

(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 químérico 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.

30 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 (Wucherpfennig *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 affín. 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.

40 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.

45 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.

50 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 sumario

55 60 La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

65 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 5 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 10 con un TCR $\alpha\beta$ precursor).
- 10 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.
- 15 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 20 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

- 25 **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 ovoalbúmina (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.
- 30 **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 ovoalbúmina (SEQ ID NO: 1).
- 35 **FIGURAS 3A-C:** Los timocitos B6 se clasificaron para obtener células progenitoras DN1 y DN2 CD4-CD8-CD117-CD44 $^+$ y se transdijeron 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 retrovírico MigR1-attR usando tecnología Gateway \circledR , y se generó el sobrenadante retrovírico y se usó para transducir células murinas 58 $^-$ para el varias de la biblioteca como se describe.
- 40 **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 retrovírico MigR1-attR. Se generó sobrenadante retrovírico y se usó para transducir células 58 $^-$ CD8+3D α +
- 45 **FIGURAS 5A-C:** **(A)** La afinidad relativa de los tres TCR de mayor afinidad se determinó titiendo 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 3Dq β con afinidad potenciada original. **(C)** Las células 58 $^-$ transducidas con cada una de las cadenas TCR β candidatas emparejadas con 3D α se titieron 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.
- 50 **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.
- 55 **FIGURA 7:** Análisis de esplenocitos de ratones retrogénicos después de 6 días de estimulación con péptido de mesotelina WT1 +IL2 *in vitro*.

Descripción detallada

- 5 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.
- 10 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 aislan 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.
- 15 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 20 infecciosa, enfermedad autoinmunitaria).
- 25 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.
- 30 En la presente descripción, los términos "aproximadamente" y "que consiste/n esencialmente en" significan \pm 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 35 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.
- 40 "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 45 Janeway *et al.*, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3^a 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.
- 50 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 55 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; 5468614, 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 60 65

(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

- 5 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⁺.
 10 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.

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

25 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.

30 25 "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 mieloide. 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.

35 30 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)

40 45 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 .

50 55 "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).

60 65 "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.

65 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 transcripto 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 transcripto 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 transcripto 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 transcripto 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 transcripto y de preproteína humanos, respectivamente); NM_005823.5 (SEQ ID NO: 25), NP_005814.2 (SEQ ID NO: 26) (secuencias de transcripto y de preproteína humanos, respectivamente); NM_013404.4 (SEQ ID NO: 27), NP_037536.2 (SEQ ID NO: 28) (secuencias de transcripto y de preproteína humanos, respectivamente); NM_018857.1 (SEQ ID NO: 29), NP_061345.1 (SEQ ID NO: 30) (secuencias de transcripto 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 loci 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 $\gamma\delta$. 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 5 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 10 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 afín 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.

15 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 20 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 25 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).

30 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, 35 se utilizan células progenitoras de timocitos CD24 $^+$ Lin $^-$ CD117 $^+$.

35 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 40 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).

45 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.

50 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 transcripto 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 transcripto 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 transcripto 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 transcripto 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.

65 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 β 2 microglobulina. Las moléculas MHC de clase I y de β 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 epítopos de mesotelina restringidos por H-2D^B divulgados en Hung *et al.* incluyen: ISKANVDVL (SEQ ID NO:42), GQKMNAQAI (SEQ ID NO:43), SAFQNVSGL (SEQ ID NO:44) y LLGPNIVDL (SEQ ID NO:45). Los posibles epítopos 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/cánceroso 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), SAFQNVSGL (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.
- 5 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.
- 10 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 reticulendocteliosis aviar.
- 15 15 "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).
- 20 20 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.
- 35 35 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 genético 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 bicistrónica o multicistrónica. 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.
- 40 40 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).
- 45 45 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).
- 50 50 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 1-10⁹ o 1x10² hasta 1x10⁶ o 1x10³ a 1x 10⁴. En algunas realizaciones, las células progenitoras hematopoyéticas (aproximadamente de 1-5 x 10⁴ 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 citoblastico (SCF, por sus siglas en inglés, trombopoyetina (TPO) e IL-7. Las 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.
- 10 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 αMEM, 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 αMEM, o medio equivalente. El medio de 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.

20 25 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 TCRαβ+. Las células se 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 40 45 50 Puede detectarse la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas en timocitos DN TCRαβ+ y aislar estas células usando métodos de citometría de flujo convencionales. Se pueden emplear una o más clasificaciones de células para aislar los timocitos DN TCRαβ+. Por ejemplo, una primera clasificación celular puede identificar células progenitoras hematopoyéticas que expresan el marcador de transducción (*es decir*, marcador para la expresión de TCRα). 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 TCRβ. 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 timocitos DN TCRαβ+. Los métodos para clasificar células DN TCRαβ+ se conocen en la técnica (documento US 7.575.925 y Schmitt *et al.*, 2002, *Immunity*: 17:749-756).

55 60 65 Las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican las diversas cadenas TCRβ de los timocitos DN TCRαβ+ se aislan y se introducen en linfocitos T que comprenden la secuencia de un ácido nucleico que codifica la cadena TCRα del TCR precursor. Como se analiza en el presente documento, los métodos de clonación de cadenas TCRβ 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 TCRβ candidatas se han aislado de los timocitos DN TCRαβ+, las secuencias de los ácidos nucleicos pueden someterse a un proceso de selección adicional mediante el cual las cadenas TCRβ con el mismo gen Vβ usado por la cadena TCRβ precursor ase seleccionan para su introducción en linfocitos T. El gen Vβ precursor que contiene la cadena TCRβ puede identificarse dentro de la población de células clasificadas usando cebadores específicos del gen Vβ 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 de que el TCR sea autoreactivo. Restringir las cadenas TCRβ candidatas a las que contienen el gen Vβ 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 TCRβ y/o el TCRα precursor en los linfocitos T. En algunas realizaciones, el vector vírico comprende además un 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, 3^a 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 *affín* (*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 Screamton, 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 β candidato con el TCR β 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 β 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 β precursor. Sin embargo, si el TCR β 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; Garcia *et al.*, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:6818-6823).

10 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.

25 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.

30 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.

35 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:e38208; 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).

45 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; mieloide; 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; mesonefroma; miosarcoma; ameloblastoma; cementoma; odontoma; teratoma; timoma; tumor trofoblástico. Adicionalmente, los siguientes tipos de cánceres también se contemplan como susceptibles al tratamiento: adenoma; colangioma; colesteatoma; ciclindroma; 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; leímioma; liomiosarcoma; mioblastoma; mioma; miosarcoma; rabdomioma; rabdomiosarcoma; epidermoma; ganglioneuroma; glioma; meduloblastoma; meningioma; neurilemoma; neuroblastoma; neuroepiteloma; neurofibroma; neuroma; paraganglioma; paraganglioma no cromafín. Los tipos de cánceres que pueden tratarse también incluyen: angioqueratoma; hiperplasia angiolinfoide con eosinofilia; angioma esclerosante; angiomatosis; glomangioma; hemangiendotelioma; hemangioma; hemangiopericitoma; hemangiosarcoma; linfangioma; linfangiomioma;

linfangiosarcoma; pinealoma; carcinosarcoma; condrosarcoma; cistosarcoma filoides; fibrosarcoma; hemangiosarcoma; liomiosarcoma; leucosarcoma; liposarcoma; linfangiosarcoma; miosarcoma; mixosarcoma; carcinoma de ovarios; rhabdomiosarcoma; 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 mieloblástica 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 linfomatosa 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, ateroesclerosis, 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, encefalomielitis 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 diapédesis 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 insulinodependiente (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, poliangeitis microscópica, síndrome de Cogan, síndrome de Whiskott-Aldrich y tromboangiitis 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.

60 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, rhabdovirus (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.

5 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).

10 "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 15 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.

20 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 serán determinadas por factores tales como el estado del paciente, tamaño, tipo y gravedad de la enfermedad, forma particular del principio activo y método de administración.

25 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

30 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-TCR β^+ "similar a $\gamma\delta$ " cuando se exponen a su antígeno afín en cultivos OP9-DL1. Asimismo, los timocitos progenitores que expresan solamente la cadena TCR α de un clon de linfocitos T específico para el antígeno tumoral WT1 también pueden diferenciarse en este linaje TCR $\alpha\beta^+$ maduro en cultivo OP9-DL1. Se generó una biblioteca de cadenas TCR β a partir de una población 35 de células DN TCR $\alpha\beta^+$ 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 TCR α específica de antígeno. Usando este enfoque, se identificaron diversas cadenas TCR β que pueden emparejarse con una cadena TCR α específica de antígeno para generar TCR con una afinidad hasta 10 veces mayor por el péptido WT1 en comparación con el TCR original.

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

45 Las señales agonistas a través de un TCR $\alpha\beta$ antes de la selección β dan como resultado la diferenciación de células doble negativas (DN) TCR $\alpha\beta^+$ "similares a $\gamma\delta$ " 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 TCR $\alpha\beta^+$ en respuesta al antígeno peptídico afín en la etapa DN3, se clasificaron timocitos progenitores DN1 y DN2 TCR $\alpha\beta^+$ 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 50 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 μ M), y los DP estaban completamente ausentes en los cultivos que contenían 0,01 μ M 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.

60 Para determinar si las señales agonistas cada vez más fuertes impulsan la formación de células DN TCR $\alpha\beta^+$, 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 TCR β . Se encontró que la mayoría de las células expresaban niveles altos de CD24 y carecían de expresión de TCR β en el día 5 (fig. 1B), pero el día 16, la mayoría de las células DN de todas las condiciones de cultivo expresaron TCR β , aunque se observó un número

5 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
10 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
15 posible que la formación de algunas células DN TCR α β ⁺ 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 α β ⁺ 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 coreceptor (fig. 2). De manera importante, las células DN observadas en estos cultivos fueron de manera uniforme TCR negativas (fig. 2).

20 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 α β ⁺ 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 α β ⁺ "aspirantes a $\gamma\delta$ " en el sistema de cultivo OP9-DL1

25 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
30 CD4⁻CD8⁻ CD117⁺CD44⁺ de ratones B6 y se transdijeron 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 transcripto 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 α β ⁺, 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 α β ⁺ 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 α β ⁺ 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 α β ⁺ 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.

50 Tomados en conjunto, estos datos indican que la población de DN TCR α β ⁺ 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 tetramero de MHC-peptido-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 1 H-2D^B de ratón y también se transdijeron 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 pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen), seguida de la transferencia utilizando la tecnología Gateway® para la recombinación (Invitrogen) en el vector retrovírico 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 retrovírico PlatE (Morita *et al.*, 2000, Gene Therapy 7:1063-1066; Cell Biolabs, Inc.) para generar sobrenadante retrovírico, que se utilizó después para transducir de manera retrovírica células 58 $\alpha\beta$ ⁻, una línea de linfocitos T
65

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

5 Se tituló el sobrenadante de la biblioteca de TCR β retrovírico, 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 retrovírica. 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 tetrámeros de MHC-péptido WT1 (fig. 4A). Después de la segunda clasificación, las células se analizaron para determinar la tinción con un tetrámero de MHC H-2D B -péptido específico para GP33, con el fin de evaluar si las células 10 positivas al tetrámero 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 tetrámeros de 15 MHC-péptido WT1, las células clasificadas se expandieron, se lisaron y se aisló el ADN. Los insertos retrovíricos 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 20 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 secuencian. 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 25 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 retrovírica en células 58 $^{+/-}$ 3D α ⁺ y se analizaron por citometría de flujo (fig. 4C). Los cuatro clones candidatos se unieron al tetrámero de MHC-péptido WT1 cuando se transdujeron en células 58 $^{+/-}$ 3D α ⁺, aunque el clon n.º 4 se unió al tetrámero 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 tetrámeros entre 3D β y los clones aislados.

30 Para evaluar de manera más directa la afinidad relativa de cada una de las cadenas TCR β por el tetrámero 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 tetrámeros de MHC-péptido WT1 y los valores de MFI se ajustaron a una curva de 35 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 tetrámeros 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 40 evaluaron por citometría de flujo para determinar la tinción de tetrámeros de MHC-péptido WT1. Cuando el clon n.º 1 tenía codones optimizados, se encontró que se unía al tetrámero 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 45 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 50 MHC H-2D B de forma independiente del péptido, las células 58 $^{+/-}$ transducidas se tiñeron con un grupo de tetrámeros de MHC H-2D B tetrámeros (péptidos: WT1, GP33, E4, MESN, SQV). Las tres cadenas TCR β candidatas se tiñeron con el tetrámero 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 tetrámeros de MHC H-2D B -péptido, las tres cadenas TCR β fueron uniformemente negativas para la tinción de los tetrámeros, 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).

55 **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 lentivírico 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.

65 **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 transcripto y proteína, respectivamente) y la molécula MHC de clase I humana β2 microglobulina (β2M) (números de acceso de Genbank NM_004048.2 (SEQ ID NO: 52) y NP_004039.1 (SEQ ID NO: 53), secuencias de transcripto y proteína, respectivamente). La cadena TCRα del clon C4 de TCR se transduce de manera estable en células progenitoras hematopoyéticas derivadas de la sangre del cordón umbilical mediante transducción retrovírica, utilizando un vector retrovírico 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/β2M 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 TCRα que producen un reordenamiento en marco en el locus de TCRβ adaptarán uno de dos destinos celulares: aquellos que expresan una cadena TCRβ que no se empareja bien con la TCRα transgénica, o que se empareja con la TCRα transgénica pero no recibe una señal fuerte a través de este αβTCR, se diferenciará a la etapa DP en respuesta a la señalización a través del pre-TCR; por otro lado, aquellos que generan una cadena TCRβ que puede emparejarse con la TCRα transgénica y reciben una señal suficientemente fuerte a través de este αβTCR maduro se señalarán para diferenciarse hacia un linaje DN TCRαβ+ similar a γδ. 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 αβ se eliminarán del cultivo, permitiendo que las células similares a γδ que se forman debido a la señalización temprana de TCR αβ se acumulen.

25 Aislamiento de cadenas TCRβ candidatas:

En diversos momentos del cultivo, las células no adherentes que tienen un fenotipo DN TCRαβ+ similar a γδ 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 CD8αβ, 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 TCRβ de todas las células DN TCRαβ+ que emergen en el cultivo (véase a continuación). 35 También puede ser deseable restringir los linfocitos T candidatos a aquellos que usan el mismo segmento Vβ utilizado por la cadena TCRβ de C4 original (Vβ17), para conservar los contactos de MHC con CDR1 y CDR2 del TCR de C4 precursor.

40 Despues de la clasificación de células, las cadenas TCRβ endógenas se clonian purificando el ARN total, realizando RT-PCR RACE de longitud completa con cebadores C-β1 o C-β2 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 retrovírico 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 retrovírica de cadenas TCRβ potencialmente reactivas con WT1.

Varias de TCR específicos de WT1 de alta afinidad:

50 Las cadenas TCRβ que pueden emparejarse con la cadena TCRα de C4 para formar un TCR específico de WT1 de alta afinidad se identifican mediante la transducción de la biblioteca de TCRβ en la línea de linfocitos T humanos H9 (número de catálogo HTB-176, ATCC, Manassas, VA) que se ha transducido para expresar la cadena TCRα de C4 (H9-C4α). Las células transducidas se clasifican mediante citometría de flujo para determinar niveles altos de tinción con tetrámeros de MHC-péptido WT1 y los insertos retrovíricos se amplificarán mediante PCR a partir de la población clasificada. Las cadenas TCRβ candidatas se identifican mediante clonación TOPO del producto de PCR seguido de análisis de secuencia. Las cadenas TCRβ seleccionadas y la C4α precursora se transducen en células H9-C4α 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 TCRβ que pueden emparejarse con TCRα 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.

65 **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*:

15 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).

20 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.

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

35 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.

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

45 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 retrovírica) 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 retrovíricas 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 TCR β + muestra que estas células DN TCR β + también están presentes en la periferia de ratones retrogénicos (figura 6B).

- 5 Los esplenocitos de ratones retrogénicos 3D-PYY α y 7431 α 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 TCR β +, así como para determinar la expresión del gen V β de TCR precursor (figura 7). De nuevo, se observa 10 enriquecimiento para la familia de genes V β 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-PYY α de alta afinidad, en estos cultivos está presente un número significativo de 15 linfocitos T específicos de antígeno. El hecho de que las células positivas para los tetrámeros se encuentren dentro de la población transducida con TCR α (hCD2+) indica que estas células se formaron como resultado de la expresión temprana de la cadena TCR α . Esto demuestra que las células DN TCR β + 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.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fred Hutchinson Cancer Research Center
 Schmitt, Thomas M.
 25 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

60 <220>
 <223> péptido WT1 sintético

<400> 2

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5

5
 <210> 3
 <211> 3366
 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

cgtgggattt ccagaccgcg	gctttctaattt	cggtcgaaa	ggaagctctg	cagctctattt	60
gggaatataag ctcattatctct	ggacttcttc	tctttcttctt	tctcccccctt	cttctcttcgtc	120
gaagaagctc aagacaaaaac	caggaagccg	gcgaccctca	cctcctcgaa	ggctgggagg	180
aaggaggaaa acgaaagtctg	ccggccgcgc	gctgtcccc	gagagctgcc	tttcctcgaa	240
catccctggg gctgcccggg	gacctcgcag	ggcggatata	aagaaccgcg	gccttgggaa	300
gaggcggaga cccggcttttta	aagaaagaag	tcctgggtcc	tgcggtctgg	ggcgaggcaa	360
gggcgcgtttt ctgcccacgc	tccccgtggc	ccatcgatcc	cccgccgcgtc	cgccgctgtt	420
ctaaggagag aagtgggggc	cccccaggct	cgcgcgtgg	gcgaagcagc	atgggcagtc	480
ggtgcgcgcgtt	ggccctggcg	gtgctctcg	ccttgctgtg	tcaggctcg	540
tgttcgaactt	gaagctgcag	gagttcgtca	acaagaagg	gctgctgggg	600

