115	Trp	Thr	Glu	Gly	Gln 120	Ser	Asn	His	Ser	Thr 125	Gly	Tyr	Glu
Ser	Asp 130	Asn	His	Thr	Thr	Pro 135	Ile	Leu	Cys	Gly	Ala 140	Gln	Tyr	Arg	Ile
His 145	Thr	His	Gly	Val 150	Phe	Arg	Gly	Ile	Gln	Asp 155	Val	Arg	Arg	Val	Pro 160
Gly	Val	Ala	Pro 165	Thr	Leu	Val	Arg	Ser	Ala 170	Ser	Glu	Thr	Ser	Glu 175	Lys
Arg	Pro	Phe 180	Met	Cys	Ala	Tyr	Pro	Gly 185	Cys	Asn	Lys	Arg 190	Tyr	Phe	Lys
Leu	Ser	His 195	Leu	Gln	Met	His	Ser 200	Arg	Lys	His	Thr 205	Gly	Glu	Lys	Pro
Tyr	Gln 210	Cys	Asp	Phe	Lys	Asp 215	Cys	Glu	Arg	Arg	Phe 220	Ser	Arg	Ser	Asp
Gln 225	Leu	Lys	Arg	His 230	Gln	Arg	Arg	His	Thr	Gly 235	Val	Lys	Pro	Phe	Gln 240
Cys	Lys	Thr	Cys 245	Gln	Arg	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Asp 250	His	Leu	Lys	Thr 255
His	Thr	Arg	Thr 260	His	Thr	Gly	Glu 265	Lys	Pro	Phe	Ser 270	Cys	Arg	Trp	Pro
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		

5 <210> 21
 <211> 3092
 <212> DNA
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 21

tgtgtgaatg	gagcggcga	gcatcctggc	tcctcctcct	tccttgetgc	cggccctct	60
tatttgagct	ttgggaagct	gggggcagcc	aggcagctgg	ggtaaggagt	tcaaggcagc	120
gcccacaccc	ggggtctctc	gcaacccgac	cgcctgcctg	ctcccccttt	ccttttcccg	180
ccctccctcc	cacccactca	ttcaccaccc	caccagaga	gaggacggca	gccaggaac	240
ccggggccgc	cgcctcctcg	ccgcgatcct	ggacttcctc	ctgtcgaggg	agccggcttc	300
cacgtgtgtc	ccggagccgg	cgtctcagca	cacgtccgc	cgggagcccg	ggtgcgtcca	360
gcagccggag	caacctgggg	accgagggcc	ccggagcgcc	tgggccaaagt	ccagcgccga	420
gaatccgcag	gatcgagga	gcggagaacc	gtccgcatcc	gagccgcacc	tcatgggttc	480
cgacgtgcgg	gacctgaacg	cgctgctgcc	cgctgtgtct	tcgctggggc	gcggcgccgg	540
cggctgcggg	ctccctgtga	gcggcgagcc	gcagtggcg	cccgtgttgg	acttcgcgcc	600
tcggggcgcc	tcggcttacg	ggctcgctgg	cgggtccgcg	cctcctcccg	ctccgcgcgc	660
gcctccgccg	ccacccact	ccttcacaa	acaggagccc	agctggggcg	gcgcccagcc	720
acacgaggag	cagtgcctga	gcgccttcac	cttgcacttc	tcggggcag	taccgggtac	780
agccggggcc	tgctcgctac	gacccttcgg	tcctcccccg	cccagccagg	cgtcctcggg	840
ccaggccagg	atgttcccca	atgcgcctta	cctgccagc	tgctgggaga	gccagcctac	900
catccgcaac	caaggatata	gcacgggtcac	tttcgacggg	gcgcccagct	atggccacac	960
gccctcgcat	cacgcggcgc	agttcccca	ccattccttc	aaacacgagg	accccatggg	1020
ccagcagggc	tcgctggggc	agcagcagta	ctccgtgcc	cctccgggtg	atggctgcc	1080
caccctact	gacagttgca	caggcagcca	ggcctgctc	ctgaggacgc	cctacagcag	1140
tgacaattta	taccaaata	cctcccagct	tgaatgcatg	acctggaatc	agatgaacct	1200
aggagctacc	ttaaagggaa	tggtctgctg	gagctccagc	tcagtgaat	ggacagaagg	1260
gcagagcaac	cacggcacag	ggtatgagag	tgagaaccac	acggcccca	tcctctgtgg	1320
tgcccagtag	agaatacaca	cccacgggg	cttcggaggc	attcaggatg	tgccggcgtg	1380
atctggaagt	gccccaaact	ttgtccggtc	agcatctgaa	accagtgaga	aacgtccttt	1440
catgtgtgca	taccagggct	gcaataagag	atattttaag	ctgtccact	tacagatgca	1500
tagccggaag	cacactggtg	agaaaccata	ccagtgtgac	ttcaaggact	gcgagagaag	1560
gttttctcgc	tcagaccagc	tcaaaagaca	caaaggaga	cacacaggtg	tgaaaccatt	1620
ccagtgtaaa	acttgacag	gaaagttttc	ccggtccgac	catctgaaga	cccacaccag	1680
gactcatata	ggtaaaacaa	gtgaaaagcc	cctcagctgt	cgggtggcaca	gttgtcagaa	1740
aaagtgtgcg	cgctcagacg	aattgggtccg	ccatcacaa	atgcatcaga	gaaacatgac	1800
caaactccag	ctggcgcttt	gaggggtccg	acacggagac	agtccagcat	cccaggcagg	1860
aaagtgtgca	aactgcttcc	aaatctgatt	ttgaaattcc	tcccactcac	ctttcaaagg	1920
acacgactgt	ggatctacat	ccgacttcca	agacagcaca	cctgattgac	tgcatcctat	1980
caggtttgcc	ggaaggagtc	ggtgctccgc	ccacttttga	ttaactcaca	ggcctgaaaa	2040
aagtgtgtca	cgggtgtctag	aaagtccatt	gctattgtct	gaattttcta	ctgttagaag	2100
aaccattgtt	gataatgccc	cccggccccc	ccccgggtt	tcctcttctc	ctttgtgatc	2160
atttcccag	gattagagag	actgttacat	tttctttcat	gggatattta	taggccaggg	2220
catgtgtatg	tgctgtgtaa	tgtaaaactct	gtcatagtct	ccatttacta	actgccctag	2280
aaagaaataa	atcagagagc	aaggcaccag	gggcaagaat	cgtgcagaat	ttcagaggct	2340
tggtgtcaaa	cctggaaacc	tggaaggcca	gatgtaattc	tacaggcgat	tgtaaagct	2400
cataggtttt	gagtaactgc	atagtaggtt	ggtatttaact	agaactcctg	tatagttagg	2460
acagagagga	gccttcctgc	tcagctattc	actctgaaca	ctagcactgg	gctcttaaga	2520
aatgatgttt	taagagcaga	gatctttttt	taatgtcttt	gattttattt	ttagttgtaa	2580
ttaggtacat	cctcagagat	gtactttcct	cctctgtgct	aggatgtgga	ggactcagtt	2640
ccatcatctg	gggcatcttt	agagtgtata	gaccacactg	gttatgtggc	ttcaagttgt	2700
aaaaattaaa	atgactttta	aagaaactag	gggtcgttcc	aggatcttca	ctggtaagac	2760
tgttcttaag	taacttaagt	atctttgaat	ctgcaagtat	gtagggaaaa	aaaaaagata	2820
tattattgtg	aggaaatcca	ttgttttaag	gtgtgcgtgt	gttgtgtgtg	ttttttaaag	2880
ggagggagtt	tattattttac	tgtagcttga	aatactgtgt	aaatatatat	gtatatatat	2940
gatgtgctct	ttgtcaacta	aaattaggag	gtgtatggtg	ttagctgcat	cactgtgtgg	3000
atgtcaatct	tacagtgtat	tgatgataat	actaaaaatg	taacctgcat	ctttttccac	3060
ttggctgtca	attaaagtct	attcaaaagg	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	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	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	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	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					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	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					320
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					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

ES 2 858 248 T3

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

gccaggtctt	ccacccccac	ttcccaattg	aggaaaccga	ggcagaggag	gctcagagag	60
ctaccgggtg	accacagggt	cctccctccc	tgggatctac	acagaccatg	gccttgccaa	120
cggctcgacc	cctgttgagg	tctgtggga	cccccgccct	cggcagcctc	ctgttcctgc	180
tcttcagcct	cggatgggtg	cagccctcga	ggaccctggc	tggagagaca	gggcaggagg	240
ctgcgccccct	ggacggagtc	ctggccaacc	cacctaacat	ttccagcctc	tcccctcgcc	300
aactccttgg	cttcccgtgt	gcggagggtg	ccggcctgag	cacggagcgt	gtccgggagc	360
tggctgtggc	cttggcacag	aagaatgtca	agctctcaac	agagcagctg	cgctgtctgg	420
ctcaccggct	ctctgagccc	cccaggagacc	tggacgccct	cccattggac	ctgctgctat	480
tcctcaaccc	agatgcgttc	tcggggcccc	aggcctgcac	ccgtttcttc	tcccgcatca	540
cgaaggccaa	tgtggacctg	ctcccgaggg	gggctcccga	gcgacagcgg	ctgctgcttg	600
cggctctggc	ctgctggggg	gtgcgggggt	ctctgctgag	cgaggctgat	gtgcgggctc	660
tgggaggcct	ggcttgcgac	ctgcctgggc	gctttgtggc	cgagtcggcc	gaagtgtctg	720
taccccggtg	ggtgagctgc	ccgggacccc	tggaccagga	ccagcaggag	gcagccaggg	780
cggctctgca	gggcggggga	ccccccctacg	gccccccgtc	gacatggctc	gtctccacga	840
tggacgctct	cgggggcctg	ctgcccgtgc	tgggacagcc	catcatccgc	agcatccgcg	900
agggcatcgt	ggccgcgtgg	cggcaacgct	cctctcggga	cccatcctgg	cggcagcctg	960
aacggaccat	cctccggccg	cggttccggc	gggaagtggg	gaagacagcc	tgtccttcag	1020
gcaagaaggc	ccgcgagata	gacgagagcc	tcattcttcta	caagaagtgg	gagctggaag	1080
cctgcgtgga	tgcggcccctg	ctggccaccc	agatggaccg	cgtgaacgcc	atccccctca	1140
cctacgagca	gctggacgtc	ctaaagcata	aactggatga	gctctaccca	caaggttacc	1200
ccgagtctgt	gatccagcac	ctgggctacc	tcttcctcaa	gatgagccct	gaggacattc	1260
gcaagtggaa	tgtgacgtcc	ctggagaccc	tgaaggcttt	gcttgaagtc	aacaaagggc	1320
acgaaatgag	tcctcagggtg	gccaccctga	tcgaccgctt	tgtgaaggga	aggggccagc	1380
tagacaaaga	caccctagac	accctgaccg	ccttctaccc	tgggtacctg	tgctccctca	1440
gccccgagga	gctgagctcc	gtgcccccca	gcagcatctg	ggcggtcagg	ccccaggacc	1500
tggacacgtg	tgacccaagg	cagctggacg	tcctctatcc	caaggcccgc	cttgctttcc	1560
agaacatgaa	cgggtccgaa	tacttcgtga	agatccagtc	cttcctgggt	ggggccccc	1620
cggaggattt	gaaggcgctc	agtcagcaga	atgtgagcat	ggacttgccc	acgttccatga	1680
agctgcggac	ggatgcgggtg	ctgccgttga	ctgtggctga	ggtgcagaaa	cttctgggac	1740
cccacgtgga	gggcctgaag	gcggaggagc	ggcaccgccc	ggtgcgggac	tggatcctac	1800
ggcagcggca	ggacgacctg	gacacgctgg	ggctggggct	acagggcggc	atcccccaacg	1860
gctacctggt	cctagacctc	agcatgcaag	aggccctctc	ggggacgccc	tgctccttag	1920
gacctggacc	tgttctcacc	gtcctggcac	tgctcctagc	ctccaccctg	gcctgagggc	1980
cccactccct	tgtgggcccc	agccctgctg	gggatccccg	cctggccagg	agcaggcacg	2040
ggtggtcccc	gttccacccc	aagagaactc	gcgctcagta	aacgggaaca	tgccccctgc	2100
agacacgtaa	aaaaaaaaaa	aaaaaa				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		

ES 2 858 248 T3

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	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	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

ES 2 858 248 T3

```

      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

```

tgccaggctc tccacccccca cttcccaatt gaggaaacccg aggcagagga ggctcagcgc      60
cacgcactcc tctttctgcc tggccggcca ctcccgctctg ctgtgacgcg cggacagaga      120
gctaccggtg gacccacggt gcctccctcc ctgggatcta cacagaccat ggccttgcca      180
acggctcgac ccctgttggg gtcctgtggg acccccgcgc tcggcagcct cctgttcctg      240
ctcttcagcc tcgatgggt gcagccctcg aggaccctgg ctggagagac agggcaggag      300
gctgcgcccc tggacggagt cctggccaac ccacctaaaca tttccagcct ctcccctcgc      360
caactccttg gcttcccgtg tgcggagggtg tccggcctga gcacggagcg tgtccgggag      420
ctggctgtgg ccttggcaca gaagaatgtc aagctctcaa cagagcagct gcgctgtctg      480
gctcaccggc tctctgagcc ccccgaggac ctggacgccc tccattgga cctgctgcta      540
ttcctcaacc cagatgcgtt ctcggggccc caggcctgca cccgtttctt ctcccgcatc      600
acgaaggcca atgtggacct gctcccaggg ggggctcccg agcgacagcg gctgctgcct      660
gcggtctctg cctgctgggg tgtgcggggg tctctgctga gcgaggctga tgtgcgggct      720
ctgggaggcc tggcttgcca cctgcctggg cgctttgtgg ccgagtcggc cgaagtgtct      780
ctaccccggc tggtagctg cccgggacct ctggaccagg accagcagga ggcagccagg      840
gcggtctctg agggcggggg acccccctac ggccccccgt cgacatggtc tgtctccacg      900
atggacgctc tgcggggcct gctgcccgtg ctgggccagc ccatcatccg cagcatcccg      960
cagggcatcg tggccgctg gcggcaacgc tctctctggg acccatcctg gcggcagcct      1020
gaacggacca tcctccggcc gcggttccgg cgggaagtgg agaagacagc ctgtccttca      1080
ggcaagaagg cccgcgagat agacgagagc ctcatcttct acaagaagtg ggagctggaa      1140
gcctgctgtg atgcggccct gctggccacc cagatggacc gcgtgaacgc catccccctc      1200
acctacgagc agctggacgt cctaaagcat aaactggatg agctctacct acaaggttac      1260
cccgagtctg tgatccagca cctgggctac ctcttctca agatgagccc tgaggacatt      1320
cgcaagtgga atgtgacgtc cctggagacc ctgaaggctt tgcttgaagt caacaaaggg      1380
cacgaaatga gtctcaggt ggccaccctg atcgaccgct ttgtgaaggg aagggggccag      1440
ctagacaaag acaccctaga caccctgacc gccttctacc ctgggtacct gtgtccctc      1500
agccccgagg agctgagctc cgtgcccccc agcagcatct gggcggtcag gccccaggac      1560
ctggacacgt gtgaccceaag gcagctggac gtctctatc ccaaggcccc ccttgctttc      1620
cagaacatga acgggtccga atacttcgtg aagatccagt ccttcctggg tggggccccc      1680
acggaggatt tgaaggcgct cagtcagcag aatgtgagca tggacttggc cacgttcatg      1740
aagctgcgga cggatgcggt gctgccgttg actgtggctg aggtgcagaa acttctggga      1800
ccccacgtgg agggcctgaa ggcggaggag cggcaccgcc cgggtgcgga ctggatccta      1860
cggcagcggc aggacgacct ggacacgctg gggctggggc tacagggcgg catccccaac      1920
ggctacctgg tcctagacct cagcatgcaa gaggcctctc cggggacgcc ctgcctccta      1980
ggacctggac ctgttctcac cgtcctggca ctgctcctag cctccaccct ggcctgaggg      2040
ccccactccc ttgctggccc cagccctgct ggggatcccc gcctggccag gagcaggcac      2100
gggtggtccc cgttccaccc caagagaact cgcgctcagt aaacgggaac atgccccctg      2160
cagacacgta aaaaaaaaaa aaaaaaaa      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	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	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	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala			
	610					615				620					