10

gctgcccggg	gggcgcgggg	ccaccccggt	gcccctgccc	gaccttcttc	cgcgtgtgcc	660
tcaagcacta	ccaggccagc	gtgtcccccg	agccgcctcg	cacctaaggc	agcgcgcgtca	720
cccccggtct	gggcgtcgac	tccttcagtc	tgcccacgg	cgggggggccc	gactccgcgt	780
tcagcaaccc	catccgccttc	cccttcggct	tcacctggcc	gggcaccccttc	tctctgattta	840
ttgaagctct	ccacacagat	tctcctgtat	acctcgcaac	agaaaaaccca	gaaagactca	900
tcagccgcct	ggccacccag	aggcacctga	cgggtggcga	ggagtggtcc	caggacactgc	960
acagcagcgg	ccgcacggac	ctcaagta	cctaccgct	cgtgtgtgac	gaacactact	1020
acggagaggg	ctgctccgtt	ttctggcgtc	cccgggacga	tgccttcggc	cacttcacct	1080
gtggggagcg	tggggagaaa	gtgtgcaacc	ctggctggaa	agggccctac	tgcacagagc	1140
cgatctgcct	gcttggatgt	gatgagcagc	atggattttt	tgacaaacca	ggggaatgca	1200
agtgcagagt	gggctggcag	ggccgtact	gtgacgagtg	tatccgctat	ccaggctgtc	1260
tccatggcac	ctgcccagcg	ccctggcagt	gcaactgcca	ggaaggctgg	gggggccttt	1320
tctgcaacca	ggacctgaac	tactgcacac	accataagcc	ctgcaagaat	ggagccacct	1380
gcaccaacac	gggcagggg	agctacactt	gcttgcgg	gcctgggtac	acaggtgcca	1440
cctgcgagct	ggggatttgc	gagtgtgacc	ccagcccttg	taagaacgga	gggagctgca	1500
cgatctcgta	gaacagctac	tcctgtaccc	gcccacccgg	cttctacggc	aaaatctgt	1560
aatttgagtgc	catgacctgt	gccccggcc	cttgctttaa	cgggggtcgg	tgctcagaca	1620
gccccgatgg	agggtacagc	tgccgctgccc	ccgtgggcta	ctccggcttc	aactgtgaga	1680
agaaaaattga	ctactgcagc	tcttcaccct	gttctaattgg	tgccaagtgt	gtggacacctg	1740
gtgatgccta	cctgtgcccgc	tgccaggccg	gcttctcggg	gaggcactgt	gacgacaacg	1800
tggacgactg	cgccctccccc	ccgtgcgcac	acgggggcac	ctgccccggat	ggcgtgaacg	1860
acttctcctg	cacctgcccgc	cctggctaca	cgggcaggaa	ctgcaagtgc	cccgtcagca	1920
ggtgcgagca	cgccacccctgc	cacaatgggg	ccacctgcca	cgagaggggc	caccgctatg	1980
tgtgcgagtg	tgcccggggc	tacgggggtc	ccaaactgcca	gttcctgctc	cccgagctgc	2040
ccccggggccc	agcgggtgggt	gacctcactg	agaagctaga	gggcaaggggc	gggcccattcc	2100
cctgggtggc	cgtgtgcgcac	ggggtcatcc	ttgtcctcat	gctgctgctg	ggctgtgcgg	2160
ctgtgggtgt	ctgcttcggc	ctgaggctgc	agaagcaccg	gcccccaagcc	gacccttgc	2220
ggggggagac	ggagaccatag	aacaacctgg	ccaaactgcca	gcgtgagaag	gacatctcag	2280
tcagcatcat	cggggccac	cagataaaga	acaccaacaa	gaaggcggac	ttccacgggg	2340
accacagcgc	cgacaagaat	ggcttcaagg	cccgctaccc	agcggggac	tataacctcg	2400
tgcaggacct	caagggtgac	gacaccgc	tcagggacgc	gcacagcaag	cgtgacacca	2460
agtgcagcc	ccagggtctcc	tcaggggagg	agaaggggac	cccgaccaca	ctcagggggt	2520
gagaagcatc	tgaaagaaaa	aggccggact	cgggctgttc	aacttcaaaa	gacaccaagt	2580
accagtcgt	gtacgtcata	tccgaggaga	aggatgagtg	cgtcatagca	actgagggt	2640
aaaatggaag	ttagatggca	agactccgt	ttctcttaaa	ataagaaaa	ttccaaggat	2700
atatgccccca	acgaatgctg	ctgaagagga	gggaggcctc	gtggactgt	gctgagaaac	2760
cgagttcaga	ccgagcaggt	tctccttcgt	aggtcctcga	cgcctgcccga	cagcctgtcg	2820
cggcccccggcc	gcctgcggca	ctgccttcgg	tgacgtgc	gttgcactat	ggacagttgc	2880
tcttaagaga	atatatattt	aatgggtga	actgaattac	gcataagaag	catgcactgc	2940
ctgagtgat	atttggatt	cttatgagcc	agtctttct	tgaatttagaa	acacaaacac	3000
tgcctttatt	gtcctttttt	atacgaagat	gtgcttttc	tagatggaaa	agatgtgt	3060
tattttttgg	atttgtaaaa	atattttca	tgatatctgt	aaagctttag	tatttgtga	3120
tgttcgtttt	ttataattta	attttggt	aatatgtaca	aaggcacttc	gggtctatgt	3180
gactatattt	ttttgtat	aatatgtat	atgaaatatt	gtgcaaatgt	tatgtgatt	3240
ttttactgtt	ttgttaatga	agaaattcc	ttttaaaata	ttttccaaa	ataaatttta	3300
tgaatgacaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	3360
	aaaaaaaa					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

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 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		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		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		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		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 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		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 Pro Phe Pro	
530	535		540
Trp Val Ala Val Cys	Ala Gly Val Ile	Leu Val Leu Met Leu Leu Leu	
545	550		560
Gly Cys Ala Ala Val Val	Val Cys Val Arg	Leu Arg Leu Gln Lys His	
565	570		575

Arg Pro Pro Ala Asp Pro Cys Arg Gly Glu Thr Glu Thr Met Asn Asn
 580 585 590
 Leu Ala Asn Cys Gln Arg Glu Lys Asp Ile Ser Val Ser Ile Ile Gly
 595 600 605
 Ala Thr Gln Ile Lys Asn Thr Asn Lys 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

5

<210> 5
 <211> 3444
 <212> DNA
 <213> *Mus musculus*

<400> 5

cttggcgata	gtgcaagaga	taccggtcta	gaacactctg	ggagcggcag	cggtcgccga	60
gtgacgcccgg	gcccggaaac	caggcgccgc	gcccgcgtcc	ttgcccaccac	cgttcccacc	120
gcccgcgtcc	ggggccccggg	ttatcgctc	accgggtggg	tttccagacc	gcccgttccct	180
aataggcctg	cgaaggaaagc	caactcaaggc	tcttggg	attaagctga	acatctgggc	240
tcttccct	ctgtgtctta	tctccttct	ccttttccc	tccgcaaga	agcttaagac	300
aaaaccagaa	agcaggagac	actcacctct	ccgtggactg	aaagccagac	gaagagggaaa	360
ccgaaagttg	tccttctca	gtgcctcgta	gagcttgc	cggggaccta	gtcgaaggca	420
ccgcaccctc	ctgaagcgcac	ctggccctga	tagcacacct	ggagccgaga	gacgcctttc	480
cggcgtact	cctcggggtca	tatagacttt	cctggcatcc	ctgggtctt	gaagaagaaa	540
gaaaagagga	tactctagga	gagcaagggc	gtccagcgg	accatgggc	gtcggagcgc	600
gctagccctt	gcccgtggct	ctggccctgt	gtgcccgg	tggagctccg	gcttatttga	660
gctgaagctg	caggagttcg	tcaacaagaa	ggggctgctg	gggaaccgca	actgtgcgg	720
cgggggctct	ggcccgccct	gcccgtcgag	gacccctt	cgcgtatgcc	tcaaggacta	780
ccagggcagc	gtgtcaccgg	agccaccctg	cacctacggc	agtgtgtca	cggcagtgc	840
gggtgtcgac	tccttcagcc	tgcctgtatgg	cgcaggcata	gaccggccct	tcaagcaacc	900
catccgattc	ccctcgccgt	tcacccgttcc	aggtacccctt	tctctgtatca	ttgaaggccct	960
ccatacagac	tctcccgatg	acccgcac	agaaaaacc	gaaagactca	tcaaggccct	1020
gaccacacag	aggcacccctca	ctgtgggaga	agaatggtct	caggacccct	acagtgcgg	1080
ccgcacacag	ctccggtaact	tttcccggtt	tgtgtgtac	gagcactact	acggagaagg	1140
ttgctctgt	ttctgcccac	ctcggatga	cgccttggc	cacttcac	ggggggacag	1200
agggggaaag	atgtgcgacc	ctggctggaa	aggccagtac	tgcactgacc	caatctgtct	1260
gccagggtgt	gtgaccaac	atggatactg	tgacaaacca	ggggagtgc	agtgcagagt	1320
tggctggcag	ggccgctact	gcatggatgt	catccgatac	ccaggttgc	tccatggcac	1380
ctgcccagca	ccctggcagt	gtaaactgca	ggaaggctgg	gggggcctt	tctgcaacca	1440
agacactgaac	tactgtactc	accataagcc	gtcaggaat	ggagccac	gcaccaacac	1500
ggcccgagggg	agctacacat	gttccctggc	acccgtgtat	acaggtgca	actgtgagct	1560
ggaagtagat	gagtgtgtc	ctagccctg	caagaacgg	gctgactgca	cggacccctg	1620
ggacagctt	tcttcac	gcccgttcc	cttctatggc	aaggctgt	agctgagcgc	1680
catgacccgt	gcagatggcc	cttgcattca	tggaggacga	tgttcagata	accctgacgg	1740
aggctacacc	tgccattgccc	ccttggctt	ctctggctt	aactgtgaga	agaagatgg	1800
tctctgccc	tcttccctt	gttctaaccg	tgccttgcgt	gtggacccct	gcaactctt	1860
cctgtgccc	tgccaggctg	gtttctccgg	gaggtactgc	gaggacaatg	tggatgactg	1920
tgccttcc	cctgtgtc	atgggggcac	ctgcccggac	agtgtgaacg	acttctccct	1980
tacctgccc	cctggctaca	cgggcaagaa	ctgcagcgc	cctgtcagca	ggtgtgagca	2040
tgcaccctgc	cataatgggg	ccacctgcca	ccagaggggc	cagcgtaca	tgtgtgagtg	2100
cgcccaggc	tatggcggcc	ccaaactgcca	gtttctgtc	cctgagccac	caccaggggc	2160
catgggtgt	gacctcagt	agaggcata	ggagagccag	ggcgggccc	tccctgggt	2220
ggccgtgt	gccgggggtgg	tgcttgcct	cctgtgt	ctggctgt	ctgctgtgt	2280
ggtctgcgtc	cggctgaagc	tacagaaaca	ccagcctca	cctgaacc	gtgggggaga	2340
gacagaaacc	atgaacaacc	tagccaattt	ccagcgcgag	aaggacgtt	ctgttagcat	2400
cattgggct	acccagatca	agaacacaa	caagaaggcg	gacttgc	gggaccatgg	2460
agccgagaag	agcagctt	aggtccgata	ccccactgt	gactataacc	tgcgtcgaga	2520
cctcaaggga	gtatgaagca	cggtcaggga	tacacacagc	aaacgtgaca	ccaagtgc	2580
gtcacagagc	tctgcaggag	aagagaagat	cgccccaaaca	cttaggggt	gggagattcc	2640
tgacagaaaa	aggccagagt	ctgttactc	tacttcaaa	gacaccaatg	accagtgcgt	2700
gtatgtctg	tctgcaggaaa	aggatgtgt	tgttatagc	actgggtgt	aatatggaa	2760
cgatgtggca	aaattccat	ttctctttaaa	aaaattcca	aggatatacg	cccgatgaat	2820
gctgtgaga	gaggaggaa	gaggaaaccc	agggactgt	gtcgagaacc	agttcagc	2880
gaagctgggt	ctctcagat	tagcagaggc	gcccgcac	gccagcctag	gtttggct	2940
ccgctggact	ccctgtgt	tgttccatt	gcactatg	cagttgc	tttggatata	3000
tattttaat	gacgagt	ttgattcata	taggaagcac	gcactgccc	cacgtctatc	3060
ttggattact	atgagccat	ctttccttga	actagaaaca	caactgc	cttgcctt	3120
tttgatact	agatgtgtt	tttttttcc	tagacgggaa	aaagaaaacg	tgtgttattt	3180
ttttgggatt	tgtaaaaata	tttttcatga	tatctgtaaa	gcttgcgt	tttgcgtacgt	3240
tcattttttt	ataatttaaa	ttttggtaaa	tatgtacaaa	ggcacttc	gtctatgt	3300
ctatattttt	ttgtatataa	atgtatttt	ggaatattgt	gcaaata	tttgagttt	3360
ttactgtttt	gttaatgaag	aaattcattt	aaaaatattt	tttccaaaat	aaatataat	3420
aactacaaaa	aaaaaaaaaaa	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
 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	cgcagcccc	60
gccgccttgg	tgcagcgta	accggcacta	gcccgcgtc	agccccagga	ttagacaga	120
gacgcgtcct	cgcgccggc	gcccgcgc	cgtactacc	tggattac	acagcggcag	180
ctgcagcgga	gccagcgaga	aggccaaagg	ggagcagcgt	cccagagga	gcccgcctt	240
tcagggaccc	cggcgctgg	cggacgcgc	ggaaagcgc	gtcgcaaca	gagccagatt	300
gaggggccgc	gggtggagag	agcgcacccc	gaggggatgg	cggcagcgtc	ccggagcgc	360
tctggctggg	cgctactgt	gctggtggca	cttggcagc	agcgcgcgc	cggtccggc	420
gttgcgcgc	tgcagctgca	ggaggtcata	aacgagcgc	gcgtactggc	cagtggcgg	480
ccttgcgagc	ccggctgcgc	gacttcttc	cgcgtctgc	ttaagcactt	ccaggcggc	540
gtatcgcccc	gaccctgac	cttcggacc	gtctccacgc	cggatttggg	caccaactcc	600
ttcgcgttcc	gggacgacag	tagcggcggg	gggcgcaccc	ctcttcaact	gcccttcaat	660
ttcacctggc	cggggtaccc	ctcgctcatc	atcgaagctt	ggcacgcgc	aggagacgac	720
ctgcggccag	aggccttgc	accagatgca	ctcatcaga	agatcgccat	ccagggctcc	780
ctagctgtgg	gtcagaactg	gttattggat	gagcaaacc	gcaccctcac	aaggctgcgc	840
tactcttacc	gggtcatctg	cagtgacaac	tactatggag	acaactgctc	ccgcctgtc	900
aagaagcgca	atgaccactt	cgcccaactat	gtgtgcgc	cagatggca	cttgcctgc	960
ctgcccgtt	ggactgggaa	atattgc	cagcctatct	gtcttcggg	ctgtcatgaa	1020
cagaatggct	actgcagcaa	gccagcagag	tgcctctgc	gcccaggctg	gcagggccgg	1080
ctgtgtacg	aatgcacccc	ccacaatggc	tgtcgcac	gcacccgc	cactccctgg	1140
caatgtactt	gtgatgaggg	ctggggaggc	ctgttttgc	accaagatct	caactactgc	1200
acccaccact	ccccatgca	gaatggggca	acgtgctcca	acagtggca	gcgaagctac	1260
acctgcaccc	gtcgcccagg	ctacactgg	gtggactgt	agctggagct	cagcgagtgt	1320
gacagcaacc	cctgtcgca	tggaggcagc	tgttaaggacc	aggaggatgg	ctaccactgc	1380
ctgtgtcc	cgggctacta	tggctgc	tgtgaacaca	gcacccgt	ctgcgcgc	1440
tccccctgt	tcaatgggg	ctcctgc	gagcgcaccc	agggggccaa	ctatgcttgc	1500
gaatgtcccc	ccaacttca	cggttcaac	tgcgagaaga	aagtggacag	gtgcaccac	1560
aaccctgt	ccaacggggg	acagtgcctg	aaccgagg	caagccgc	gtccgcgtc	1620
cgtccgtt	tcacgggcac	ctactgt	ctccacgt	gcgactgtc	ccgtaaacc	1680
tgcgcac	gtggacttg	ccatgac	gagaatggc	tcatgtgc	ctgccc	1740
ggcttctgt	gccgacgc	tgagg	gcgttgc	acatccat	atgcctgtc	1800
tgcttcaaca	gggcccac	ctacacc	cttccac	acacc	gtgcaactgc	1860
ccttatggct	ttgtggggc	ccgctgc	ttccctgt	gttgcgc	cagcttccc	1920
tggggccg	tctcgctgg	tgtggggct	gcagtgc	tggactgt	gggcattgg	1980
gcagtgcc	tgcggcag	gcggcttc	cgccggac	acggcagc	ggaagccat	2040
aacaacttgc	cggaacttca	gaaggaca	ctgattcc	ccgccc	taaaaacaca	2100
aaccagaaga	aggagctg	agtggactgt	ggcctgg	agtccaa	tgccaaac	2160
caaaaccaca	cattggacta	taatctggc	ccagggccc	tggggcggg	gaccatgca	2220
ggaaagttc	cccacagtg	caagagctt	ggagaga	cgccactgc	gttacac	2280
gaaaagccag	agtgtcgat	atcagcgata	tgctccccc	gggactcc	gtaccagt	2340
gtgtgttgc	tatcagagga	gaggaatg	tgtgtcat	ccacgg	ataaggcagg	2400
agccatcc	gacatcc	ctcagcccc	cggttgc	ttccctct	attgtttaca	2460
ttgcatcc	gatgggac	tttcatat	caacgtgc	ctctcagg	gaggagg	2520
tggcagg	cgacagact	gtgaactgc	caagagat	aatacc	cacac	2580
gggtgtct	tggcatc	ttggcag	caccaacc	aggaac	gagaagag	2640
atgcactgg	gcactgc	gccatgt	gccttc	ggcttc	ggggctcc	2700
cctgtttcc	agagagat	gcagtag	catggggcc	ggag	tggcctcc	2760
tggcattcc	gtttccaa	gtgcctt	ccaggct	acggc	ttggggcc	2820
atcagaagg	agagaggg	ccaatg	cagg	tttt	aaaacc	2880
ggtgctc	ttgctggg	ttgcctgg	ggtgagg	gtgtc	gagg	2940
ctttctgc	catgcctca	actactgt	gcagg	ctctc	taggc	3000
ggcaagaat	gtccgtct	ccggcttca	ccacc	ggctt	tctgt	3060
gacaggcaga	gggcctgccc	ctcccacc	ccaagg	tcac	tggggc	3120
agggcagt	gttggaaatt	ccactg	ggaaatc	tgctgc	ggcc	3180
tttctcc	caagccc	tccaca	cgac	ctctgg	tca	3240
agaccacc	caaagctgt	ttcagaaat	caataat	agttt	ttt	3300
tttttttt	gtagtttatt	ttggagt	gtatt	caat	aattt	3360
tgacc	tttct	acatttata	acattt	ttt	tatataat	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 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 Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Val Asp
 305 310 315 320
 Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly
 325 330 335
 Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr His Cys Leu Cys Pro Pro
 340 345 350
 Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser Thr Leu Ser Cys Ala Asp
 355 360 365
 Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly Ala
 370 375 380
 Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe Thr Gly Ser Asn Cys Glu
 385 390 395 400
 Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gln
 405 410 415
 Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys Arg Cys Arg Pro Gly Phe
 420 425 430
 Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser Asp Cys Ala Arg Asn Pro
 435 440 445
 Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Leu Met Cys
 450 455 460
 Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Thr Ser
 465 470 475 480

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

<210> 9
 <211> 3451
 <212> DNA
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 9

atataagaaa ggctctggag caagcagggtt tcagtagcgg cgctgctcgc aggctaggaa	60
cccgaggcca agagctcag ccaaagtac ttgggtcag tgtactccct cactagcccg	120
ctcgagaccc taggatttc tccagacac gtacttagag cagccaccgc ccagtgcggc	180
tcacctggat tacctaccga ggcatcgagc agcggagtt ttgagaaggc gacaagggag	240
cagcgtcccg aggggaatca gctttcagg aactcgctg gcagacggga cttgcggag	300
agcgacatcc etaacaagca gattcggagt cccggagtgg agaggacacc ccaagggatg	360
acgcctgcgt cccggagcgc ctgtcgtgg gcgcgtactgc tgctggcggt actgtggccg	420
cagcagcgcg ctgcgggctc cggcatctc cagctgcggc tgcaggagtt cgtcaaccag	480
cgcgtatgc tggccaatgg gcagtcctgc gaaccgggct gccggacttt cttccgcac	540
tgccttaagc acttccaggc aaccttctcc gagggaccct gcaccttgg caatgtctcc	600
acgcggatcc tgggcaccaa ctcctcgtc gtcaggacca agaatacggt cagtggcgc	660
aaccctctgc agttgcctt caatttcacc tggccggaa ccttctact caacatccaa	720
gcttggcaca caccgggaga cgacctgcgg ccagagactt cgccagggaa ctctctcatc	780
agccaaatca tcatccaagg ctctttgtc gtggtaaga tttggcaac agacgagcaa	840
aatgacaccc tcaccagact gagctactt tacccggtca tctgcagtga caactactat	900
ggagagagct gttctcgctt atgcaagaag cgcgatgacc acttcggaca ttatgagtgc	960
cagccagatg gcagcctgtc ctgcctgcgg ggctggactg ggaagtactg tgaccagcct	1020
atatgtcttt ctggctgtca tgagcagaat gttactgca gcaagccaga ttagtgcac	1080
tgcctgtccag gttggcaggg tgcctgtgc aatgaatgtt tccccacaa tggctgtcg	1140
catggcacct gcagcatccc ctggcagtgt gcctgcgatg agggatgggg aggtctgtt	1200
tgtgaccaag atctcaacta ctgtactcac cactctccgt gcaagaatgg atcaacgtgt	1260
tccaacagtg gcccaaagggt ttatacctgc acctgtctcc caggctacac tggtagcac	1320
tgtgagctgg gactcagcaa gtgtgccagc aacccctgtc gaaatggtgg cagctgtaa	1380
gaccaggaga atagctacca ctgcctgtgt ccccccaggct actatggca gcaactgtgag	1440
catagtacct tgacctgcgc ggactcaccc tgcttcaatg gggcttcttgc cccggagcgc	1500
aaccagggggt ccagttatgc ctgcgaatgc ccccccactt taccggctc taactgtgag	1560
aagaaagtag acaggtgtac cagcaaccgg tggccaatgg gaggccagt gcaagaaacaga	1620
ggtccaagcc gAACCTGCCG ctgcggccct ggattcacag gcaccactg tgaactgcac	1680
atcagcgtatt gtgcccgaag tccctgtgc cacggggggca cttgcaacga tctggagaat	1740
gggcctgtgt gcacctgccc cgctggcttc tctggaaaggc gctgcgaggt gcccataacc	1800
cacgatgcct gtgcctccgg accctgcttc aatggggcca cctgctacac tggcctctcc	1860
ccaaacaact tcgtctgca ctgtccttat ggctttgtgg gcagccgctg cgagtttccc	1920
gtgggcttgc caccctggctt cccctggta gctgtctcgc tggcgtggg gctagtggtt	1980
ctgctgggtgc tccctggcat ggtggtagtg gctgtgcggc agctgcggct tggaggccc	2040
gatgacgaga gcagggaagg catgaacaat ctgtcagact tccagaagga caacctaattc	2100
cctgcggccc agtcaaaaaa cacaaccagg aagaaggaggc tggaaatggg ctgtggctcg	2160
gacaagtcca attgtggcaa actgcagaac cacacattgg actacaatct agccccgggaa	2220
ctccttaggac gggcggcat gcctggaaat tccctcaca gtgacaagag ctaggagag	2280
aagggtccac ttcgggttaca cagtggaaat ccagactgtc gaatatcgc catttgcctc	2340
cccaggact ctatgtacca atcagttgtt ttgatatcga aagagggaa cgagtgtgt	2400
attgccacag aggtataagg caggagccta ctcagacacc cagctccggc ccagcagctg	2460
ggccttcctt ctgcattgtt tacattgtcat cctgtatggg acatctttag tatgcacagt	2520
gctgctctgc ggaggaggag gaaatggcat gaactgaaca gactgtgaac cccccaagag	2580
tcgcaccggc ttcgcacacc tccaggagtc tgcctggctt cagatggca gccccggca	2640
gggaacagag ttgaggagtt agaggagcat cagttggact gatatctaag tggcctctcg	2700
aacttggact tgcctgcacca acagttgtca toatggagct cttgactgtt ctccagagaa	2760
tggcagtggc cctagttgggt cttggcgctg ctgtagctcc tggggcattc tttttccaa	2820
aagtgcctt gcccagactc catcctcaca gctggggcca aatgagaaatg cagagaggag	2880
gcttgcggaa gataggcctc ccgcaggccg aacaggctt gatggca ttaaggcaggaa	2940
gctactctgc agtgaggaa agcccgaggaa ggggacacgt gtgactcctg cttccaaacc	3000
cagttaggtgg agtgccaccc ttagccctca ggcaggactt ggtccttccc ctggcctcg	3060
tgcctctggg ctcatgtgaa cagatgggtt tagggcacgc cccttttgc acccagggggt	3120
acaggcctca ctggggagct caggcccttc atgctaaact cccaaataagg gagatgggg	3180
gaagggggct tggccctagg cccttccctc cttcacaccc atttctggc cttgagccct	3240
gggctccacc agtgcggact gctgccccga gaccaaccc tttggaaatct agtattttga taatttaaga	3300
aataatatga gttttttttt tttttttttt ttggaaatct agtattttga taatttaaga	3360
atcagaagca ctggcccttc tacattttt aacatttattt tttttttttt ttggaaatct	3420
aatatgaaac agatgtgtac aggaattttt tttttttttt ttggaaatct	3451

<400> 10

Met	Thr	Pro	Ala	Ser	Arg	Ser	Ala	Cys	Arg	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu
1															15
Ala	Val	Leu	Trp	Pro	Gln	Gln	Arg	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Ile	Phe	Gln
															30
Leu	Arg	Leu	Gln	Glu	Phe	Val	Asn	Gln	Arg	Gly	Met	Leu	Ala	Asn	Gly
															45
Gln	Ser	Cys	Glu	Pro	Gly	Cys	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Ile	Cys	Leu	Lys
															60
His	Phe	Gln	Ala	Thr	Phe	Ser	Glu	Gly	Pro	Cys	Thr	Phe	Gly	Asn	Val
															80
Ser	Thr	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Asn	Ser	Phe	Val	Val	Arg	Asp	Lys	Asn
															95
Ser	Gly	Ser	Gly	Arg	Asn	Pro	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Thr	Trp
															110
Pro	Gly	Thr	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	Gln	Ala	Trp	His	Thr	Pro	Gly	Asp
															125
Asp	Leu	Arg	Pro	Glu	Thr	Ser	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	Ile	Ser	Gln	Ile
															140
Ile	Ile	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Lys	Ile	Trp	Arg	Thr	Asp	Glu
															160
145															
Gln	Asn	Asp	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Val	Ile	Cys
															175
165															
Ser	Asp	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Ser	Cys	Ser	Arg	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg
															190
180															
Asp	Asp	His	Phe	Gly	His	Tyr	Glu	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly	Ser	Leu	Ser
															205
195															
Cys	Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Lys	Tyr	Cys	Asp	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu
															220
210															
215															

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 Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg
 545 550 555 560
 Pro Asp Asp Glu Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln
 565 570 575
 Lys Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys
 580 585 590
 Lys Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys
 595 600 605
 Leu Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Leu Leu Gly
 610 615 620
 Arg Gly Gly Met Pro Gly Lys Tyr Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly
 625 630 635 640
 Glu Lys Val Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile
 645 650 655
 Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu
 660 665 670
 Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
 675 680 685

<210> 11

<211> 2977

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

agctggggta	aggagttcaa	ggcagcgccc	acacccgggg	gctctccgca	acccgaccgc	60
ctgtccgctc	ccccacttcc	cgccctccct	cccacctact	cattcaccca	cccacccacc	120
cagagccggg	acggcagccc	aggcggccgg	gccccgcccgt	ctcctcgccg	cgatcctgga	180
cttccttgc	ctgcaggacc	cggctccac	gtgtgtcccg	gagccggcgt	ctcagcacac	240
gctccgcgtcc	gggcctgggt	gcctacagca	gcccagagcag	cagggagtcc	gggacccggg	300
cggcatctgg	gccaagttag	gcccggcga	ggccagcgct	gaacgtctcc	agggccggag	360
gagccgcggg	gcgtccgggt	ctgagccga	gaaaatgggc	tccgacgtgc	gggacctgaa	420
cgcgcgtctg	cccgccgtcc	cctccctggg	tggcggcggc	ggctgtccc	tgccctgtgag	480
cggcgcggcg	cagtgggcgc	cggtgctgga	cttgcgccc	ccggggcgtt	cgccttacgg	540
gtcggtggc	gccccccgcgc	cgcacccggc	tccgcccaca	ccccccgcgc	cggccctca	600
ctccttcatc	aaacaggagc	cgagctgggg	cggcgcggag	ccgcacgagg	agcagtgcct	660
gagccgccttc	actgtccact	tttccggca	gttcaactggc	acagccggag	cctgtcgcta	720
cggggcccttc	gtccttcctc	cgcacccggc	ggcgtcatcc	ggccagggca	gatgtttcc	780
taacgcgccc	tacctggcca	gctgcctcga	gagccagccc	gctattcgca	atcagggtta	840
cagcacggtc	accttcgacg	ggacgcccag	ctacggtcac	acgcccctcgc	accatgcggc	900
gcagttcccc	aaccactcat	tcaagcatga	ggatcccatg	ggccagcagg	gctcgctggg	960
tgagcagcag	tactcggtgc	cgcggccgt	ctatggctgc	cacacccca	ccgacagctg	1020
cacccggcagc	caggctttgc	tgctgaggac	gcccacccgc	agtgacaatt	tataccaaat	1080
gacatcccag	tttgaatgca	tgacctggaa	tcagatgaac	ttaggagcca	ccttaaagggg	1140
ccacacgaca	gggtacgaga	gcgataacca	cacaacgccc	atcctctgca	gagcccaata	1200
cagaatacac	acgcacgggt	tcttcagagg	cattcaggat	gtgcgacgtg	tgccctggagt	1260
agccccgact	tttgcgtccgt	cggcatctga	gaccagttag	aaacgcctt	tcatgtgtgc	1320
ttaccaggc	tttgcataaaga	gatattttaa	gtgtccac	ttacagatgc	acagcaggaa	1380
gcacactgtt	gagaaaccat	accagtgtga	cttcaaggac	tgtgaacgaa	gttttctcg	1440
ttcagaccag	ctcaaaagac	accaaaggag	acatacaggt	gtgaaaccat	tccagtgtaa	1500
aacttgcag	cgaaagttct	cccggtccga	ccacctgaag	acccacacca	ggactcatac	1560
aggtgaaaag	cccttcagct	gtcggtggcc	aaaggtagtgc	aaaaagtttgc	cccggtcaga	1620
tgaatttagtc	ccggccatcaca	acatgcatca	gagaaacatg	accaaactcc	agctggcgct	1680
ttgaggggtc	tccctcgggg	accgttca	gtcccaggca	gcacagtgtg	tgaactgctt	1740
tcaagtctga	ctctccactc	ctcctacta	aaaaggaaac	ttcagttgtat	cttcttcatc	1800
caacttccaa	gacaagatac	cgggtcttct	ggaaactacc	aggtgtgcct	ggaagagttg	1860
gtctctgccc	tgcctacttt	tagttactc	acaggccctg	gagaagcagc	taacaatgtc	1920
tggttagtt	aaagcccatt	gccatttgc	gtggattttc	tactgttaaga	agagccatag	1980
ctgatcatgt	ccccctgacc	cttcccttct	tttttatgc	tcgttttcgc	tgggatgga	2040
attattgtac	cattttctat	catggatat	ttataggcca	gggcatgtgt	atgtgtctgc	2100
taatgtaaac	tttgcatagg	tttccattta	ctaacagcaa	cagcaagaaa	taaatcagag	2160
agcaaggcat	cggggggtgaa	tcttgcataa	cattcccgag	gtcagccagg	ctgctaacct	2220
ggaaagcagg	atgttagttct	gccaggcaac	ttttaaagct	catgcatttc	aagcagctg	2280
agaaaaaaatc	agaactaacc	agtacccctg	tatagaaatc	taaaagaatt	ttaccattca	2340
gttaattcaa	tgtgaacact	ggcacactgc	tcttaagaaa	ctatgaagat	ctgagatttt	2400
tttgcgtatg	ttttgcactc	ttttgagttg	taatcatatg	tgtctttata	gatgtacata	2460
cctccctgca	caaattgggg	ggaattttt	ttcatcactg	ggagtgtcct	tagtgtataa	2520
aaaccatgt	gttatatggc	ttcaagttgt	aaaaatgaaa	gtgactttaa	aagaaaatag	2580
gggatggtcc	aggatctcca	ctgataagac	tgtttttaa	taacttaagg	acctttgggt	2640
ctacaaggat	atgtgaaaaa	aatgagactt	actgggtgag	gaaatccatt	gtttaaagat	2700
ggtcgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgttg	tgtgtgttt	tgtttttaa	2760	
gggagggaat	ttattattta	ccgttgcttgc	aaattactgt	gtaaatataat	gtctgataat	2820
gatgttgcct	ttgacaacta	aaattaggac	tgtataagta	ctagatgcat	cactgggtgt	2880
tgtatctaca	agatattgtat	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 Cys Ala Leu Pro Val
 85 90 95
 Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly
 100 105 110
 Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro
 115 120 125
 Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro
 130 135 140
 Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe
 145 150 155 160
 Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg
 165 170 175
 Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro 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

<212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

5

agctgggta	aggagttcaa	ggcagcgccc	acacccgggg	gctctccgca	acccgaccgc	60
ctgtccgctc	ccccacttcc	cgccctccct	cccacctact	cattcaccca	cccacccacc	120
cagagccggg	acggcagccc	aggcccccgg	gccccggcgt	ctccctcgccg	cgatccctgga	180
cttcctcttg	ctgcaggacc	cggttccac	gtgtgtcccg	gagccggcgt	ctcagcacac	240
gctccgctcc	gggcctgggt	gcctacagca	gccagagcag	cagggagtcc	gggacccggg	300
cggcacatcg	gccaagttag	gcccggcga	ggccagcgct	gaacgtctcc	agggcccggag	360
gagcccgccc	gcgtccgggt	ctgagccga	gcaaattgggc	tccgacgtgc	gggacctgaa	420
cgcgcgtctg	cccgccgtcc	cctccctggg	tggcggcggc	ggctgtccc	tgcctgtgag	480
cggcgcggcg	cagtgggcgc	cggtgtgtt	cttgcgcggc	ccgggcgcgtt	cggttacgg	540
gtcggtggc	ggcccccggc	cgccacccggc	tccgcccggca	ccccccggc	cgccgcctca	600
cttcctcatac	aaacaggagc	cgagctgggg	cgccgcggag	ccgcacaggag	agcagtgcct	660
gagcccttc	actgtccact	tttccggcca	gttcaactggc	acagccggag	cctgtcgcta	720
cgggcccttc	ggtcctccctc	cgcccagcca	ggcgtcatcc	ggccagggca	ggatgttcc	780
taacgcgccc	tacctgccc	gctgcctcga	gagccagccc	gctattcga	atcagggta	840
cagcacggc	accttcgacg	ggacgcccag	ctacggtcac	acgcctcgc	accatgcggc	900
gcagttcccc	aaccactcat	tcaagcatga	ggatcccatg	ggccagcagg	gctcgctggg	960
tgagcagcag	tactcggtc	cgcccccgt	ctatggctgc	cacacccca	ccgacagctg	1020
caccggcagc	caggcttgc	tgctgaggac	gccctacagc	agtacaatt	tataccaaat	1080
gacatcccag	tttgaatgca	tgacctggaa	tcagatgaac	tttagagcca	ccttaaaggg	1140
agttgctgt	gggagctcca	gctcagtgaa	atggacagaa	gggcagagca	accacagcac	1200
agggtacgag	agcgataacc	acacaacgcc	catcctctgc	ggagcccaat	acagaataca	1260
cacgcacgg	gtcttcagag	gcattcagga	tgtgcgacgt	gtgcctggag	tagccccgac	1320
tcttgacgg	tcggcatctg	agaccagtga	gaaacgcccc	ttcatgtgt	cttacccagg	1380
ctgcaataag	agatattttt	agctgtccca	tttacagatg	cacagcagga	agcacactgg	1440
tgagaaaacca	taccagtgt	acttcaagga	ctgtgaacga	aggtttctc	gttcagacca	1500
gctcaaaaga	caccaaaggaa	gacatacagg	tgtgaaacca	ttccagtgt	aaacttgtca	1560
gcgaaagttc	tcccggtccg	accacctgaa	gaccacaccc	aggactcata	caggtaaaaa	1620
gcccttcagc	tgtcggtggc	caagttgtca	gaaaaagttt	gcccggtcag	atgaattagt	1680
ccgcatcac	aacatgcata	agagaaacat	gaccacactc	cagctggcgc	tttgagggt	1740
ctccctcg	gaccgttca	tgtcccaggc	agcacagtgt	gtgaactgct	ttcaagtctg	1800
actctccact	cctcctcact	aaaaaggaaa	cttcagtgt	tcttcttcat	ccaaacttcca	1860
agacaagata	ccgggtcttc	tggaaactac	caggtgtgcc	tggaaagagtt	ggctctgtcc	1920
ctgcctactt	ttagttgact	cacaggccct	ggagaagcag	ctaacaatgt	ctggttagtt	1980
aaaagccat	tgccatttgg	tgtggatttt	ctactgtaa	aagagccata	gctgatcatg	2040
tccccctgac	ccttcccttc	ttttttatg	ctcgtttgc	ctggggatgg	aattattgt	2100
ccattttcta	tcatgaaata	ttttagggcc	agggcatgt	tatgtgtct	ctaattgtaaa	2160
ctttgtcatg	gtttccattt	actaacagca	acagcaagaa	ataaattcaga	gagcaaggca	2220
tcgggggtga	atcttgctta	acattcccga	ggtcagccag	gctgctaacc	tggaaagcag	2280
gatgtgttc	tgccaggca	ctttttaaagc	tcatgcattt	caagcagctg	aagaaaaaaat	2340
cagaactaac	cagtacact	gtatagaaat	ctaaaagaat	tttaccattc	agttattca	2400
atgtgaacac	tggcacact	ctcttaagaa	actatgaaga	tctgagattt	ttttgtgtat	2460
gtttttgact	cttttgatgt	gtaatcatat	gtgtctttat	agatgtacat	acctccttgc	2520
acaaatggag	gaaaattcat	tttcatcact	gggaggtgtcc	ttagtgtata	aaaaccatgc	2580
tggtatatgg	cttcaagttt	taaaaatgaa	agtgacttta	aaagaaaaata	ggggatggc	2640
caggatctcc	actgataaga	ctgtttttaa	gtaacttaag	gaccttggg	tctacaagta	2700
tatgtgaaaa	aaatgagact	tactgggtga	gaaaatccat	tgtttaaaga	tggcgtgt	2760
tgtgtgtgt	tgtgtgtgt	tgtgtgtt	gtgtgtgtt	ttgttttttta	agggaggggaa	2820
tttatttattt	accgttgctt	gaaattactg	tgtaaatata	tgtctgataa	tgatttgctc	2880
tttgacaact	aaaatttagga	ctgtataagt	actagatgca	tcactgggt	ttgatcttac	2940
aagatattga	tgataacact	taaaattgt	acctgcattt	ttcacttgc	tctcaattaa	3000
agtctattca	aaaggaaaaaa	aaaaaaa				3028