<210> 27
 <211> 2154
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

cgccacgcac	tcctctttct	gcctggccgg	ccactcccgt	ctgctgtgac	gcgcggacag	60
agagctaccg	gtggacccac	ggtgcctccc	tccctgggat	ctacacagac	catggccttg	120
ccaacggctc	gacccctggt	ggggtcctgt	gggacccccg	ccctcggcag	cctcctgttc	180
ctgctcttca	gcctcggatg	ggtgcagccc	tcgaggaccc	tggtcggaga	gacagggcag	240
gaggctgcgc	ccctggacgg	agtcctggcc	aaccaccta	acatttccag	cctctcccct	300
cgccaaactcc	ttggcttccc	gtgtgcggag	gtgtccggcc	tgagcacgga	gcgtgtccgg	360
gagctggctg	tggccttggc	acagaagaat	gtcaagctct	caacagagca	gctgcgctgt	420
ctggctcacc	ggctctctga	gccccccgag	gacctggacg	ccctccatt	ggacctgctg	480
ctattcctca	accagatgc	gttctcgggg	cccaggcct	gcaccggtt	cttctcccgc	540
atcacgaagg	ccaatgtgga	cctgctcccg	aggggggctc	ccgagcgaca	gcggctgctg	600
cctgcggctc	tggcctgctg	gggtgtgcgg	gggtctctgc	tgagcggagg	tgatgtgcgg	660
gctctgggag	gcctggcttg	cgacctgcct	gggcgctttg	tggccgagtc	ggccgaagtg	720
ctgtaccccc	ggctgggtgag	ctgcccggga	cccctggacc	aggaccagca	ggaggcagcc	780
aggcgggctc	tgcagggcgg	gggaccccc	tacggccccc	cgtagacatg	gtctgtctcc	840
acgatggacg	ctctgcgggg	cctgctgccc	gtgctggggc	agcccatcat	ccgcagcatc	900
ccgcagggca	tcgtggccgc	gtggcggcaa	cgctcctctc	gggacccatc	ctggcggcag	960
cctgaacgga	ccatcctccg	gccgcggttc	cggcgggaag	tggagaagac	agcctgtcct	1020
tcaggcaaga	aggcccgcca	gatagacgag	agcctcatct	tctacaagaa	gtgggagctg	1080
gaagcctgcg	tggatgcggc	cctgctggcc	accagatgg	accgcgtgaa	cgccatcccc	1140
ttcacctacg	agcagctgga	cgtcctaagg	cataaactgg	atgagctcta	cccacaaggt	1200
taccccgagt	ctgtgatcca	gcacctgggc	tacctcttcc	tcaagatgag	ccctgaggac	1260
attcgcaagt	ggaatgtgac	gtccctggag	accctgaagg	ctttgcttga	agtcaacaaa	1320
gggcacgaaa	tgagtccctca	ggctcctcgg	cggcccctcc	cacaggtggc	cacctgatc	1380
gaccgctttg	tgaagggaag	gggccagcta	gacaaagaca	ccctagacac	cctgaccgcc	1440
ttctaccctg	ggtacctgtg	ctccctcagc	cccaggagac	tgagctccgt	gccccccagc	1500
agcatctggg	cggtcaggcc	ccaggacctg	gacacgtgtg	acccaaggca	gctggacgtc	1560
ctctatccca	aggcccgcct	tgctttccag	aacatgaacg	ggtccgaata	cttcgtgaag	1620
atccagtcct	tcctgggtgg	ggcccccaag	gaggatttga	aggcgctcag	tcagcagaat	1680
gtgagcatgg	acttggccac	gttcatgaag	ctgcggacgg	atgcggtgct	gccgttgact	1740
gtggctgagg	tgcagaaact	tctgggaccc	cacgtggagg	gcctgaaggc	ggaggagcgg	1800
caccgcccgg	tgcgggactg	gatcctacgg	cagcggcagg	acgacctgga	cacgtggggg	1860
ctggggctac	agggcggcat	ccccaacggc	tacctggtcc	tagacctcag	catgcaagag	1920
gccctctcgg	ggacgccctg	cctcctagga	cctggacctg	ttctcaccgt	cctggcactg	1980
ctcctagcct	ccaccctggc	ctgaggggcc	cactcccttg	ctggccccag	ccctgctggg	2040
gatccccgcc	tggccaggag	caggcacggg	tggtccccgt	tccaccccaa	gagaactcgc	2100
gctcagtaaa	cggggaacatg	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 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 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	tttcccaggc	ccaaaagccc	cttcggttgc	tccaaacagt	ggtgtggggt	60
gaggggtggg	acaagtgggg	acctcagagt	cattgtttatc	cacagaccat	ggccttgcca	120
acagctcgac	ccctgctggg	gtcctgtgga	agtcccatct	gcagccgaag	cttcctactg	180
cttctcctta	gtcttggttg	gataccacgt	ctgcagaccc	agactacaaa	gacaagccag	240
gaggccacac	tcctccatgc	tgtgaacggg	gccgctgact	ttgccagtct	ccccacaggc	300
ctctttcttg	gcctcacatg	tgaggaggta	tctgacctga	gcatggaaca	agccaagggg	360
ctggctatgg	ctgtaagaca	gaagaacatt	acactccggg	gacatcagct	gcgttgtctg	420
gcacgtcgcc	ttcctaggca	cctcaccgac	gaggaactga	atgctcttcc	actggacctg	480
ctgctcttcc	tcaaccagc	catgtttcca	gggcaacagg	cttgtgcca	cttcttctcc	540
ctcatctcta	aagccaatgt	ggatgtactc	ccacggaggt	ctctggagcg	ccagaggctg	600
ctgatggagg	ctctgaagtg	ccagggcgtg	tatggatttc	aagtgagtga	ggcagatgtg	660
cgggctctcg	gaggcctggc	ctgtgacctg	cctgggaaat	ttgtggccag	atcttccgaa	720
gttctcctcc	cctggctggc	aggatgccaa	ggacccctgg	accagagcca	ggaaaaggca	780
gtcagggagg	ttctgaggag	tggaaagaacc	caatatggcc	ccccatcgaa	gtggtcagtc	840
tccaccctgg	atgccctgca	gagcttggtg	gcagtgttgg	atgagtccat	cgtccagagc	900
atccccaaag	atgtcaaagc	tgaatggctg	caacacatct	ccagagaccc	ctccaggctg	960
gggtctaagc	tgaccgtcat	acacccaagg	ttccagcggg	atgcagaaca	gaaagcctgc	1020
cctccaggga	aggagcccta	caagggtggg	gaagacctca	tcttctacca	gaattgggag	1080
ctggagggtt	gtgtagatgg	caccatgctg	gccagacaaa	tggaacctgt	gaacgagatt	1140
cccttcacct	atgagcagct	cagtatcttt	aagcacaaac	tggaacaagc	ctacccacaa	1200
ggctatcctg	agtccctgat	ccagcagctg	ggtcacttct	tcagatatgt	tagccctgaa	1260
gacatccacc	agtggaatgt	gacctcacca	gacacagtga	aaactctgct	caaagtccagc	1320
aaaggacaaa	agatgaatgc	tcaggcgatt	gccttggtcg	cctgctatct	tcggggagga	1380
ggccagctgg	acgaggatat	ggtaaaagcc	ctgggcgaca	tcccgttaag	ctatctatgt	1440
gacttcagcc	cccaggatct	gcactcggta	ccctccagtg	tcagtgtggc	ggttggggcc	1500
caagacctgg	acaagtgcag	ccagaggcat	ctgggtctcc	tctaccagaa	ggcctgctca	1560
gccttccaga	atgtgagcgg	cctagaatac	tttgagaaaa	tcaagacatt	cctgggtggg	1620
gcctccgtga	aggacctgcg	ggccctcagc	cagcacaatg	tgagcatgga	catagccact	1680
ttcaagaggc	tgcagggtga	ttccctgggt	gggctgagtg	tggctgaggt	acagaaactt	1740
ctggggccaa	acattgtgga	cctgaagacc	gaggaggata	aaagccctgt	ccgtgactgg	1800
ctgttccggc	agacctagaa	aggctgggtt	tgggacttca	gggtggcatc		1860
cccaatggct	acctggtcct	ggacttcaat	gtccgagagg	ccttctccag	cagagccctca	1920
ctccttgggc	caggatttgt	attaatatgg	attccagctc	tgctcccagc	tttaaggctg	1980
agctgagacc	accaccctgc	aaggctcctg	gtcccagctc	tactggggcc	ctcttgacca	2040
ggagtgggta	ccaggggtca	ttgccaaagt	ttgaggactc	ttgaactcaa	taaacagtgg	2100
catatgctcc	cttgaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaa			2135

<210> 30
 <211> 625
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<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	Leu	Ser	Leu	Gly	Trp	Ile
			20					25					30		
Pro	Arg	Leu	Gln	Thr	Gln	Thr	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	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					240
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					320
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					400
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	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> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de mesotelina sintético
 <400> 31

Gly Gln Lys Met Asn Ala Gln Ala Ile
 1 5

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Clon de péptido beta 3D de *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> Secuencia artificial

<220>
 <223> Clon de nucleótidos de beta 3D de *Mus musculus*

<400> 33
 tgtgccagca gccctggact ggggggatcc tatgaacagt acttc 45

<210> 34
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> clon peptídico del clon n.º 1 de V beta 10 de *Mus musculus*

5 <400> 34

Cys	Ala	Ser	Ser	Gln	Gly	Leu	Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Phe
1				5					10					15

10 <210> 35
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> clon de nucleótidos del clon n.º 1 de V beta 10 de *Mus musculus*

<400> 35

20 tgtgccagca gccagggact ggggagctcc tatgaacagt acttc 45

<210> 36
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> péptido del clon n.º 2 de V beta 10 de *Mus musculus*

<400> 36

30

Cys	Ala	Ser	Ser	Tyr	Ile	Leu	Gly	Ala	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Phe
1				5					10				

<210> 37
<211> 42
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> nucleótido del clon n.º 2 de V beta 10 de *Mus musculus*

40 <400> 37

tgtgccagca gctatatact gggggcctat gaacagtact tc 42

<210> 38
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> péptido del clon n.º 3 de V beta 10 de *Mus musculus*

50 <400> 38

Cys	Ala	Ser	Ser	Ser	Trp	Thr	Val	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Phe
1				5					10			