<210> 14

<211> 514

10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

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

agctgggtta	aggagttcaa	ggcagcgccc	acaccgggg	gctctccgca	acccgacgc	60
ctgtccgctc	ccccacttcc	cgccctccct	cccacctact	cattcaccca	cccacccacc	120
cagagccggg	acggcagccc	aggcgcggg	gccccgcgg	ctcctcgccg	cgatcttgaa	180
cttccttctt	ctgcaggacc	cggcttccac	gtgtgtcccg	gagccggcgt	ctcagcacac	240
gctccgctcc	gggcctgggt	gcctacagca	gccagagcag	caggagatcc	gggacccggg	300
cggcatctgg	gccaagttag	gcccgcgcga	ggccagcgct	gaacgtctcc	agggccggag	360
gagccgcggg	gcgtccgggt	ctgagccgca	gcaaattgggc	tccgacgtgc	gggacctgaa	420
cgcgcgtctg	cccgccgtcc	cctccctggg	tggcggcggc	ggctgtgccc	tgcctgtgag	480
cggcgccggc	cagtggggcgc	cgggtctgga	cttgcgcgg	ccggcgctt	cggcttacgg	540
gtcggtggc	ggcccccgcgc	cgcacccggc	tccgcgcga	cccccgccgc	cgcgcctca	600
ctccttcatc	aaacaggagc	cgagctgggg	cgccgcggag	ccgcacgagg	agcagtgcct	660
gagcgccttc	actgtccact	tttccggcca	gttcaactggc	acagccggag	cctgtcgcta	720
cggggcccttc	ggtccctctc	cgcccagcca	ggcgtcatcc	ggccagggcca	ggatgtttcc	780
taacgcgccc	tacctgcca	gtgcctcga	gagccagccc	gctattcgca	atcagggtta	840
cagcacggtc	acatttcgacg	ggacgcccag	ctacggtcac	acgcctcgc	accatgcggc	900
gcagttcccc	aaccactcat	tcaagcatga	ggatcccatg	ggccagcagg	gctcgctggg	960
tgagcagcag	tactcggtc	cgcggccgg	ctatggctgc	cacaccccca	ccgacagctg	1020
caccggcagc	caggcttgc	tgctgaggac	gccctacagc	agtgacaatt	tataccaaat	1080
gacatccca	cttgaatgca	tgacactggaa	tcagatgaac	ttaggagcca	ccttaaagg	1140
agttgctgct	gggagctca	gctcaactgaa	atggacagaaa	ggcagagca	accacagcac	1200
agggtaacgag	agcgataacc	acacaacgccc	catcctctgc	ggagcccaat	acagaataca	1260
cacgcacgg	gtcttcagag	gcattcagga	tgtgcgacgt	gtgcctggag	tagcccccac	1320
tcttgcacgg	tcggcatctg	agaccagtga	gaaacgcggcc	ttcatgtgt	cttacccagg	1380
ctgcaataag	agatatttt	agctgtccca	cttacagatg	cacagcagga	agcacactgg	1440
tgagaaacca	taccagtgt	acttcaagga	ctgtgaacga	aggtttctc	gttcagacca	1500
gctcaaaaaga	caccaaaggaa	gacatacagg	tgtgaaacca	ttccagtgt	aaacttgca	1560
gcgaaagttc	tcccggtccg	accacctgaa	gaccacacc	aggactata	caggtaaaac	1620
aagtgaaaag	cccttcagct	gtcgggtggcc	aagttgtcag	aaaaagttt	cccggtcaga	1680
tgaattagtc	cgccatcaca	acatgcatca	gagaaacatg	accaaactcc	agctggcgct	1740
ttgaggggtc	tccctcgggg	accgttcagt	gtcccaggca	gcacagtgt	tgaactgctt	1800
tcaagtctga	ctctccactc	ctcctcacta	aaaaggaaac	ttcaattgtat	cttcttcatc	1860
caacttccaa	gacaagatac	cgggtcttct	ggaaactacc	aggtgtgcct	ggaagatgg	1920
gtctctgccc	tgcctacttt	tagttactc	acaggccctg	gagaagcagc	taacaatgtc	1980
tggtagtta	aaagcccatt	gccatttgg	gtggattttc	tactgttata	agagccatag	2040
ctgatcatgt	ccccctgacc	cttccttct	tttttatgc	tcgtttcgc	tggggatgga	2100
attattgtac	cattttctat	catgaaat	ttataggcca	ggcatgtgt	atgtgtctgc	2160
taatgtaaac	tttgcattt	ctaacagcaa	cagaagaaa	taaatcagag	2220	
agcaaggcat	cgggggtgaa	tcttgtctaa	cattcccgag	gtcagccagg	ctgctaacct	2280
ggaaagcagg	atgttagttc	gccaggcaac	ttttaaagct	catgcatttc	aagcagctga	2340
agaaaaaaatc	agaactaacc	agtacctctg	tatagaaatc	taaaaagatt	ttaccattca	2400
gttaattcaa	tgtgaacact	ggcacactgc	tcttaagaaa	ctatgaagat	ctgagattt	2460
tttgcgtatg	ttttgcgtc	ttttgagtgg	taatcatatg	tgtctttata	gatgtacata	2520
cctccttgca	caaatggagg	ggaatttcatt	ttcatcaactg	ggagtgtcct	tagtgtataa	2580
aaaccatgct	ggtatatggc	ttcaattgtt	aaaaatgaaa	gtgactttaa	aaaaaaatag	2640
gggatggtcc	aggatctca	ctgataagac	tgttttaag	taacttaagg	acctttgggt	2700
ctacaagtat	atgtaaaaaa	aatgagactt	actgggtgag	gaaatccatt	gtttaaagat	2760
ggtcgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	tgtttttttt	tgtttttttaa	2820
gggagggaaat	ttattattt	ccgttgctt	aaattactgt	gtaaatat	gtctgataat	2880
gatttgctct	ttgacaacta	aaattaggac	tgtataagta	ctagatgcatt	cactgggtgt	2940
tgatcttaca	agatattgtat	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 Gln Gly
 20 25 30
 Val Arg Asp Pro Gly Gly Ile Trp Ala Lys Leu Gly Ala Ala Glu Ala
 35 40 45
 Ser Ala Glu Arg Leu Gln Gly Arg Arg Ser Arg Gly Ala Ser Gly Ser
 50 55 60
 Glu Pro Gln Gln Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu
 65 70 75 80
 Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val
 85 90 95
 Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly
 100 105 110
 Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Ala Pro
 115 120 125
 Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro
 130 135 140
 Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe
 145 150 155 160
 Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg
 165 170 175
 Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln
 180 185 190
 Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser
 195 200 205
 Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly
 210 215 220
 Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro
 225 230 235 240
 Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu
 245 250 255
 Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr
 260 265 270
 Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Arg Thr Pro
 275 280 285
 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met
 290 295 300
 Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala
 305 310 315 320
 Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser
 325 330 335
 Thr Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala
 340 345 350
 Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val
 355 360 365
 Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu
 370 375 380
 Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys
 385 390 395 400
 Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr
 405 410 415
 Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe
 420 425 430
 Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val
 435 440 445
 Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp
 450 455 460
 His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys

465	470	475	480												
Pro	Phe	Ser	Cys	Arg	Trp	Pro	Ser	Cys	Gln	Lys	Lys	Phe	Ala	Arg	Ser
															495
Asp	Glu	Leu	Val	Arg	His	His	Asn	Met	His	Gln	Arg	Asn	Met	Thr	Lys
															510
Leu	Gln	Leu	Ala	Leu											
															515

<210> 17
 <211> 2438

5 <212> DNA
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

aggcgctttc	accactgccc	ctccgggggg	gacctgaagg	agagggtttg	aggccggct	60
ttgcccggcc	aggctctgcgt	gtccggctcg	ggaggaggcc	taggaggct	cgccggccac	120
gggcatccctt	gggccccgagt	tctgggggtgc	ggacggacgt	ctcgagagtg	gtgcccgcga	180
ctcgggacccc	acggccctcg	ccgggcacgg	acagttgcgg	agcagggctc	tgaggattgt	240
gcagtgcctt	gggtccctgc	ctactcctgg	gctcaggaat	ggagaagggt	tacagcacgg	300
tcacccctcga	cgggacgccc	agctacggtc	acacgcccctc	gcaccatgcg	gcmcagttcc	360
ccaaccactc	attcaagcat	gaggatccca	tgggcccagca	gggctcgctg	gttgagcagc	420
agtactcggt	gcccggccccc	gtctatggct	gccacaccccc	caccgacagc	tgccaccggca	480
gccaggcttt	gctgctgagg	acgcccata	gcagtgcacaa	tttataccaa	atgacatccc	540
agcttgaatg	catgacactgg	aatcagatga	actttaggagc	caccttaaag	ggccacagca	600
cagggtacga	gagcgataac	cacacaacgc	ccatccctcg	cggagccaa	tacagaatac	660
acacgcacgg	tgtcttcaga	ggcattcagg	atgtgcgacg	tgtgcctgga	gtagccccga	720
ctcttgcacg	gtcggcatct	gagaccagtg	agaaaacgccc	cttcatgtgt	gcttacccag	780
gctgcaataa	gagatatttt	aagctgtccc	acttacagat	gcacagcagg	aagcacactg	840
gtgagaaaacc	ataccagtgt	gacttcaagg	actgtgaacg	aaggtttct	cgttcagacc	900
agctcaaaag	acaccaaagg	agacatacag	gtgtgaaacc	attccagtgt	aaaacttgc	960
agcgaaagtt	ctcccggtcc	gaccacctga	agacccacac	caggactcat	acaggtaaaa	1020
caagtgaaaaa	gcccttcagc	tgtcggtggc	caagttgtca	aaaaaagttt	gccccggctag	1080
atgaattagt	ccgccccatcac	aacatgcac	agagaaacat	gaccaaactc	cagctggcgc	1140
tttgagggggt	ctccctcggt	gaccgttcag	tgtcccaggc	agcacagtgt	gtgaactgct	1200
ttcaagtctg	actctccact	cctcctcact	aaaaaggaaa	cttcagttga	tcttcttcat	1260
ccaaacttcca	agacaagata	cgggtgcctc	tggaaaactac	cagggtgtcc	tggaagagtt	1320
ggtctctgcc	ctgcctactt	ttagttgact	cacaggccct	ggagaagcag	ctaacaatgt	1380
ctggtagtt	aaaagcccat	tgccatttgg	tgtggatttt	ctactgtaag	aagagccata	1440
gctgatcatg	tccccctgac	ccttccttc	ttttttatg	ctcgtttctg	ctggggatgg	1500
aattatttga	ccattttcta	tcatgaaata	tttataaggcc	agggcatgtg	tatgtgtctg	1560
ctaattgtaaa	ctttgtcatg	gtttccattt	actaacagca	acagcaagaa	ataaatcaga	1620
gagcaaggca	tccccgggtga	atcttgccta	acattcccga	ggtcagccag	gctgctaacc	1680
tggaaagcag	gatgttagttc	tgccaggcaa	cttttaaagc	tcatgcattt	caagcagctg	1740
aagaaaaaaat	cagaactaac	cagtacctct	gtatagaaat	ctaaaagaat	tttaccattc	1800
agttaattca	atgtgaacac	tggcacactg	ctcttaagaa	actatgaaga	tctgagattt	1860
ttttgtgtat	tttttgact	ctttttagt	gtaatcatat	gtgtctttat	agatgtacat	1920
accccttgc	acaaatggag	gggaattcat	tttcatcact	gggagtgtcc	ttagtgtata	1980
aaaaccatgc	tggtatatgg	cttcaagtt	taaaaatgaa	agtacttta	aaagaaaata	2040
ggggatggtc	caggatctcc	actgataaga	ctgtttttaa	gttaacttaag	gacctttggg	2100
tctacaagta	tatgtaaaaa	aatgagact	tactgggtga	ggaaatccat	tgtttaaaga	2160
tggtcgtgt	tgtgtgtgt	tgtgtgtgt	tgtgtgtgtt	gtgtgtgtt	ttgtttttta	2220
agggagggaa	tttattattt	accgttgctt	gaaattactg	tgtaaatata	tgtctgataa	2280
tgatttgctc	tttgacaact	aaaatttagga	ctgtataagt	actagatgca	tcactgggt	2340
ttgatcttac	aaagatattga	tgataacact	taaaaattgt	acctgcattt	ttcactttgc	2400
tctcaattaa	agtcttattca	aaagggaaaaa	aaaaaaa			2438

10 <210> 18
 <211> 288
 <212> PRT
 15 <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								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	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							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							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

aggcgcttc	accactgcc	ctccgggg	gacctaagg	agagggttg	aggccgtct	60
ttgcccggc	aggctgcgt	gtccgtctg	ggaggaggcc	taggagggt	cgcggccac	120
gggcatecctt	gggcccgg	tctgggtgc	ggacggacgt	ctcgagagt	ggtccccgca	180
ctcgggaccc	acggccctcg	ccgggcacgg	acagttgcgg	agcagggctc	tgaggattgt	240
gcagtgcctt	gggtccctgc	ctactcctgg	gctcaggaat	ggagaagggt	tacagcacgg	300
tcacccctcg	cgggacgccc	agctacggc	acacgcctc	gcaccatgcg	gcccagttcc	360
ccaaaccactc	atcaggcat	gaggatccc	tggggcagca	gggctcgctg	gttgagcagc	420
agtactcggt	gcccggcccg	gtctatggct	gccacacccc	caccgcacgc	tgccacggca	480
gccaggctt	gtctgtgagg	acgcctaca	gcagtacaa	tttataccaa	atgcacatccc	540
agcttgaatg	catgacctgg	aatcagatga	acttaggagc	caccttaaag	ggagttgtcg	600
ctgggagctc	cagctcagtg	aaatggacag	aagggcagag	caacccacgc	acagggtacg	660
agagcgataa	ccacacaacg	cccatccct	gccccggccca	atacagaata	cacacgcacg	720
gtgtcttcag	aggcattca	gatgtgcac	gtgtgcctgg	agtagccccg	actcttgtac	780
ggtcggcattc	tgagaccagt	gagaaacgc	ccttcatgtg	tgcttaccca	ggctgcaata	840
agagatattt	taagctgtcc	cacttacaga	tgcacagcag	gaagcacact	gttgagaaac	900
cataccagt	tgacttcaag	gactgtgaac	gaagggtttc	tcgttcagac	cagctaaaa	960
gacaccaaa	gagacataca	ggtgtaaac	cattccagtg	taaaacttgt	cagcgaaagt	1020
tctccggc	cgaccacact	aagacccaca	ccaggactca	tacagggtaa	aagcccttca	1080
gctgtcggt	gccaagttgt	cagaaaaaa	ttggccggc	agatgaatta	gtccgcacatc	1140
acaacatgc	tcagagaaac	atgaccaac	tccagctggc	gctttgaggg	gtctccctcg	1200
gggaccgttc	agtgtccca	gcagcacagt	gtgtgaactg	cttcaagtc	tgactctcca	1260
ctcctccctca	ctaaaaagga	aacttcagtt	gatcttcttc	atccaaacttc	caagacaaga	1320
taccgggt	tctggaaact	accaggtgt	ccttggaaagag	ttggtctctg	ccctgcctac	1380
tttttagtt	ctcacaggcc	ctggagaagc	agctaacaat	gtctgggttag	ttaaaagccc	1440
attggcattt	ggtgtggatt	ttctactgt	agaagagc	tagtgcata	tgtccccctg	1500
accctccct	tcttttttta	tgctcg	tttgcgtttt	cgctggggat	ggaatttattg	1560
tatcatggaa	tatttatagg	ccagggcat	tgtatgtgtc	tgctaatgt	aactttgtca	1620
tggttccat	ttactaaacag	caacagcaag	aaataaatca	gagagcaagg	catcgggggt	1680
gaatcttgc	taacattccc	gaggtcagcc	aggctgc	ccttggaaagc	aggatgtagt	1740
tctccaggc	aactttaaa	gctcatgc	ttcaagc	tgaagaaaa	atcagaacta	1800
accagtac	ctgtatagaa	atctaaaaga	attttaccat	tcagttatt	aatgtgaac	1860
actggcacac	tgctcttaag	aaactatgaa	gatctgagat	ttttttgtgt	atgttttga	1920
ctcttttgc	ttgtatcat	atgtgtctt	atagatgtac	ataccctt	gcacaaatgg	1980
aggggaattc	attttcatca	ctgggagtgt	ccttagtgt	taaaaaccat	gctggat	2040
ggcttc	aaagtgtact	taaaaagaaaa	tagggatgg	tccaggatct	2100	
ccactgataa	gactgtttt	aagtaactta	aggacctt	ggtctacaag	tatatgtgaa	2160
aaaaatgaga	cttactgggt	gaggaaatcc	attgtttaaa	gatgtcg	tgtgtgt	2220
tgtgtgtgt	tgtgtgtgt	ttgtgtgt	ttttgtttt	taaggaggg	aatttattat	2280
ttaccgttgc	ttgaaattac	tgtgtaaata	tatgtctgt	aatgattgc	tctttgacaa	2340
ctaaaattag	gactgtataa	gtactagat	catcaactgg	tgttgcatt	acaagatatt	2400
gatgataaca	ctaaaattg	taacctgc	ttttactt	gctctcaatt	aaagtctatt	2460
caaaaggaaa	aaaaaaaaaa					2480

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

10 <400> 20

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

275 280 285
 Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu
 290 295 300

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

10 <400> 21

tgtgtgaatg	gagcggccga	gcatacctggc	tcctcctcct	tccctgctgc	cgccccctct	
tattttagct	ttggggaaagct	gggggcagcc	aggcagctgg	ggttaaggagt	tcaaggcagc	120
gccccacaccc	ggggctctcc	gcaaccggac	cgccctgcctg	ctccccctt	ccttttcccg	180
ccctccctcc	cacccactca	ttcaccacc	cacccagaga	gaggacggca	gcccaggaac	240
ccggggccgc	cgcctcctcg	ccgcgatcct	ggacttcctc	ctgtcgagg	agccggcttc	300
cacgtgtgtc	ccggagccgg	cgtctcagca	cacgctccgc	cgggagcccg	ggtgctgtcca	360
gcagcoggag	caacctgggg	accgagccc	cggagcgcc	tgggcaagt	ccagcgccga	420
gaatccgcag	gatcgagga	gcccggaaacc	gtccgcatcc	gagccgcacc	tcatgggttc	480
cgacgtgcgg	gacctaaccg	cgctgtgcc	cgctgtgtct	tcgctggcg	gcccggccgg	540
cggtgtcggt	ctccctgtga	gcccgcagc	gcagtggcg	cccgtttgg	acttcgcgcc	600
tccggggcgc	tcggcttacg	gttcgtggg	cgttcccgg	cctcctcccg	ctccgcggcc	660
gcctccgcgc	ccacccact	ccttcataa	acaggagccc	agctgggcg	gcccggagcc	720
acacgaggag	cagtgcctga	gccccttcac	cttgcacttc	tcgggcaagt	tcaccgggtac	780
agccggggcc	tgtcgctacg	gacccttcgg	tcctcccccg	cccagccagg	cgtcctcggt	840
ccaggccagg	atgttcccca	atgcgccta	cctgcccagg	tgcctggaga	gcccggctac	900
catccgcaac	caaggataca	gcacggtcac	tttgcacggg	gcccggcaigt	atggccacac	960
gccctcgcat	cacgcggcgc	agttcccaa	ccatttcctc	aaacacgagg	acccatggg	1020
ccagcagggc	tcgctggcg	agcagcagta	ctccgtgcca	cctccgggt	atggctgcca	1080
cacccctact	gacagtgtca	caggcagcca	ggccctgctc	ctgaggacgc	cctacagcag	1140
tgacaattt	taccaaattga	ccttcccaact	tgaatgcatg	acctggaaatc	agatgaacct	1200
aggagctacc	ttaaagggaa	ttggctgtgg	gagctccagg	tcagtgaat	ggacagaagg	1260
gcagagcaac	cacggcacag	ggtatgagag	tgagaaccac	acggccccc	tcctctgtgg	1320
tgcccagttac	agaatatacca	cccacgggt	cttccgaggc	attcaggatg	tgccggcggt	1380
atctggagt	gcccccaact	ttgtccggc	agcatctgaa	accagtggaa	aacgtccctt	1440
catgtgtgca	tacccaggct	gcaataaagag	atattttaaag	ctgtcccaact	tacagatgca	1500
tagccggaaag	cacactgggt	agaaaccata	ccagtgtgac	ttcaaggact	gcccggaaag	1560
gttttctcg	tcagaccaggc	tcaaaagaca	ccaaaggaga	cacacagg	tggaaaccatt	1620
ccagtgtaaa	actgtcagc	gaaagtttt	ccgggtccgac	catctgaaga	cccacaccag	1680
gactcataca	gttaaaaacaa	gtgaaaagcc	cttcagctgt	cggtggcaca	gttgcagaa	1740
aaagtttgcg	cgctcagacg	aattggtccg	ccatcacaac	atgcatcaga	gaacatgac	1800
caaactccag	ctggcgcttt	gaggggtccg	acacggagac	agtccagcat	cccaggcagg	1860
aaagtgtca	aactgcttcc	aatctgtatt	ttgaaattcc	tcccactcac	ctttcaaaagg	1920
acacgactgt	ggatctacat	ccgacttcca	agacagcaca	cctgattgac	tgcatcctat	1980
cagggttgcc	ggaaggagtc	ggtgtccgc	ccactttga	ttaactcaca	ggcctgaaaa	2040
aagtggttca	cggtgtctag	aaagtccatt	gctattgtct	gaattttcta	ctgttagaag	2100
aaccattgtt	gataatgccc	cccgcccccc	ccccccgggtt	tcctctctc	cttgtgtatc	2160
atttcccccag	gattagagag	actgttacat	tttctttcat	gggatattta	taggcccagg	2220
catgtgtatg	tgcctgtctaa	tgtaaactct	gtcatagttc	ccatttacta	actgcctctag	2280
aaagaaataaa	atcagagagc	aaggcaccag	gggcaagaat	cgtgcagaat	ttcagaggc	2340
tggctgaaa	cctggaaacc	tggaaaggcca	gatgtattc	tacaggcgat	tgttaaagct	2400
cataggttt	gatgtactgc	atagtaggtt	ggtattaact	agaactccgt	tatagttagg	2460
acagagagga	gccttcctgc	ttagcttattc	actctgaaca	ctagcaactgg	gctcttaaga	2520
aatgatgttt	taagagcaga	gatcttttt	taatgtctt	gatttatttt	ttagttgtaa	2580
ttaggtacat	cctcagagat	gtactttcct	cctcttgc	aggatgtgg	ggactcagtt	2640
ccatcatctg	gggcacatctt	agagtgtata	gaccacactg	gttatgtggc	tcaaggttgt	2700
aaaaattaaa	atgactttaa	aagaaactag	gggctggtcc	aggatctca	ctggtaagac	2760
tgttcttaag	taacttaagt	atctttaat	ctgcaagtat	gtagggaaaa	aaaaaaagata	2820
tattattgt	aggaaatcca	ttgtttaaag	gtgtcggt	gttgttgg	ttttttaaag	2880
ggagggagtt	tattattac	tgtagcttga	aatactgtgt	aaatataat	gtatataat	2940
gatgtgtct	ttgtcaacta	aaatttaggag	gttatggta	ttagctgc	cactgtgtgg	3000
atgtcaatct	tacagtgtat	tgatgataat	actaaaaatg	taacctgc	cttttccac	3060
ttggctgtca	attaaagtct	attcaaaaagg	aa			3092

<210> 22
<211> 517
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 22

Met Asp Phe Leu Leu Ser Gln Glu Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu
 1 5 10 15
 Pro Ala Ser Gln His Thr Leu Arg Arg Glu Pro Gly Cys Val Gln Gln
 20 25 30
 Pro Glu Gln Pro Gly Asp Arg Gly Pro Arg Ser Ala Trp Ala Lys Ser
 35 40 45
 Ser Ala Glu Asn Pro Gln Asp Arg Arg Ser Gly Glu Pro Ser Ala Ser
 50 55 60
 Glu Pro His Leu Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu
 65 70 75 80
 Pro Ala Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Gly Cys Gly Leu Pro
 85 90 95
 Val Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro
 100 105 110
 Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala
 115 120 125
 Pro Pro Pro Pro Pro 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 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 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 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	Gly Lys Thr Ser Glu Lys	
465	470	475	480
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

ggcaggcgtct	ccaccccccac	ttcccaattg	aggaaaaccga	ggcagaggag	gctcagagag
ctaccggtgg	accacggtg	cctccctccc	tggatctac	acagaccatg	gccttgccaa
cggctcgacc	cctgtgggg	tcctgtggga	ccccgcct	cggcagcctc	ctgttcctgc
tcttcagcct	cgatgggtg	cagccctcga	ggaccctggc	tggagagaca	ggcaggagg
ctgcgcccc	ggacggagtc	ctggccaaacc	cacctaacat	ttccagcctc	tccctcgcc
aactccttg	cttcccgtgt	gcggaggtgt	ccgcctgag	cacggagcgt	gtccgggagc
tggctgtggc	cttgcacag	aagaatgtca	agctctcaac	agagcagctg	cgctgtctgg
ctcaccggct	ctctgagccc	cccgaggacc	tggacgccct	cccattgjac	ctgctgctat
tcctcaaccc	agatgcgttc	tcggggccccc	aggcctgcac	ccgtttcttc	tcccgcatca
cgaaggccaa	tgtggacctg	ctcccggaggg	gggctcccga	gcgacagcgg	ctgctgcctg
cggctctggc	ctgctgggt	gtgcgggggt	ctctgctgag	cgaggctgtat	gtcggggctc
tgggaggcct	ggcttgcac	ctgcctggc	gctttgtggc	cgagtcgccc	gaagtgtcgc
taccccggtc	ggtgagctgc	ccgggacccc	tggaccagga	ccagcaggag	gcagccagg
cggctctgca	gggcggggga	ccccccctacg	gccccccgtc	gacatggct	gtctccacga
tggacgcctt	gcggggcctg	ctgcccgtgc	tggccagcc	catcatccgc	agcatccgc
agggcatctg	ggccgcgtgg	cggcaacgt	cctctggga	cccatctgg	cggcagcctg
aacggaccat	cctccggccg	cggttccggc	ggaaagtgg	gaagacagcc	tgtcttcag
gcaagaaggc	ccgcgagata	gacgagagcc	tcatcttcta	caagaagtgg	gagctggaa
cctgcgtgg	tgccggccctg	ctggccaccc	agatggaccg	cgtgaaccc	atccccctca
cctacgagca	gctggacgtc	ctaaagcata	aactggatga	gctctaccca	caaggttacc
ccgagtctgt	gatccagcac	ctgggctacc	tcttcctcaa	gatgagccct	gaggacatc
gcaagtggaa	tgtgacgtcc	ctggagaccc	tgaaggctt	gcttgaagtc	aacaaaggc
acgaaattag	tcctcagggt	gccaccctga	tcgaccgctt	tgtgaaggg	agggccagc
tagacaaaaga	caccctagac	accctgaccc	ccttctaccc	tggttacctg	tgctccctca
gccccggagga	gctgagctcc	gtgccccca	gcagcatctg	ggcggtcagg	ccccaggacc
tggacacgtg	tgacccaagg	cagctggacg	tcctctatcc	caaggcccgc	cttgctttcc
agaacatgaa	cgggtccgaa	tacttcgtga	agatccagtc	tttcctgggt	ggggccccca
cggaggattt	gaaggcgctc	agttagcaga	atgtgagcat	ggacttgccc	acgttcatga
agctgcggac	ggatgcggtg	ctgcccgtga	ctgtggctga	ggtcagaaaa	cttctgggac
cccacgtgga	gggcctgaag	gcggaggagc	ggcaccgccc	ggtcgggac	tggatcctac
ggcagcggca	ggacgcacctg	gacacgcgtgg	ggctggggct	acagggcggc	atcccccaacg
gctaccttgt	cctagacctc	agcatgcag	agggcctctc	ggggaccccc	tgcctcttag
gacctggacc	tgttctcacc	gtccctggac	tgctccctagc	ctccaccctg	gcctgagg
cccactccct	tgctggcccc	agccctgctg	ggatccccg	cctggccagg	agcaggcagc
ggtggtcccc	gttccacccc	aagagaactc	gcgctcagta	aacgggaaca	tgccccctgc
agacacgtaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaa	aaaaaaa	aaaaaaa	2126

10

<210> 24

<211> 622

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

Met	Ala	Leu	Pro	Thr	Ala	Arg	Pro	Leu	Leu	Gly	Ser	Cys	Gly	Thr	Pro
1				5					10					15	
Ala	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Gly	Trp	Val	Gln
			20					25					30		

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
 35 40 45
 Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg
 50 55 60
 Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu
 65 70 75 80
 Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
 85 90 95
 Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
 100 105 110
 Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Phe Leu Asn Pro
 115 120 125
 Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
 130 135 140
 Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln
 145 150 155 160
 Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
 165 170 175
 Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
 180 185 190
 Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
 195 200 205
 Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg
 210 215 220
 Ala Ala Leu Gln Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp
 225 230 235 240
 Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly
 245 250 255
 Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg
 260 265 270
 Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile
 275 280 285
 Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser
 290 295 300
 Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys
 305 310 315 320
 Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met
 325 330 335
 Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu
 340 345 350
 Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val
 355 360 365
 Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile
 370 375 380
 Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu
 385 390 395 400
 Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp
 405 410 415
 Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr
 420 425 430
 Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu
 435 440 445
 Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp
 450 455 460
 Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala
 465 470 475 480
 Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile
 485 490 495
 Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser
 500 505 510
 Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr
 515 520 525
 Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly

530	535	540
Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg		
545 550 555 560		
Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu		
565 570 575		
Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser		
580 585 590		
Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro		
595 600 605		
Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala		
610 615 620		

<210> 25

<211> 2187

5 <212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

tgccaggctc tccaccccca cttcccaatt gaggaaaccg aggtagagga ggctcagcgc	60
cacgcactcc tctttctgcc tggccggcca ctccccgtctg ctgtgacgcgc cggacagaga	120
gctaccggtg gaccacacggt gcctccctcc ctggatcta cacagaccat ggccttgcca	180
acggctcgac ccctgttggg gtcctgtggg acccccgcgc tcggcagcct cctgttccctg	240
ctcttcagcc tcggatgggt gcagccctcg aggaccctgg ctggagagac agggcaggag	300
gctgcgcggcc tggacggagt cctggccaac ccacctaaca ttccacgcct ctcccctcgc	360
caactcccttg gttccctgtg tgccggaggtg tccggcctgt gcacggagcg tgcggggag	420
ctggctgtgg ctttggcaca gaagaatgtc aagctctcaa cagacgcgc tgcgtgtctg	480
gctcaccggc tctctgagcc ccccgaggac ctggacgcgc tcccattggc cctgtgtcta	540
ttcctcaacc cagatgcgtt ctcggggccc caggcctgca cccgtttctt ctcccgcac	600
acgaaggcca atgtggaccc gtcggcggagg ggggctcccg agcgcacagcg gctgtgcct	660
gcggctctgg cttctgtggg tttctgtgtc gcgaggctga tgcggggct	720
ctggggaggcc tggcttgca cctgcctggg cgctttgtgg ccgagtcggc cgaagtgcgt	780
ctaccccgcc tggtgagctg cccgggaccc ctggaccagg accagcagga ggcagccagg	840
gcggctctgc agggcgggggg acccccctac ggcccccccg cgcacatggc tgcggccac	900
atggacgcctc tgcggggccct gctggccctg ctggggccagg cccatcatccg cagcatcccc	960
cagggcattcg tggccgcgtg gcggcaacgc tccctctcg acccatctcg gcggcagcct	1020
gaacggacca tccctccggcc gcgggtccgg cggggaaatgg agaagacagc ctgtccttca	1080
ggcaagaagg cccgcgagat agacggagac ctcatcttca acaagaatgt ggagctggaa	1140
gcctgcgtgg atgcccggccct gctggccacc cagatggacc gcgtgaacgc catcccttc	1200
acctacgacg acgtggacgt ctcctaaatgc aactggatg agctctaccc acaagggttac	1260
cccgagatctg tgcgtccatc cctggcttca agatggccctt tgaggacatt	1320
cgcaagatgg atgtggacgtc cctggagacc ctgaaggctt tgctgtggaaatgg	1380
cacgaaatgtc tgccttcagg ggcggccctg atcgacccgtt ttgtgtgggg aaggggccag	1440
ctagacaaatgg acaccctaga caccctgacc gccttctacc ctgggttaccc tgcgtccctc	1500
agcccccgggg agctggacgt cgtggggggcc accgcacatct gggccgtcag gccccaggac	1560
ctggacacgt gtggacccaa gcaatggac gtcctctatc ccaaggccccg cttgtcttc	1620
cagaacatgtc acgggtcccgaa atacttcgtt aatgcgttccgtt ctttcttggg tgggggggg	1680
acggaggatgtt gtaaggcggtt cgttcgttccgtt aatgtggatggc tggacttggc cacgttcat	1740
aagctgcggc cggatgcgtt gtcggccgtt actgtggctt aggtgcagaa acttctggaa	1800
ccccacgtgg agggcctgtt ggcggaggag cggcaccggcc cgggtggggca ctggatcttca	1860
cggcggccggc aggacgcaccc ggacacgcgtt gggctggggc tacaggccgg catccccaa	1920
ggctacccctgg tcccttagaccc tgcgttccatc gaggccctt cggggacgcgc ctgccttca	1980
ggacccctggac ctgttcttccac cgtccctggca ctgttccatc cttccacccctt ggcctgggg	2040
ccccactccctt tgcgtggccc cagccctgtt ggggatcccc gcctggccag gaggcaggac	2100
gggtgttccccc ctgttccaccc caagagaact cgcgttccatc aaacggggaaatgcggccctt	2160
10 cagacacgtt aaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaa	2187

<210> 26

<211> 622

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

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

1	5	10	15													
Ala	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Gly	Trp	Val	Gln	
				20				25					30			
Pro	Ser	Arg	Thr	Leu	Ala	Gly	Glu	Thr	Gly	Gln	Glu	Ala	Ala	Pro	Leu	
				35				40				45				
Asp	Gly	Val	Leu	Ala	Asn	Pro	Pro	Asn	Ile	Ser	Ser	Leu	Ser	Pro	Arg	
				50				55				60				
Gln	Leu	Leu	Gly	Phe	Pro	Cys	Ala	Glu	Val	Ser	Gly	Leu	Ser	Thr	Glu	
				65				70			75		80			
Arg	Val	Arg	Glu	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gln	Lys	Asn	Val	Lys	Leu	
				85				90			95					
Ser	Thr	Glu	Gln	Leu	Arg	Cys	Leu	Ala	His	Arg	Leu	Ser	Glu	Pro	Pro	
				100				105			110					
Glu	Asp	Leu	Asp	Ala	Leu	Pro	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Leu	Asn	Pro		
				115				120			125					
Asp	Ala	Phe	Ser	Gly	Pro	Gln	Ala	Cys	Thr	Arg	Phe	Phe	Ser	Arg	Ile	
				130				135			140					
Thr	Lys	Ala	Asn	Val	Asp	Leu	Leu	Pro	Arg	Gly	Ala	Pro	Glu	Arg	Gln	
				145				150			155		160			
Arg	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Leu	Ala	Cys	Trp	Gly	Val	Arg	Gly	Ser	Leu	
				165				170			175					
Leu	Ser	Glu	Ala	Asp	Val	Arg	Ala	Leu	Gly	Gly	Leu	Ala	Cys	Asp	Leu	
				180				185			190					
Pro	Gly	Arg	Phe	Val	Ala	Glu	Ser	Ala	Glu	Val	Leu	Leu	Pro	Arg	Leu	
				195				200			205					
Val	Ser	Cys	Pro	Gly	Pro	Leu	Asp	Gln	Asp	Gln	Gln	Glu	Ala	Ala	Arg	
				210				215			220					
Ala	Ala	Leu	Gln	Gly	Gly	Pro	Pro	Tyr	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Trp		
				225				230			235		240			
Ser	Val	Ser	Thr	Met	Asp	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	
				245				250			255					
Gln	Pro	Ile	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Gln	Gly	Ile	Val	Ala	Ala	Trp	Arg	
				260				265			270					
Gln	Arg	Ser	Ser	Arg	Asp	Pro	Ser	Trp	Arg	Gln	Pro	Glu	Arg	Thr	Ile	
				275				280			285					
Leu	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg	Arg	Glu	Val	Glu	Lys	Thr	Ala	Cys	Pro	Ser	
				290				295			300					
Gly	Lys	Lys	Ala	Arg	Glu	Ile	Asp	Glu	Ser	Leu	Ile	Phe	Tyr	Lys	Lys	
				305				310			315		320			
Trp	Glu	Leu	Glu	Ala	Cys	Val	Asp	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Gln	Met	
				325				330			335					
Asp	Arg	Val	Asn	Ala	Ile	Pro	Phe	Thr	Tyr	Glu	Gln	Leu	Asp	Val	Leu	
				340				345			350					
Lys	His	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Tyr	Pro	Gln	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ser	Val	
				355				360			365					
Ile	Gln	His	Leu	Gly	Tyr	Leu	Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Pro	Glu	Asp	Ile	
				370				375			380					
Arg	Lys	Trp	Asn	Val	Thr	Ser	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	
				385				390			395		400			
Val	Asn	Lys	Gly	His	Glu	Met	Ser	Pro	Gln	Val	Ala	Thr	Leu	Ile	Asp	
				405				410			415					
Arg	Phe	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	Gln	Leu	Asp	Lys	Asp	Thr	Leu	Asp	Thr	
				420				425			430					
Leu	Thr	Ala	Phe	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Leu	Cys	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Glu	
				435				440			445					
Leu	Ser	Ser	Val	Pro	Pro	Ser	Ser	Ile	Trp	Ala	Val	Arg	Pro	Gln	Asp	
				450				455			460					
Leu	Asp	Thr	Cys	Asp	Pro	Arg	Gln	Leu	Asp	Val	Leu	Tyr	Pro	Lys	Ala	
				465				470			475		480			
Arg	Leu	Ala	Phe	Gln	Asn	Met	Asn	Gly	Ser	Glu	Tyr	Phe	Val	Lys	Ile	
				485				490			495					
Gln	Ser	Phe	Leu	Gly	Gly	Ala	Pro	Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Ala	Leu	Ser	
				500				505			510					