55 <210> 39
<211> 39
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> nucleótido del clon n.º 3 de V beta 10 de *Mus musculus*

<400> 39
 5 tgtgccagca gctcctggac agtctatgaa cagtacttc 39

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido del clon n.º 4 de V beta 10 de *Mus musculus*

15 <400> 40
 Cys Ala Ser Ser Trp Thr Gly Ala Asn Thr Gly Gln Leu Tyr Phe
 1 5 10 15

20 <210> 41
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> nucleótido del clon n.º 4 de V beta 10 de *Mus musculus*

<400> 41
 tgtgccagca gctggacagg ggcaaacacc ggcagctct acttt 45

30 <210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> péptido de mesotelina sintético

<400> 42
 Ile Ser Lys Ala Asn Val Asp Val Leu
 1 5

40 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> péptido de mesotelina sintético

50 <400> 43
 Gly Gln Lys Met Asn Ala Gln Ala Ile
 1 5

55 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> péptido de mesotelina sintético

<400> 44

ES 2 858 248 T3

		Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu
		1 5
5	<210> 45 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> péptido de mesotelina sintético <400> 45	
		Leu Leu Gly Pro Asn Ile Val Asp Leu
		1 5
15	<210> 46 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> péptido de mesotelina sintético <400> 46	
25		Glu Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu
		1 5
30	<210> 47 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido de mesotelina sintético	
35	<400> 47	
		Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu
		1 5
40	<210> 48 <211> 1595 <212> DNA <213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 48	

```

agaatcaaaa gaggaaccca acccctaaga tgagctttcc atgtaaatth gtagccagct      60
tccttctgat tttcaatgth tcttccaaaag gtgcagctctc caaagagatt acgaatgcct      120
tggaacctg ggggtgccttg ggtcaggaca tcaacttgga cattcctagt tttcaaatga      180
gtgatgatat tgacgatata aaatgggaaa aaacttcaga caagaaaaag attgcacaat      240
tcagaaaaaga gaaagagact ttcaaggaaa aagatacata taagctatth aaaaatggaa      300
ctctgaaaaat taagcatctg aagaccgatg atcaggatat ctacaaggta tcaatatatg      360
atacaaaaagg aaaaaatgtg ttggaaaaaa tatttgattt gaagattcaa gagagggtct      420
caaaacccaaa gatctccttg acttgatatca acacaaccct gacctgtgag gtaatgaatg      480
gaactgaccc cgaattaaac ctgtatcaag atgggaaaca tctaaaactt tctcagaggg      540
tcatcacaca caagtggacc accagcctga gtgcaaaatt caagtgcaca gcagggaaca      600
aagtcagcaa ggaatccagt gtcgagcctg tcagctgtcc agagaaaggt ctggacatct      660
atctcatcat tggcatatgt ggaggaggca gcctcttgat ggtctttgtg gcaactgctc      720
ttttctatat caccaaaagg aaaaaacaga ggagtcggag aaatgatgag gagctggaga      780
caagagccca cagagtagct actgaagaaa ggggcccggaa gcccaccaa attccagctt      840
caaccctca gaatccagca acttcccaac atcctcctcc accacctggt catcgttccc      900
aggcacctag tcatcgtccc ccgcctcctg gacaccgtgt tcagcaccag cctcagaaga      960
ggctcctgct tccgtcgggc acacaagttc accagcagaa agggccgccc ctcccagac      1020
ctcgagttca gccaaaacct ccccatgggg cagcagaaaa ctcatgtcc cttcctcta      1080
attaaaaaag atagaaactg tctttttcaa taaaaagcac tgtggatttc tgccctcctg      1140
atgtgcatat ccgtacttcc atgaggtgth ttctgtgtgc agaacttgt cacctcctga      1200
ggctgtgggc cacagccacc tctgcatctt cgaactcagc catgtggtca acatctggag      1260
tttttggtct cctcagagag ctccatcaca ccagtaagga gaagcaatat aagtgtgatt      1320
gcaagaatgg tagaggaccg agcacagaaa tcttagagat ttcttgctcc ctctcaggtc      1380
atgtgtagat gcgataaatc aagtgattgg tgtgcctggg tctcactaca agcagcctat      1440
ctgcttaaga gactctggag tttcttatgt gccctggtgg acacttgccc accatcctgt      1500
gagtaaaagt gaaataaaag ctttgactag aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      1560
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

```

<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

```

ES 2 858 248 T3

				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	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	Pro	Gly	His
		275					280					285			
Arg	Ser	Gln	Ala	Pro	Ser	His	Arg	Pro	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

atggcgcgtca	tggctccccg	aacctctgtc	ctgtactct	cgggggctct	ggcctgacc	60
cagacctggg	ggggtctca	ctccatgagg	tatttcttca	catccgtgtc	ccggcccggc	120
cgcggggagc	cccgttcat	cgcagtgggc	tacgtggacg	acacgcagtt	cgtgcggttc	180
gacagcgacg	ccgcgagcca	gaggatggag	ccgcgggcgc	cgtggataga	gcaggagggt	240
ccggagtatt	gggacgggga	gacacggaaa	gtgaaggccc	actcacagac	tacccgagt	300
gacctggggg	ccctgcgcgt	ctactacaac	cagagcgagg	cgggtcttca	caccctccag	360
atgatgtttg	gctgcgacgt	ggggctcggac	tggcgtcttc	tccgcgggta	ccaccagtac	420
gcctacgacg	gcaaggatta	catcgccctg	aaagaggacc	tgcgctcttg	gaccgcggcg	480
gacatggcag	ctcagaccac	caagcacaa	tgggaggcgg	cccatgtggc	ggagcagttg	540
agagcctacc	tggagggcac	gtgcgtggag	tggctccgca	gatacctgga	gaacgggaag	600
gagacgtctg	agcgcacgga	cgccccaaa	acgcataatga	ctcaccacgc	tgtctctgac	660
catgaagcca	ccctgaggtg	ctgggcccctg	agcttctacc	ctgcggagat	cacactgacc	720
tggcagcggg	atggggagga	ccagaccacg	gacacggagc	togtggagac	caggcctgca	780
ggggatggaa	ccttcagaa	gtgggcggct	gtggtggtgc	cttctggaca	ggagcagaga	840
tacacctgcc	atgtgcagca	tgagggtttg	cccaagcccc	tcaccctgag	atgggagccg	900
tcttcccagc	ccaccatccc	catcgtgggc	atcatgtctg	gcctggttct	ctttggagct	960
gtgatcactg	gagctgtggt	cgtcgtctgtg	atgtggagga	ggaagagctc	agatagaaaa	1020
ggaggagact	actctcagcg	tgcaagcagt	gacagtgcc	agggctctga	tgtgtctctc	1080
caggcttqta	aaqtqta					1098

<210> 51
<211> 365
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 51

Met	Ala	Val	Met	Ala	Pro	Arg	Thr	Leu	Val	Leu	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			
		355					360					365			

<210> 52
 <211> 987
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

<400> 52