Gln	Gln	Asn	Val	Ser	Met	Asp	Leu	Ala	Thr	Phe	Met	Lys	Leu	Arg	Thr
515							520					525			
Asp	Ala	Val	Leu	Pro	Leu	Thr	Val	Ala	Glu	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Gly
530							535					540			
Pro	His	Val	Glu	Gly	Leu	Lys	Ala	Glu	Glu	Arg	His	Arg	Pro	Val	Arg
545							550			555			560		
Asp	Trp	Ile	Leu	Arg	Gln	Arg	Gln	Asp	Asp	Leu	Asp	Thr	Leu	Gly	Leu
							565			570			575		
Gly	Leu	Gln	Gly	Gly	Ile	Pro	Asn	Gly	Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Leu	Ser
							580			585			590		
Met	Gln	Glu	Ala	Leu	Ser	Gly	Thr	Pro	Cys	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Pro
							595			600			605		
Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala		
							610			615			620		

<210> 27
<211> 2154

5 <212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

cgccacgcac	tccttttct	gcctggccgg	ccactcccg	ctgctgtgac	gcccggacag	60
agagctaccg	gtggaccac	gggcctccc	tccctggat	ctacacagac	catggccttg	120
ccaacggctc	gaccctgtt	ggggctctgt	gggacccccc	ccctcggcag	cctcctgttc	180
ctgctttca	gcctcggatg	ggtgcagccc	tgcaggaccc	tggctggaga	gacagggcag	240
gaggctgcgc	ccctggacgg	agtcttggcc	aacccaccta	acatttccag	cctctccct	300
cgccaaactcc	ttggcttccc	gtgtcggag	gtgtccggcc	tgagcacgga	gcgtgtccgg	360
gagctggctg	ttggcttggc	acagaagaat	gtcaagctct	caacagagca	gtcgctgt	420
ctggctcacc	ggctctctga	gccccccgag	gacctggacg	ccctccatt	ggacctgtct	480
ctattcctca	acccagatgc	gttctgggg	ccccaggccct	gcaccctgtt	cttctcccg	540
atcacgaagg	ccaatgtgta	cctgtcccc	aggggggctc	ccgagcgaca	gcggctgt	600
cctgcccgtc	ttggctgtcg	gggtgtgcgg	gggtctctgc	tgagcgaggc	tgatgtgcgg	660
gctctggag	gcctggcttg	cgacctgcct	gggcgcctttg	tggccgagtc	ggccgaagt	720
ctgctacccc	ggctgggtgag	ctgcccggga	ccccctggacc	aggaccagca	ggaggcagcc	780
agggcggctc	tgcagggcgg	gggacccccc	tacggccccc	cgtcgacatg	gtctgtctcc	840
acgatggacg	ctctgcccc	cctgtgtcccc	gtgctggggcc	agcccatcat	cccgagcattc	900
ccgcaggcga	tcgtggccgc	gtggcggcaa	cgctcccttc	gggacccatc	ctggcggcag	960
cctgaacggc	ccatcctccg	ggcgcgggttc	ccgcggggaa	tggagaagac	agcctgtct	1020
tcaggcaaga	aggccccgca	gatagacgag	agcctcatct	tctacaagaa	gtgggagct	1080
gaaggctgcg	tggatgcggc	cctgtgtggcc	acccagatgg	accgcgtgaa	cgccatcccc	1140
ttcacctacg	agcagctgta	cgtccaaag	cataaactgg	atgagctcta	cccacaaggt	1200
taccccgagt	ctgtgatcca	gcacccgggc	tacctttcc	tcaagatgag	ccctgaggac	1260
attcgcaagt	ggaatgtgac	gtccctggag	accctgaagg	ctttgctta	agtcaacaaa	1320
gggcacgaaa	tgagtcctca	ggcttcctcg	ggggccctcc	cacagggtggc	caccctgatc	1380
gaccgctttg	tgaagggaa	gggcacgcta	gacaaagaca	ccctagacac	cctgaccgc	1440
ttctaccctg	ggtagctgt	ctccctcagc	cccgaggagc	tgagctccgt	ggggccctcc	1500
agcatctggg	cggtcaggcc	ccaggacctg	gacacgtgt	acccaaggca	gctggacgtc	1560
ctctatccca	aggccccctc	tgcttccag	aacatgaacg	gttccgaaata	cttcgtgaag	1620
atccagtcc	tcctgggtgg	ggggccctcc	gaggattga	aggcgtctag	tacgagaat	1680
gtgagcatgg	acttggccac	gttcatgaag	ctgcggacgg	atgcgggt	gccgttgact	1740
gtggctgagg	tgcagaaaact	tctggaccc	cacgtggagg	gcctgaaggc	ggaggagcgg	1800
caccccccgg	tgcgccgactg	gatccatcgg	cagcggcagg	acgacccgt	cacgcgtgggg	1860
ctggggctac	agggcggcat	ccccaacggc	tacctggtcc	tagacccgt	catgcaagag	1920
gccctctcg	ggacccccc	cctcttagga	cctggaccc	ttctcaccgt	cctggactg	1980
ctccctagcct	ccacccctgc	ctgagggccc	cactccctt	ctggccccc	ccctgctggg	2040
gatccccggc	ttggccaggag	caggcacggg	ttgtccccgt	tccacccaa	gagaactcgc	2100
gctcagtaaa	cgggAACATG	ccccctgcag	acacgtaaaa	aaaaaaa	aaaaaaa	2154

10

<210> 28
<211> 630
<212> PRT
15 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln
 20 25 30
 Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
 35 40 45
 Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg
 50 55 60
 Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu
 65 70 75 80
 Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
 85 90 95
 Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
 100 105 110
 Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Phe Leu Asn Pro
 115 120 125
 Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
 130 135 140
 Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln
 145 150 155 160
 Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
 165 170 175
 Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
 180 185 190
 Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
 195 200 205
 Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg
 210 215 220
 Ala Ala Leu Gln Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp
 225 230 235 240
 Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly
 245 250 255
 Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg
 260 265 270
 Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile
 275 280 285
 Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser
 290 295 300
 Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys
 305 310 315 320
 Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met
 325 330 335
 Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu
 340 345 350
 Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val
 355 360 365
 Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile
 370 375 380
 Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu
 385 390 395 400
 Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu
 405 410 415
 Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln
 420 425 430
 Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr
 435 440 445
 Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser
 450 455 460
 Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln
 465 470 475 480
 Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn
 485 490 495

Gly	Ser	Glu	Tyr	Phe	Val	Lys	Ile	Gln	Ser	Phe	Leu	Gly	Gly	Ala	Pro
500							505					510			
Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Ala	Leu	Ser	Gln	Gln	Asn	Val	Ser	Met	Asp	Leu
515							520					525			
Ala	Thr	Phe	Met	Lys	Leu	Arg	Thr	Asp	Ala	Val	Leu	Pro	Leu	Thr	Val
530							535					540			
Ala	Glu	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Gly	Pro	His	Val	Glu	Gly	Leu	Lys	Ala
545							550					555			560
Glu	Glu	Arg	His	Arg	Pro	Val	Arg	Asp	Trp	Ile	Leu	Arg	Gln	Arg	Gln
565							570						575		
Asp	Asp	Leu	Asp	Thr	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gln	Gly	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

5

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 29

ggacagctgc	tttcccaggc	ccaaaagccc	cttcgttgtc	tccaaacagt	ggtgtgggtt	60
gaggggtggg	acaagtgggg	acctcagagt	cattgttatac	cacagaccat	ggccttgcac	120
acagctcgac	ccctgtgtgg	gtcctgtgga	agtcccacatct	gcagccaaag	cttcctactg	180
cttctccta	gtcttgggtg	gataccacgt	ctgcagacacc	agactacaaa	gacaagccag	240
gaggccacac	tcctccatgc	tgtgaacggt	gccgctgact	ttgccagtct	ccccacagggc	300
ctctttcttg	gcctcacatg	tgaggaggta	tctgacactga	gcatgaaaca	agccaagggg	360
ctggctatgg	ctgtaagaca	gaagaacatt	acactccggg	gacatcagct	gogttgtctg	420
gcacgtcgcc	ttcctaggca	cctcaccgac	gaggaactga	atgctttcc	actggacctg	480
ctgctttcc	tcaacccaggc	catgtttcca	gggcaacagg	tttgtgccc	cttcttctcc	540
ctcatctcta	aagccaatgt	ggatgtactc	ccacggaggt	ctctggagcg	ccagaggctg	600
ctgatggagg	ctctgaagtg	ccagggctgt	tatggatttc	aagtgagtga	ggcagatgtg	660
cgggctctcg	gaggcctggc	ctgtgacctg	cctggggaaat	tttgtggccag	atctccgaa	720
gttctcctcc	cctggctggc	aggatgccaa	ggaccccctgg	accagagcca	ggaaaaggca	780
gtcagggagg	ttctgaggag	tggagaacc	caatatggcc	ccccatcgaa	gtggtcagtc	840
tccaccctgg	atgcccgtca	gagcttggta	gcagtgttg	atgagttccat	cgtccagagc	900
atccccaaagg	atgtcaaagc	tgaatggctg	caacacatct	ccagagaccc	ctccaggctg	960
gggtctaaagc	tgaccgtcat	acacccaagg	ttccgacggg	atgcagaaca	gaaaggcctgc	1020
cctccagggc	aggagcccta	caaggtggat	gaagacctca	tcttctacca	gaattgggag	1080
ctggagggctt	gtgttagatgg	caccatgtg	gccagacaaa	tggaccttgt	gaacgagatt	1140
cccttcaccc	atgagcagct	cagtatctt	aagcacaaaac	tggacaagac	ctacccacaa	1200
ggcttatctg	agtccctgtat	ccagcagctg	ggtcacttct	tcatgatatgt	tagccctgaa	1260
gacatccacc	atgtgaatgt	gacctcacca	gacacagtga	aaactctgt	caaagtca	1320
aaaggacaaa	agatgaatgc	tcaggcgatt	gccttggctg	cctgctatct	tccggggagga	1380
ggccagctgg	acgaggatat	gttaaaagcc	ctggggcgaca	tcccgttaag	ctatctatgt	1440
gacttcagcc	cccaggatct	gcactcggta	ccctccagtg	tcatgtggct	ggttgggccc	1500
caagacctgg	acaagtgcag	ccagaggcat	ctgggtctcc	tctaccagaa	ggcctgctca	1560
gccttcaga	atgtgagcgg	cctagaatac	tttgagaaaa	tcaagacatt	cctgggtgg	1620
gcctccgtga	aggacctgcg	ggccctcagc	cagcacaatg	tgagcatgga	catagccact	1680
ttcaagaggc	tgcaggtgga	ttccctgggt	gggctgagtg	tggctgaggt	acagaaaactt	1740
ctggggccaa	acattgtgga	cctgaagacc	gaggaggata	aaagccctgt	ccgtgactgg	1800
ctgttccggc	agcatcagaa	agacctagac	aggctgggtt	tgggacttca	gggtggcattc	1860
cccaatggct	acctggctct	ggacttcaat	gtccgagagg	ccttctccag	cagagcctca	1920
ctccttggc	caggatttgt	attaatatgg	attccagctc	tgctccacgc	ttaaggctg	1980
agctgagacc	accaccctgc	aaggctcctg	gtcccagctc	tactggggcc	ctcttgcacca	2040
ggagtgggtta	ccaggggtca	ttgccaaaat	ttgaggactc	ttgaactcaa	taaacagtgg	2100
catatgtcc	cttgaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaa			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	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	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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de mesotelina sintético

10 <400> 31

Gly Gln Lys Met Asn Ala Gln Ala Ile
 1 5

15 <210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <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

25 <210> 33

<211> 45

<212> DNA

30 <213> Secuencia artificial

<220>

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

35 <400> 33

tgtgccagca gccctggact gggggatcc tatgaacagt acttc

45

<210> 34

<211> 15

40 <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*

20 <400> 35

tgtccagca gccaggact 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*

30 <400> 36

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

35 <210> 37

<211> 42

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

40 <220>

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

<400> 37

tgtccagca gctataact gggggctat gaacagtact tc

42

45 <210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

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

<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

tgtccagca gctcctggac agtctatgaa cagtactc

39

5

<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*

<400> 40

15

Cys	Ala	Ser	Ser	Trp	Thr	Gly	Ala	Asn	Thr	Gly	Gln	Ieu	Tyr	Phe
1					5					10				15

<210> 41

<211> 45

20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

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

25

<400> 41

tgtccagca gctggacagg ggcaaacacc gggcagctct acttt

45

30

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<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

<400> 43

50

Gly	Gln	Lys	Met	Asn	Ala	Gln	Ala	Ile
1					5			

<210> 44

<211> 9

55

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

60

<223> péptido de mesotelina sintético

<400> 44

agaatcaaaa	gaggaaacca	acccctaaga	ttagcttcc	atgtaaaattt	gtagccagct	60
tccttctgat	tttcaatgtt	tcttccaaag	gtgcagtctc	caaagagatt	acgaatgcct	120
tggaaacctg	gggtgcctg	ggtcaggaca	tcaacttga	cattcctagt	tttcaaatga	180
gtgatgat	tgacgatata	aatgggaaa	aaacttcaga	caagaaaaag	attgcacaat	240
tcagaaaaaga	gaaagagact	ttcaaggaaa	aagatacata	taagctattt	aaaaatggaa	300
ctctgaaaat	taagcatctg	aagaccgatg	atcaggatat	ctacaaggta	tcaatatatg	360
atacaaaaagg	aaaaaatgtg	ttggaaaaaaa	tatttgattt	gaagattcaa	gagagggtct	420
caaaacccaaa	gatctcctgg	acttgtatca	acacaaccct	gaccgtgtgag	gtaatgaatg	480
gaactgaccc	cgaattaaac	ctgtatcaag	atggggaaaca	tctaaaactt	tctcagaggg	540
tcatcacaca	caagtggacc	accagcctga	gtgcaaaattt	caagtgcaca	gcagggaaaca	600
aagttagcaa	gaaatccagt	gtcagccctg	ttagctgtcc	agagaaagg	ctggacatct	660
atctcatcat	tggcatatgt	ggaggaggca	gccttcttgc	ggtcttgc	gactgctcg	720
ttttctatat	cacccaaaagg	aaaaaacaga	ggagtcggag	aatgtatgag	gagctggaga	780
caagagccca	cagagtagct	actgaagaaa	ggggccggaa	gccccaccaa	attccagctt	840
caacccctca	gaatccagca	acttcccaac	atcctcctcc	accacccgtt	catcgttccc	900
aggcacctag	tcatcgccccc	ccgcctcctg	gacaccgtgt	tcagcaccag	cctcagaaga	960
ggcctcctgc	tccgtcgccc	acacaagttc	accagcagaa	aggcccgccc	ctccccagac	1020
ctcgagttca	gcacaaaactt	ccccatgggg	cagcagaaaa	ctcattgtcc	ccttcctctt	1080
attaaaaaaag	atagaaaactg	tcttttcaa	taaaaaagcac	tgtggatttc	tgccctcctg	1140
atgtgcata	cctgtacttcc	atgaggtgtt	ttctgtgtc	agaacattgt	cacccctctga	1200
ggctgtggc	cacagccacc	tctgcatctt	cgaactcagc	catgtggtca	acatctggag	1260
tttttggct	cctcagagag	ctccatcaca	ccagtaagga	gaagcaatat	aagtgtgatt	1320
gcaagaatgg	tagaggaccg	agcacagaaa	tcttagagat	ttcttgc	ctctcagggtc	1380
atgtgtagat	gcgataaaatc	aagtgattgg	tgtgcctggg	tctcaactaca	agcagccat	1440
ctgcttaaga	gactctggag	tttcttatgt	gccctgggtt	acactgccc	accatcctgt	1500
gagtaaaaagt	gaaataaaag	cttgcactag	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1560
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaa			1595

<210> 49

<211> 351

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 49

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

165	170	175
Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys	Thr Ala Gly Asn Lys Val	
180	185	190
Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro	Glu Lys Gly Leu	
195	200	205
Asp Ile Tyr Leu Ile Ile Gly Ile Cys Gly Gly	Ser Leu Leu Met	
210	215	220
Val Phe Val Ala Leu Leu Val Phe Tyr Ile	Thr Lys Arg Lys Lys Gln	
225	230	240
Arg Ser Arg Arg Asn Asp Glu Glu Leu Glu Thr Arg Ala His Arg Val		
245	250	255
Ala Thr Glu Glu Arg Gly Arg Lys Pro His Gln Ile Pro Ala Ser Thr		
260	265	270
Pro Gln Asn Pro Ala Thr Ser Gln His Pro Pro Pro Pro Gly His		
275	280	285
Arg Ser Gln Ala Pro Ser His Arg Pro Pro Pro	Gly His Arg Val	
290	295	300
Gln His Gln Pro Gln Lys Arg Pro Pro Ala Pro Ser Gly Thr Gln Val		
305	310	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