```

aatataagtg gaggcgtcgc gctggcgggc attcctgaag ctgacagcat tcgggccgag      60
atgtctcgct ccgtggcctt agctgtgctc gcgctactct ctctttctgg cctggaggct      120
atccagcgta ctccaaagat tcagggtttac tcacgtcatc cagcagagaa tggaaagtca      180
aatttcctga attgctatgt gtctgggttt catccatccg acattgaagt tgacttactg      240
aagaatggag agagaattga aaaagtggag cattcagact tgtctttcag caaggactgg      300
tctttctatc tcttgtacta cactgaattc acccccactg aaaaagatga gtatgcctgc      360
cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta agtgggatcg agacatgtaa      420
gcagcatcat ggagggtttga agatgccgca tttggattgg atgaattcca aattctgctt      480
gcttgctttt taatattgat atgcttatac acttacactt tatgcacaaa atgtagggtt      540
ataataatgt taacatggac atgatcttct ttataattct actttgagtg ctgtctccat      600
gtttgatgta tctgagcagg ttgctccaca ggtagctcta ggagggtgg caacttagag      660
gtggggagca gagaattctc ttatccaaca tcaacatctt ggtcagattt gaactcttca      720
atctcttgca ctcaaagctt gttaagatag ttaagcgtgc ataagttaac ttccaattta      780
catactctgc ttagaatttg ggggaaaatt tagaaatata attgacagga ttattggaaa      840
tttgttataa tgaatgaaac attttgtcat ataagattca tatttacttc ttatacattt      900
gataaagtaa ggcattggtt tggttaatct ggtttatttt tgttccacaa gttaaataaa      960
tcataaaact tgatgtgtta 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 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 Thr 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

```

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar un receptor de linfocitos T (TCR) con afinidad potenciada, que comprende:

- 5 a. poner en contacto una o más células progenitoras hematopoyéticas con una o más células estromales y un antígeno peptídico, en condiciones y durante un tiempo suficientes para inducir la diferenciación de al menos unas células progenitoras hematopoyéticas en timocitos doble negativos (DN) TCR $\alpha\beta$ +, en donde la una o más células progenitoras hematopoyéticas comprenden un polinucleótido no endógeno que codifica una cadena TCR α de un TCR precursor específica para el antígeno peptídico, y