5

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 50

atggccgtca tggctccccg aaccctcgtc ctgctactct cggggctctt ggcctgacc	60
cagacctggg cggctctca ctccatgagg tattttttca catccgtgtc cccggccggc	120
cgcggggagc cccgcttcat cgcagtgggc tacgtggacg acacgcagtt cgtgcgggttc	180
gacagcgcacg ccgcgagcca gaggatggag ccgcgggcgc cgtggataga gcaggagggt	240
ccggagttt gggacgggga gacacgaaa gtgaaggccc actcacagac tcaccgagtg	300
gacctggga ccctgcgcgg ctactacaac cagagcgagg ccggttctca caccctccag	360
atgatgttg gctgcgacgt ggggtcgac tggcgcttcc tccgcggta ccaccagttac	420
gcctacgacg gcaaggatta catgcctcg aaagaggacc tgcgctttt gaccgcggcg	480
gacatggcag ctcagaccac caagcacaag tggaggcgg cccatgtggc ggagcagttt	540
agagcttacc tggagggcac gtgcgtggag tggctccgca gataaccttga gaacgggaag	600
gagacgctgc agcgacggc cggcccaaa acgcataatga ctcaccacgc tgtctctgac	660
catgaagcca ccctgaggtg ctgggcctg agcttctacc ctgcggagat cacactgacc	720
tggcagcggg atggggagga ccagacccag gacacggacg tcgtggagac caggcctgca	780
ggggatggaa cttccagaa gtggcggct gtgggtgtc cttctggaca ggagcagaga	840
tacacctgcc atgtcagca tgagggtttt ccaagcccc tcaccctgag atggagccg	900
tcttcccaac ccaccatccc catcggtggc atattgtctg gcctgttctt cttggagct	960
gtgatcaactg gagctgtggt cgctgctgtg atgtggagga ggaagagctc agatagaaaa	1020
ggagggagct actctcaggc tgcaagcagt gacagtgcac agggctctga tggctctc	1080
acagctgtta aagtgtga	1098

10

<210> 51

<211> 365

<212> PRT

15

<213> *Homo sapiens*

<400> 51

Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Ser Gly Ala
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
 20 25 30
 Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
 35 40 45
 Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala
 50 55 60
 Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly
 65 70 75 80
 Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln
 85 90 95
 Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser
 100 105 110
 Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Met Met Phe Gly Cys Asp Val Gly
 115 120 125
 Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val
 165 170 175
 Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu
 180 185 190
 Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala
 195 200 205
 Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr
 210 215 220
 Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
 225 230 235 240
 Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu
 245 250 255
 Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val
 260 265 270
 Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
 275 280 285
 Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro
 290 295 300
 Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala
 305 310 315 320
 Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser
 325 330 335
 Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser
 340 345 350
 Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val
 355 360 365

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

<400> 52

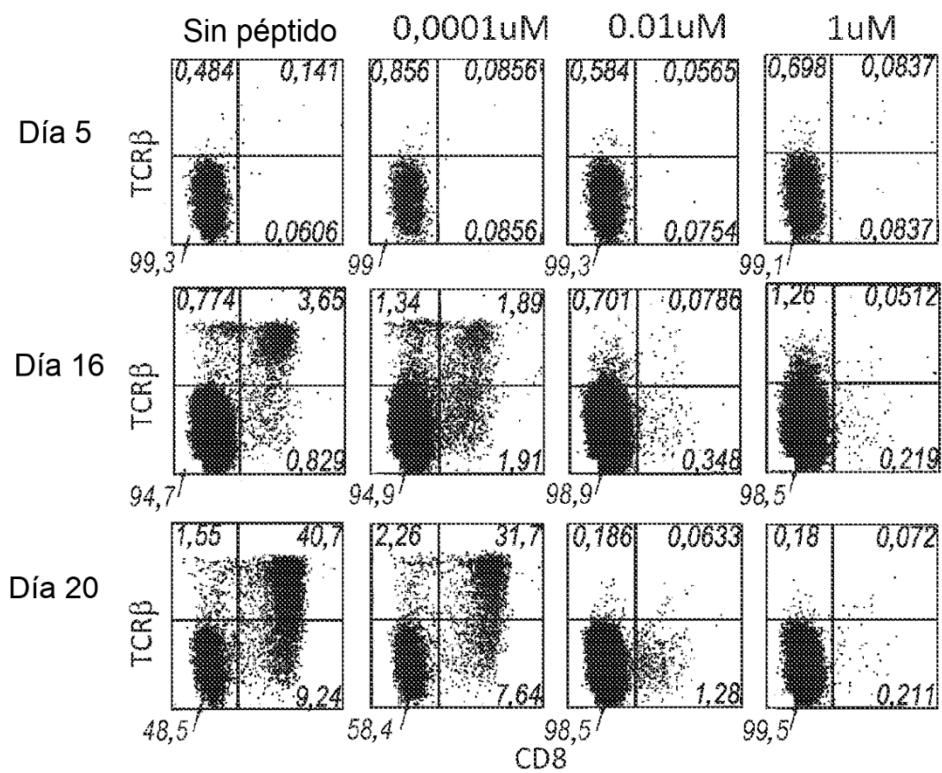
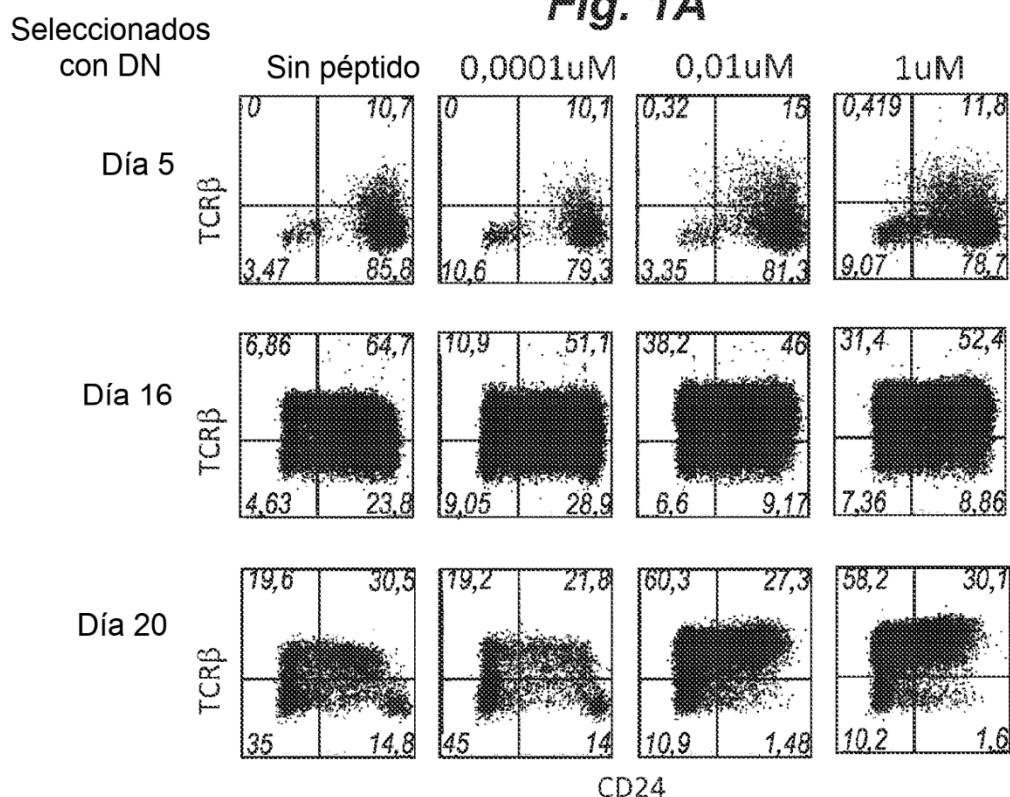
aataataatgt	gaggcgtcgc	gctggccggc	attcctgaag	ctgacagcat	tcggggccgag	60
atgtctcgct	ccgtggcctt	agctgtgctc	gcgctactct	ctcttctgg	cctggaggct	120
atccagcgta	ctccaaagat	tcaggtttac	tcacgtcattc	cagcagagaa	tggaaagtca	180
aatttcctga	attgctatgt	gtctgggtt	catccatccg	acattgaagt	tgacttactg	240
aagaatggag	agagaattga	aaaagtggag	cattcagact	tgtctttcag	caaggactgg	300
tctttctatc	tcttgtacta	cactgaattc	ccccccactg	aaaaagatga	gtatgcctgc	360
cgtgtgaacc	atgtgacttt	gtcacagccc	aagatagtt	agtgggatcg	agacatgtaa	420
gcagcatcat	ggaggtttga	agatgccgca	tttggattgg	atgaattcca	attctcgott	480
gcttgctttt	taatattgtat	atgcttatac	acttacactt	tatgcacaaa	atgttagggtt	540
ataataatgt	taacatggac	atgatcttct	ttataattct	actttgagtg	ctgtctccat	600
gtttgatgta	tctgagcagg	ttgctccaca	ggtagctcta	ggagggctgg	caacttagag	660
gtggggagca	gagaattctc	ttatccaaca	tcaacatctt	ggtcagattt	gaactcttca	720
atctcttgca	ctcaaagctt	gttaagatag	ttaagcgtgc	ataagttAAC	ttccaatttt	780
cataactctgc	ttagaatttg	ggggaaaatt	tagaaatata	attgacagga	ttattggaaa	840
tttggatataa	tgaatgaaac	atttgtcat	ataagattca	tatttacttc	ttatacatatt	900
gataaaagtaa	ggcatggttt	tggtaatct	ggtttatttt	tgttccacaa	gttaaataaaa	960
tcataaaaact	tgtatgttta	tctctta				987

<210> 53
<211> 119
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 53

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar un receptor de linfocitos T (TCR) con afinidad potenciada, que comprende:
 - 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 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);
 - 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.
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.
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.
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-peptido, en donde dichas células se seleccionan opcionalmente con tinción de tetrámeros de MHC-peptido 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.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en donde el vector vírico es un vector retrovírico o un vector lentivírico, 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.
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.
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).
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.
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****Fig. 1B**