- 10 en donde la una o más células estromales comprenden un polinucleótido no endógeno que codifica Delta-like-1 o Delta-like-4 y un polinucleótido que codifica una molécula MHC;
- b. introducir polinucleótidos que codifican cadenas TCR β de los timocitos DN TCR $\alpha\beta$ + generados en la etapa (a) en células que son capaces de expresar un TCR en la superficie celular y que comprenden el polinucleótido no endógeno que codifica la cadena TCR α de la etapa (a);
- 15 c. identificar TCR con afinidad potenciada expresado por al menos una o más células generadas en la etapa (b), en donde el TCR con afinidad potenciada es opcionalmente un TCR humano.

2. El método de la reivindicación 1, en donde identificar TCR con afinidad potenciada comprende comparar la afinidad de unión de un TCR $\alpha\beta$ candidato con el TCR $\alpha\beta$ precursor.

20 3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde las células progenitoras hematopoyéticas comprenden células progenitoras de timocitos, o las células progenitoras hematopoyéticas derivan de células madre hematopoyéticas.

25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se usa un vector vírico para introducir en las células progenitoras hematopoyéticas el polinucleótido no endógeno que codifica la cadena TCR α específica para el antígeno peptídico.

30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células estromales expresan Delta-like-1 o derivan de OP9 o comprenden un polinucleótido que codifica el antígeno peptídico.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende además seleccionar las células que son capaces de expresar un TCR en la superficie de las células resultantes de la etapa (b) con tinción de tetrámeros de MHC-péptido, en donde dichas células se seleccionan opcionalmente con tinción de tetrámeros de MHC-péptido varias veces.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se usa un vector vírico para introducir los polinucleótidos que codifican las cadenas TCR β de la etapa (b) en las células que son capaces de expresar TCR en la superficie celular.

40 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en donde el vector vírico es un vector retroviral o un vector lentiviral, comprendiendo opcionalmente el vector vírico un marcador génico para la transducción, comprendiendo opcionalmente el marcador génico para la transducción una proteína verde fluorescente o un dominio extracelular de CD2 humano.

45 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el antígeno peptídico se selecciona de un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno canceroso o un antígeno autoinmunitario.

50 10. El método de la reivindicación 9, en donde el antígeno peptídico es un antígeno peptídico de WT1 o un antígeno peptídico de mesotelina, comprendiendo opcionalmente el antígeno peptídico de WT1 una secuencia de aminoácidos RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 2) y comprendiendo opcionalmente, el antígeno peptídico de mesotelina una secuencia de aminoácidos GQKMNAQAI (SEQ ID NO: 31).

55 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el antígeno peptídico se añade a las células progenitoras hematopoyéticas y a las células estromales en cultivo.

60 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente, antes de la introducción de la etapa (b), aislar uno o más polinucleótidos que codifican una o más cadenas TCR β a partir de timocitos DN TCR $\beta\alpha$ +, en donde el aislamiento comprende seleccionar una o más cadenas TCR β que comprenden el mismo gen V β que la cadena β del TCR precursor y en donde la introducción comprende introducir uno o más polinucleótidos que codifican las cadenas TCR β seleccionadas en las células.

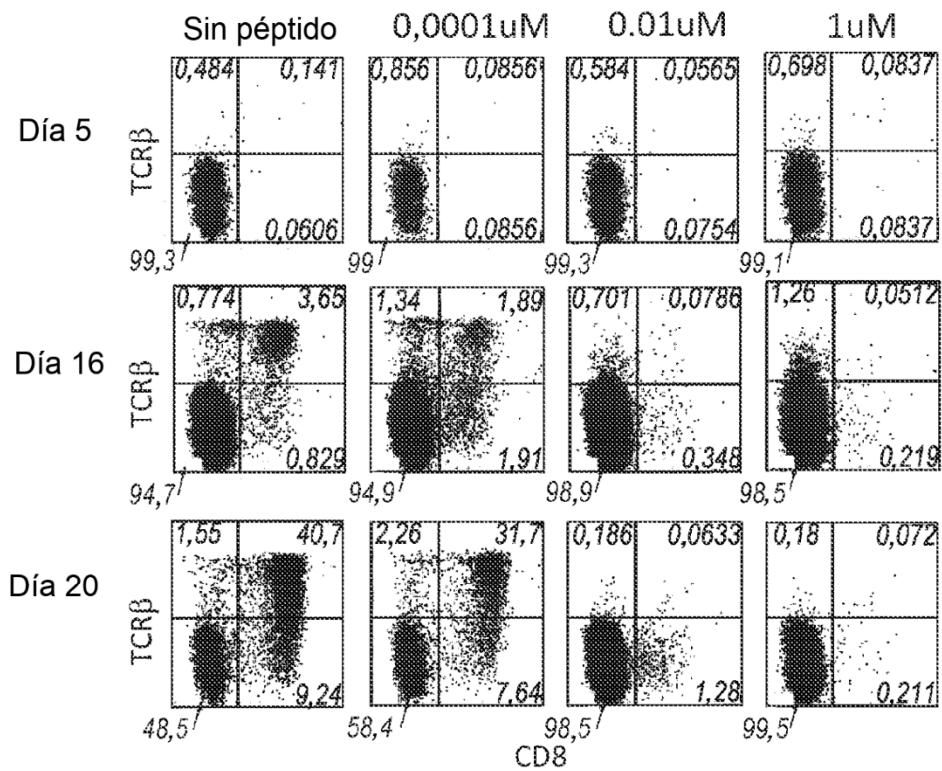


Fig. 1A

Seleccionados
con DN

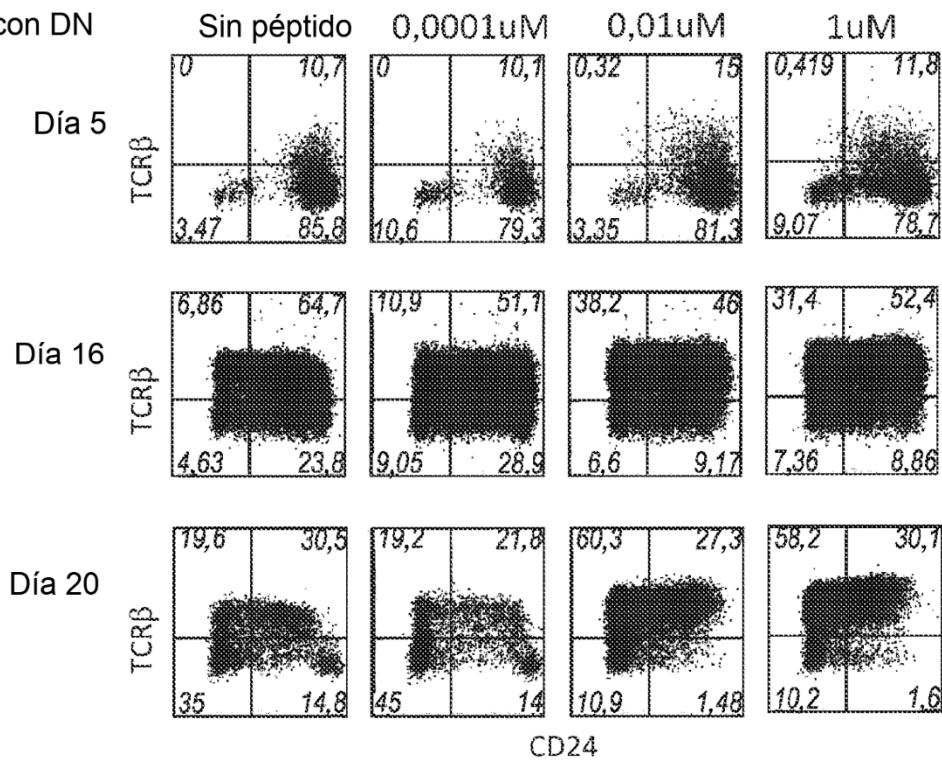


Fig. 1B

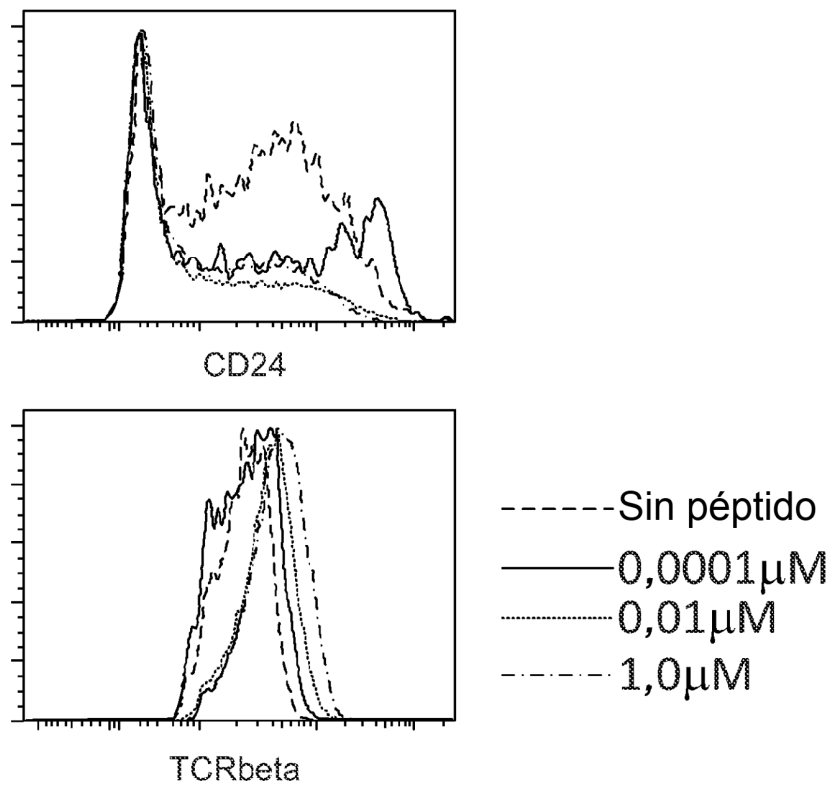


Fig. 1C

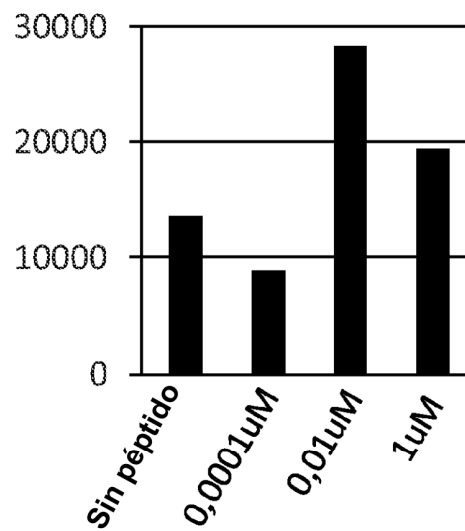
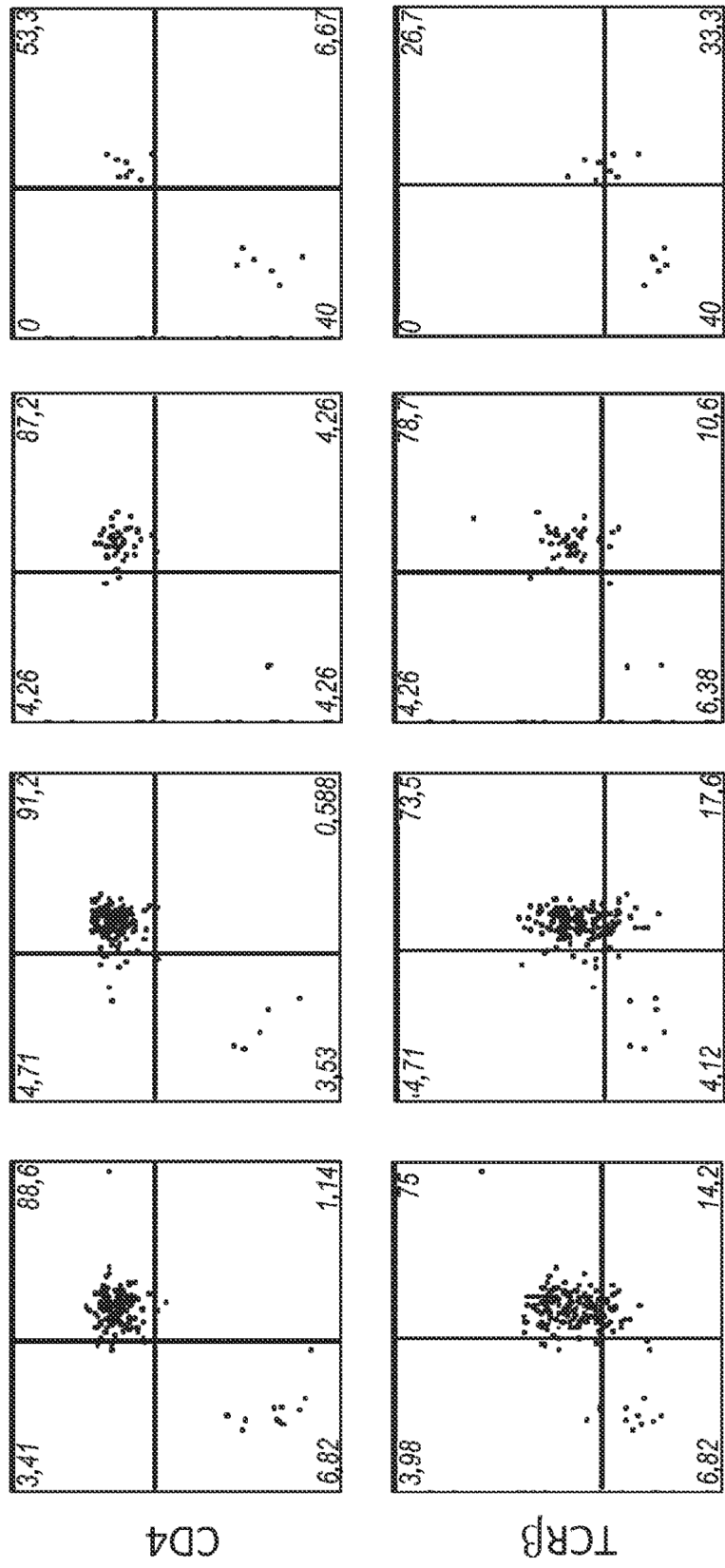


Fig. 1D



CD8

Fig. 2

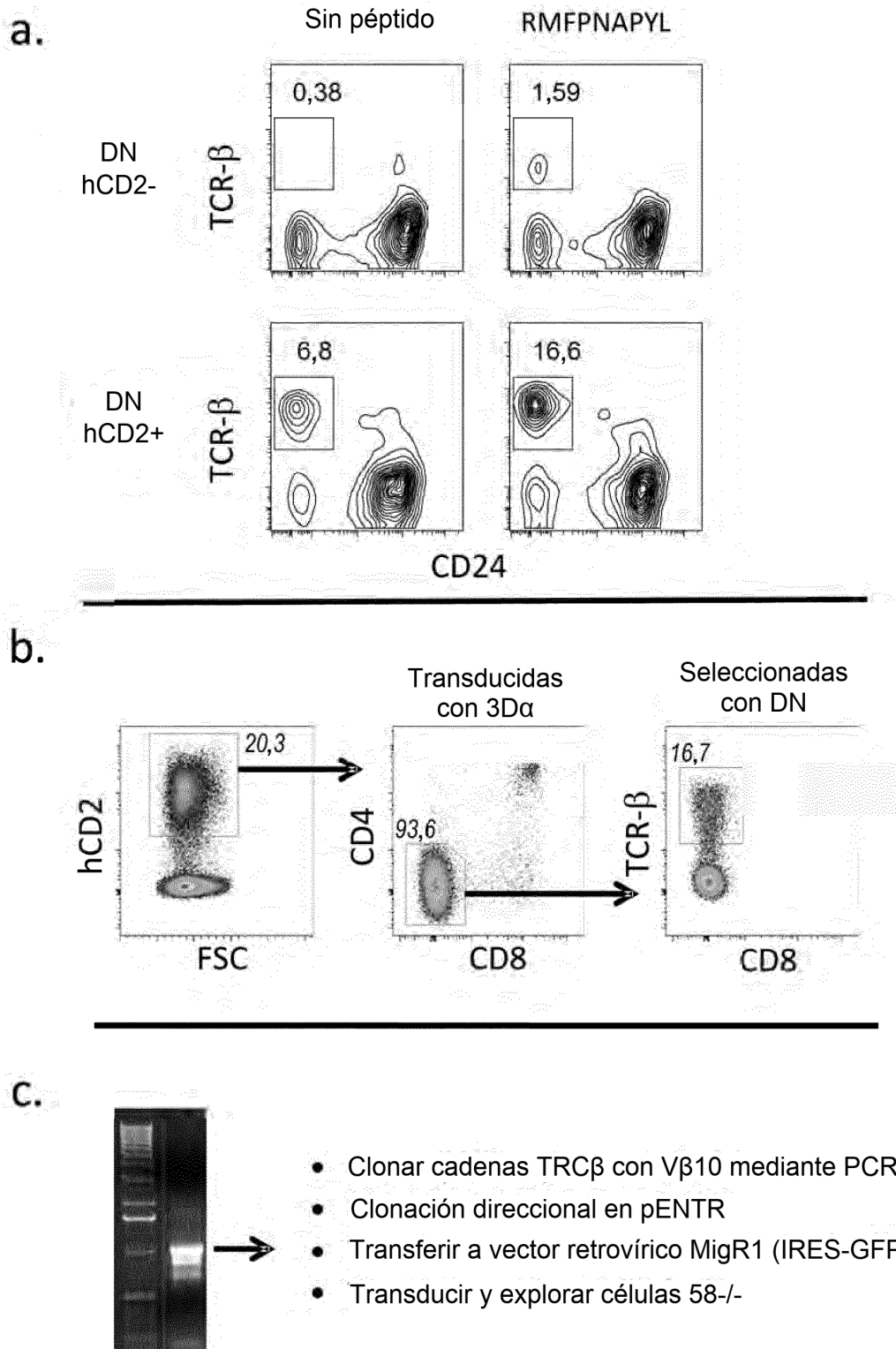


Fig. 3

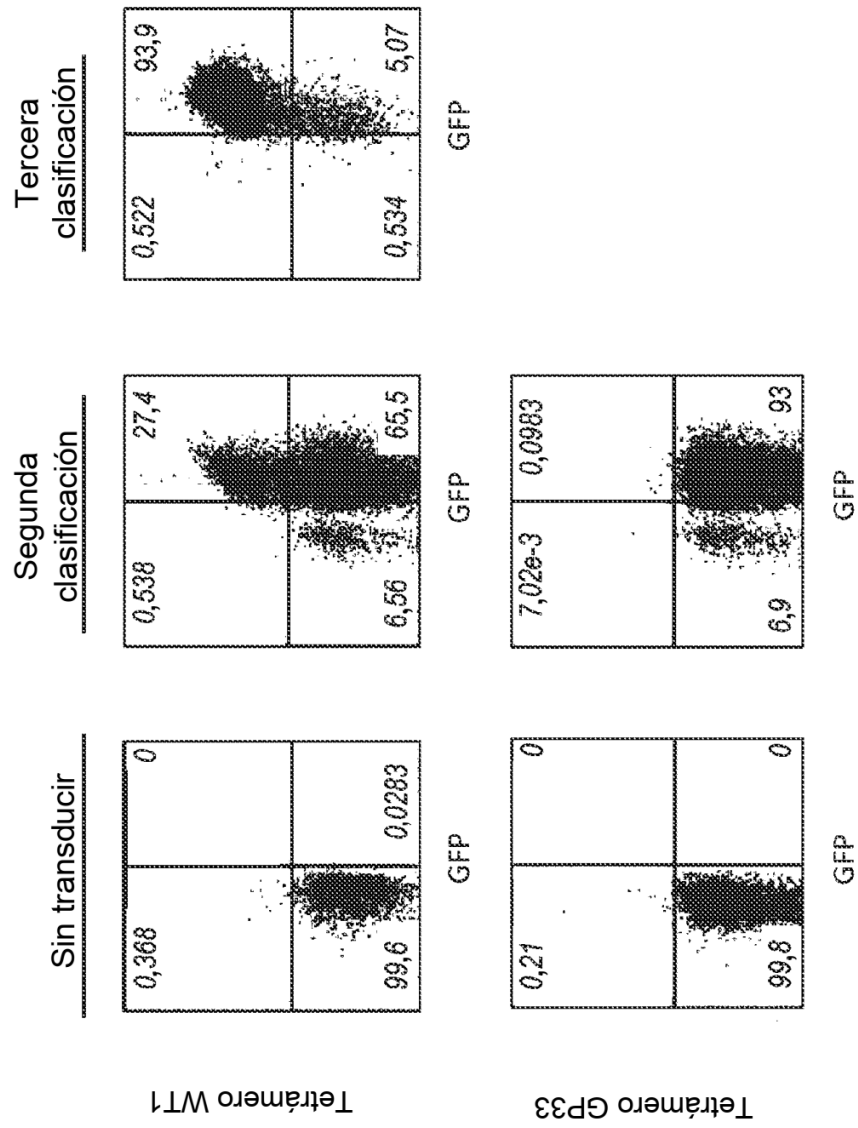


Fig. 4A

	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	
3Dβ	C	A	S	S	P	G	L	G	G	S	Y	E	Q	Y	F	SEQ ID. NO: 32
	tgt	gcc	agc	agc	cct	gga	ctg	ggg	gga	tcc	tat	gaa	cag	tac	ttc	SEQ ID. NO: 33
clon n.º 1 de Vβ10	C	A	S	S	Q	G	L	G	S	S	Y	E	Q	Y	F	SEQ ID. NO: 34
	tgt	gcc	agc	agc	cag	gga	ctg	ggg	agc	tcc	tat	gaa	cag	tac	ttc	SEQ ID. NO: 35
clon n.º 2 de Vβ10	C	A	S	S	Y	I	L	G	A	Y	E	Q	Y	Y	F	SEQ ID. NO: 36
	tgt	gcc	agc	agc	tat	ata	ctg	...	ggg	gcc	tat	gaa	cag	tac	ttc	SEQ ID. NO: 37
clon n.º 3 de Vβ10	C	A	S	S	S	W	T		V	Y	E	Q	Y	Y	F	SEQ ID. NO: 38
	tgt	gcc	agc	agc	tcc	tgg	aca	...	gfc	tat	gaa	cag	cag	tac	ttc	SEQ ID. NO: 39
clon n.º 4 de Vβ10	C	A	S	S	W	T	G	A	N	T	G	Q	L	Y	F	SEQ ID. NO: 40
	tgt	gcc	agc	agc	tgg	aca	ggg	gca	aac	acc	ggg	cag	ctc	tac	ttt	SEQ ID. NO: 41

Fig. 4B

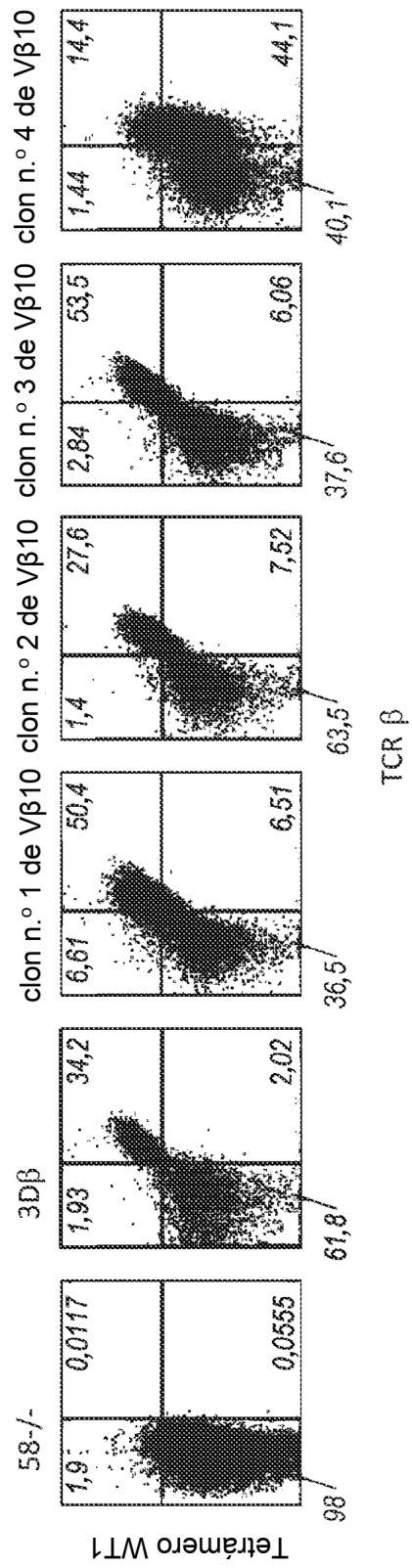


Fig. 4C

Titulación de tetrámeros WT1
(Normalizada a B_{máx})

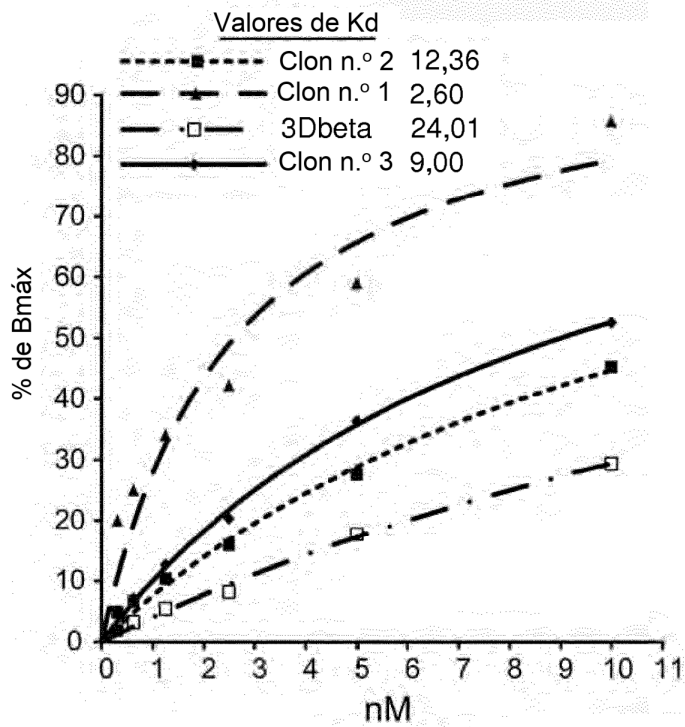


Fig. 5A

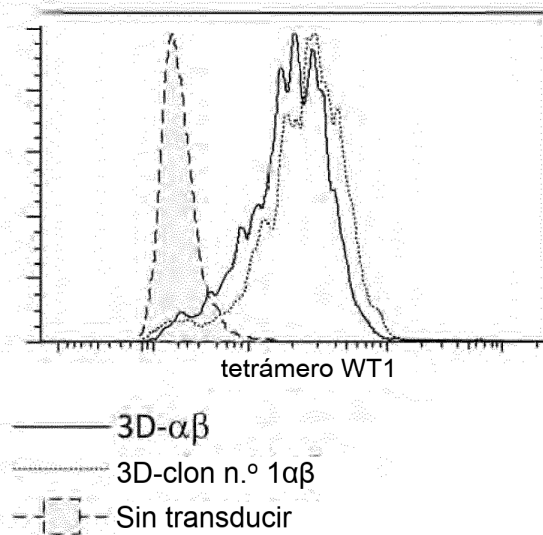


Fig. 5B

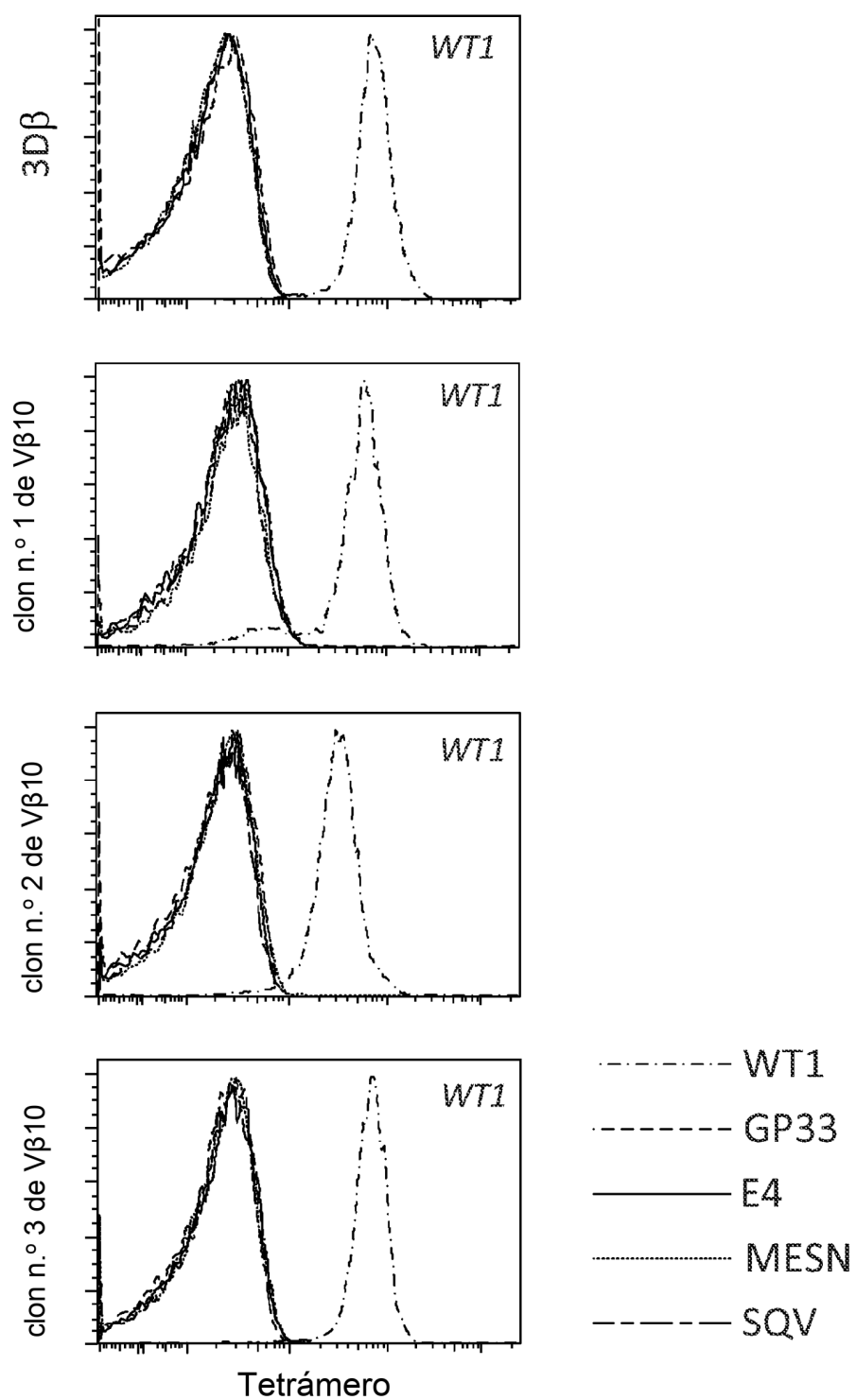


Fig. 5C

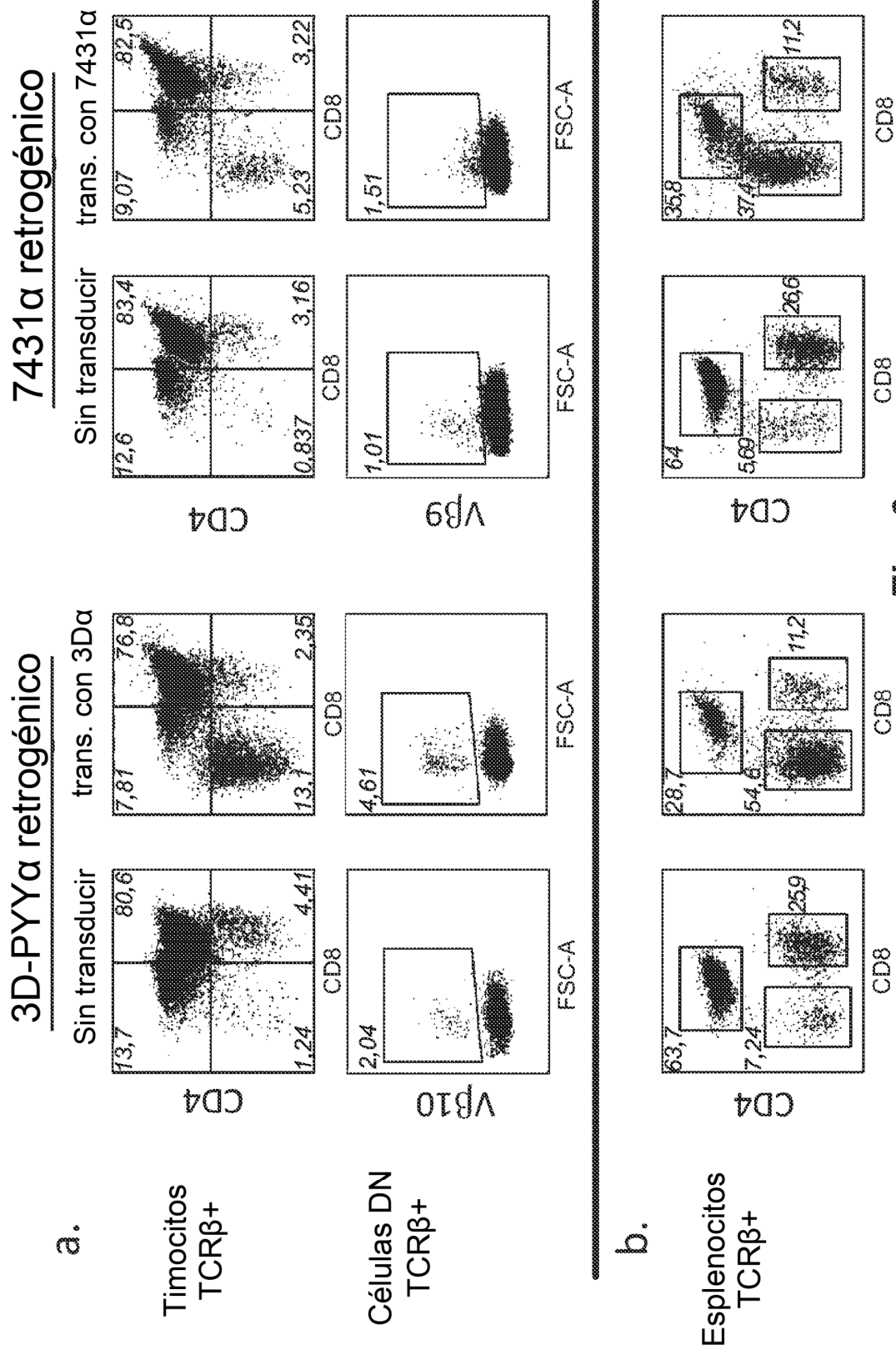


Fig. 6