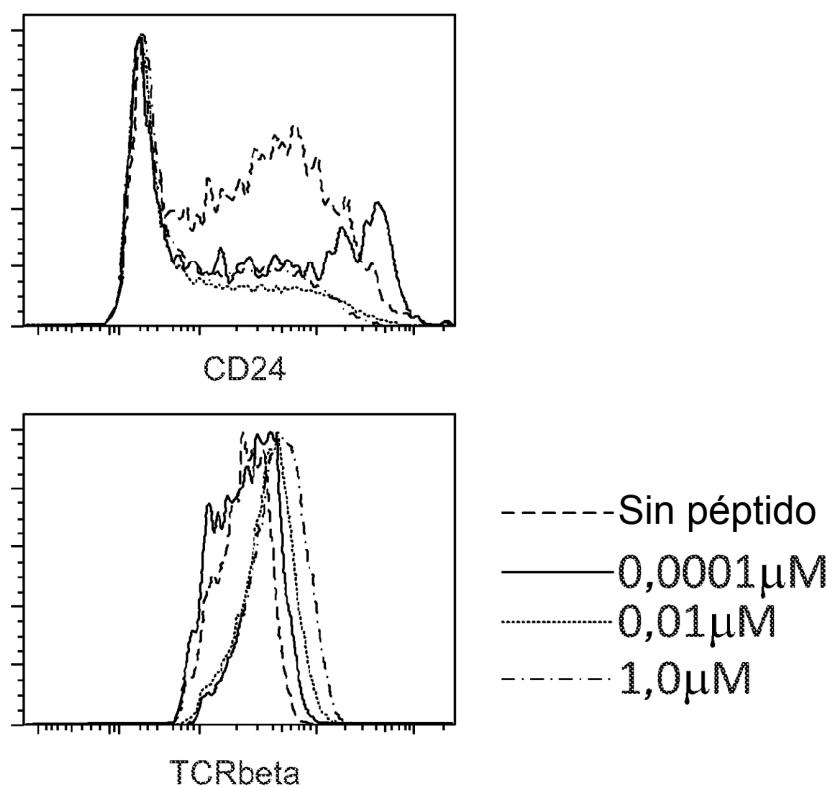


Fig. 1C

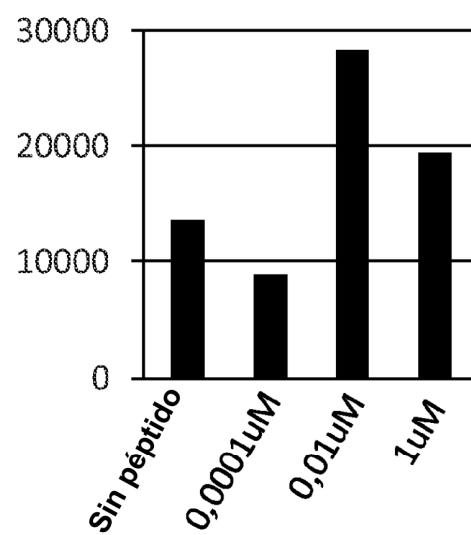


Fig. 1D

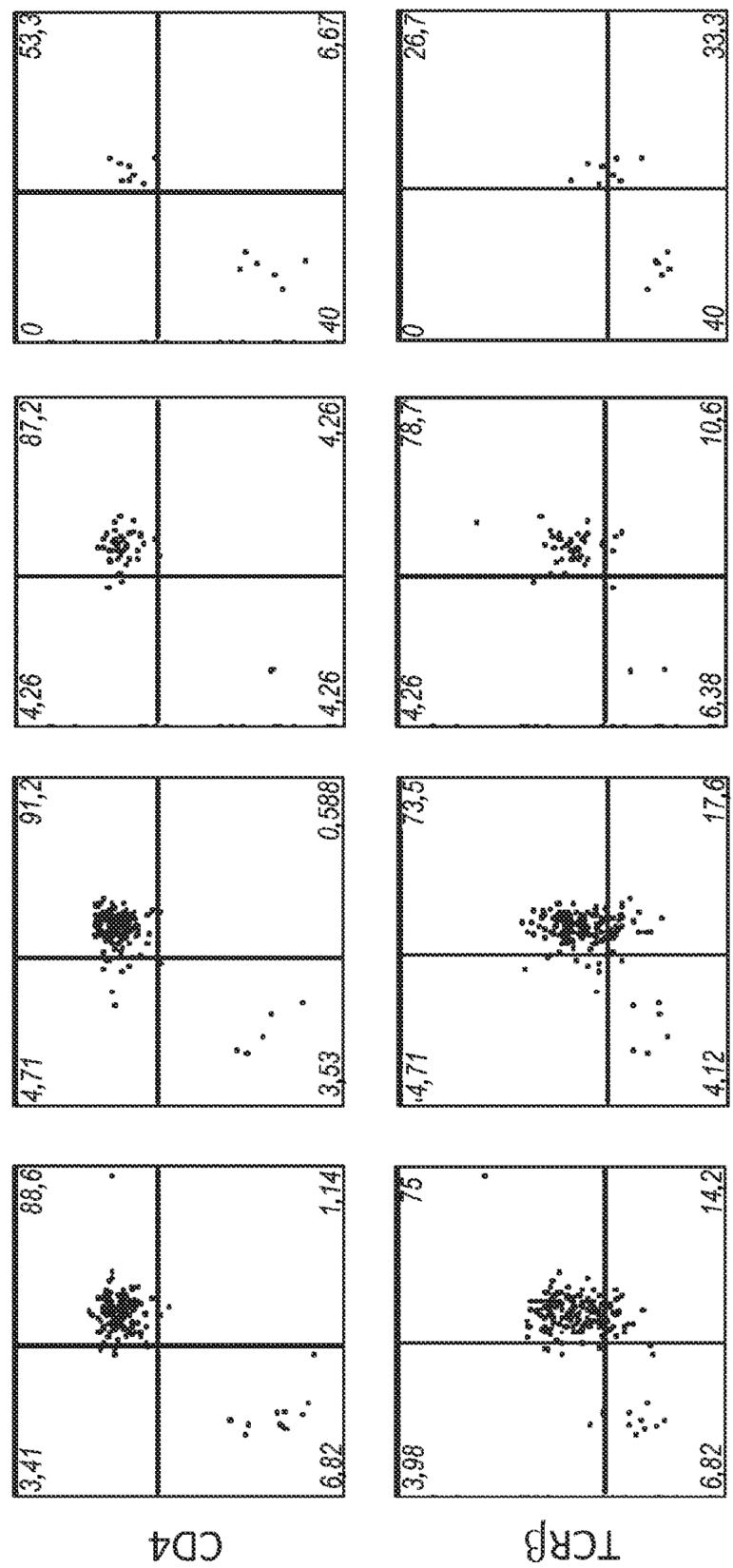


Fig. 2

CD8

TCRB

CD4

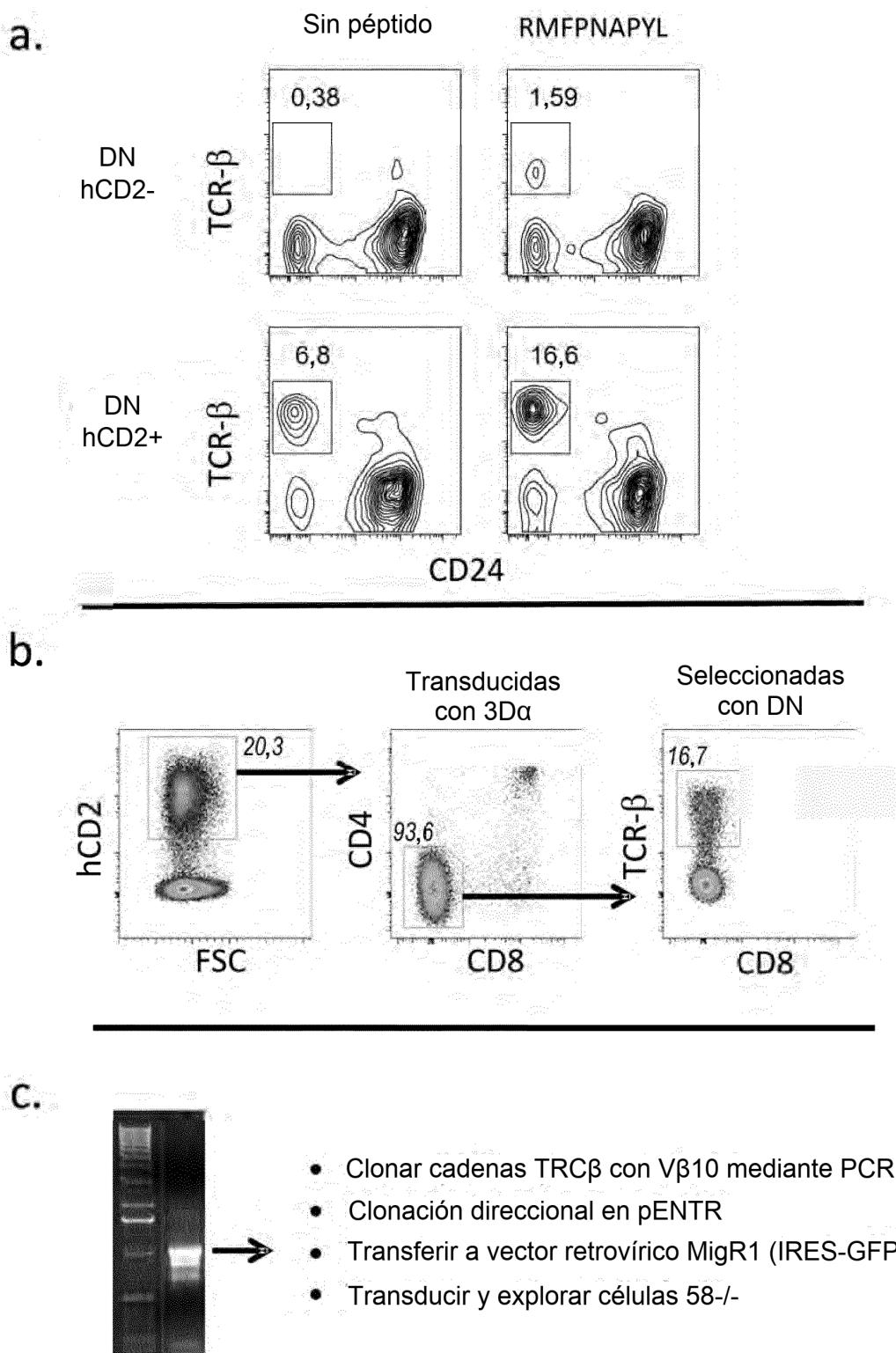


Fig. 3

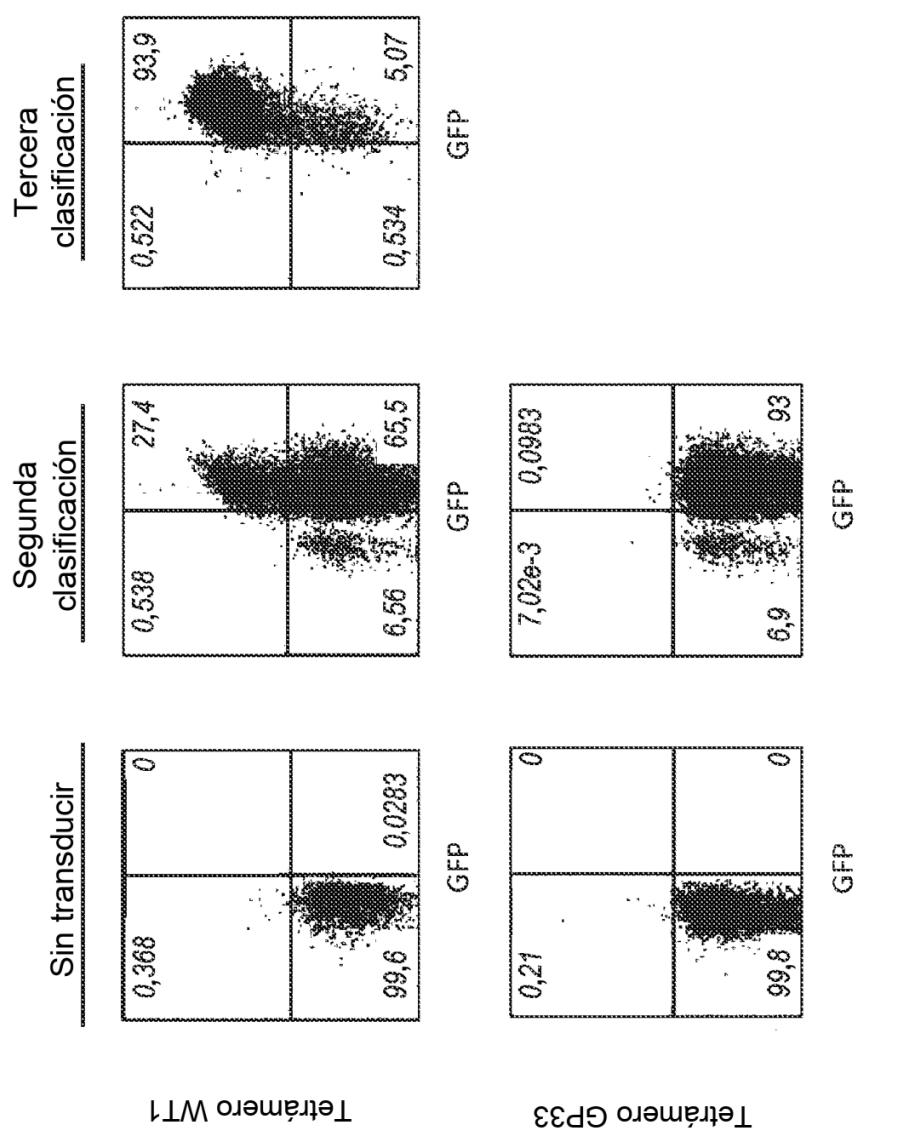


Fig. 4A

3D β	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118
	C	A	S	S	P	G	L	G	G	S	Y	E	Q	Y	F
	tgt	gcc	agg	agc	cct	gga	ctg	ggg	gga	tcc	tat	gaa	cag	tac	ttc
clon n. ^o 1 de V β 10	C	A	S	S	Q	G	L	G	S	S	Y	E	Q	Y	F
	tgt	gcc	agg	agc	cag	gga	ctg	ggg	agg	tcc	tat	gaa	cag	tac	ttc
clon n. ^o 2 de V β 10	C	A	S	S	Y	I	L		G	A	Y	E	Q	Y	F
	tgt	gcc	agg	agc	tat	ata	ctg	...	ggg	gcc	tat	gaa	cag	tac	ttc
clon n. ^o 3 de V β 10	C	A	S	S	S	W	T		V	Y	E	Q	Y	F	SEQ ID. NO: 37
	tgt	gcc	agg	agc	tcc	tgg	aca	gtc	tat	gaa	cag	tac	ttc
clon n. ^o 4 de V β 10	C	A	S	S	W	T	G	A	N	T	G	Q	L	Y	F
	tgt	gcc	agg	agc	tgg	aca	ggg	gca	aac	acc	ggg	cag	etc	tac	ttt

Fig. 4B

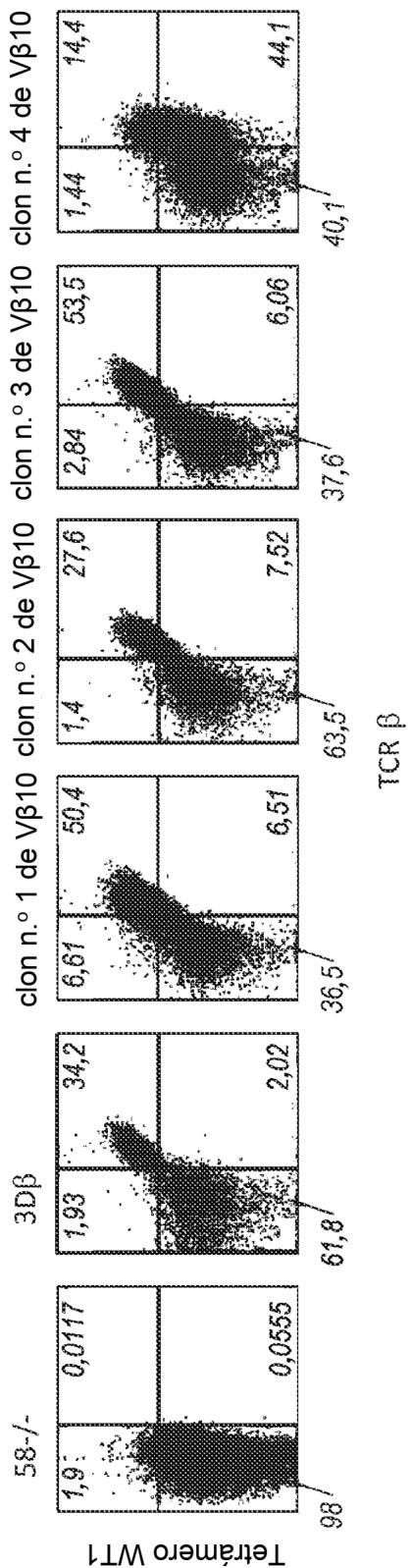
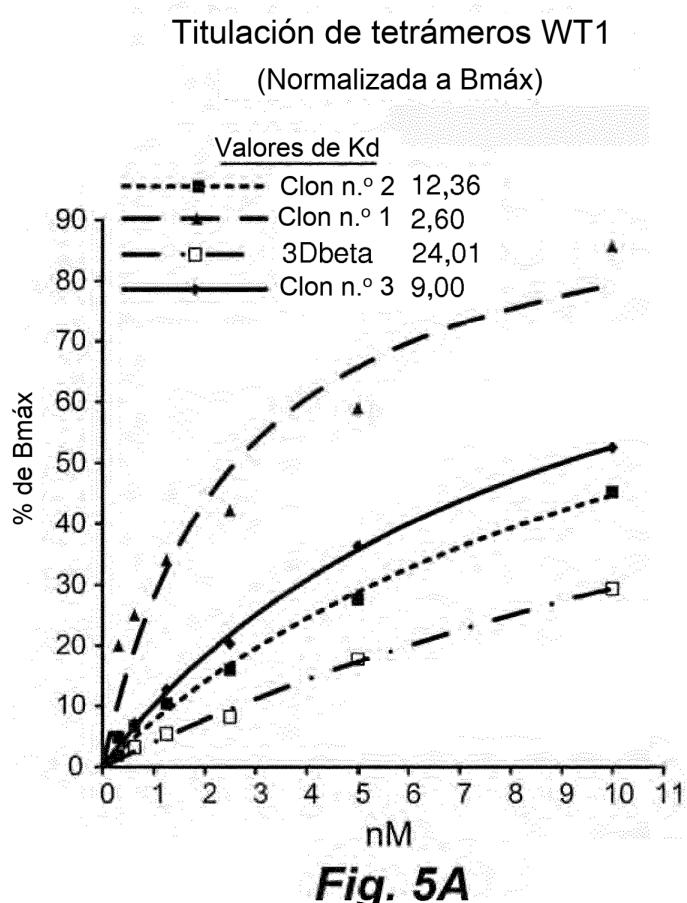
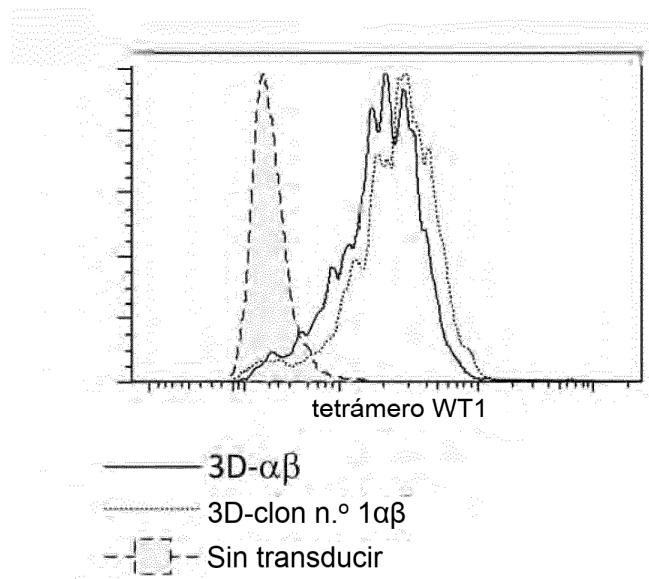


Fig. 4C

**Fig. 5A****Fig. 5B**

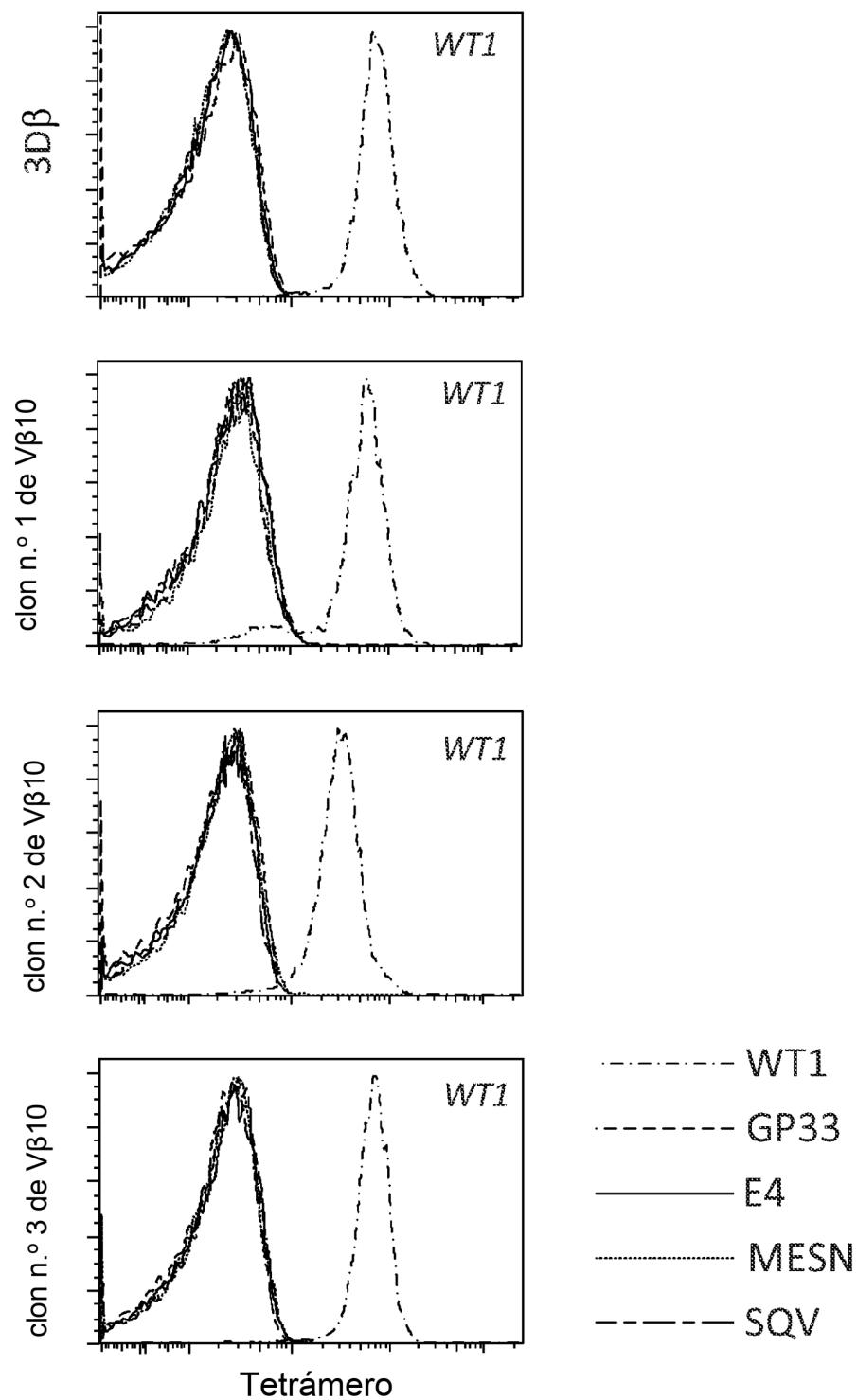


Fig. 5C

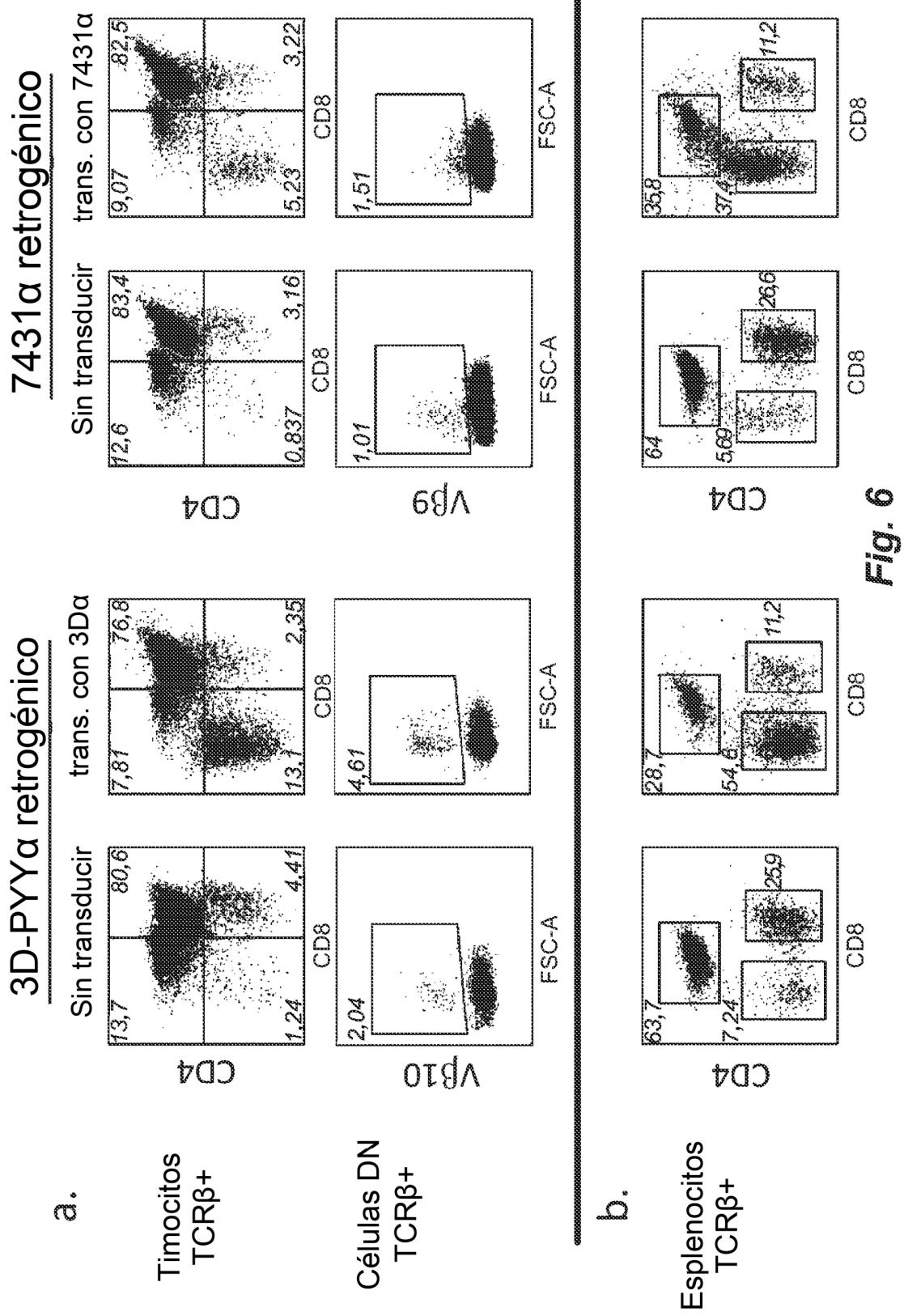


Fig. 6

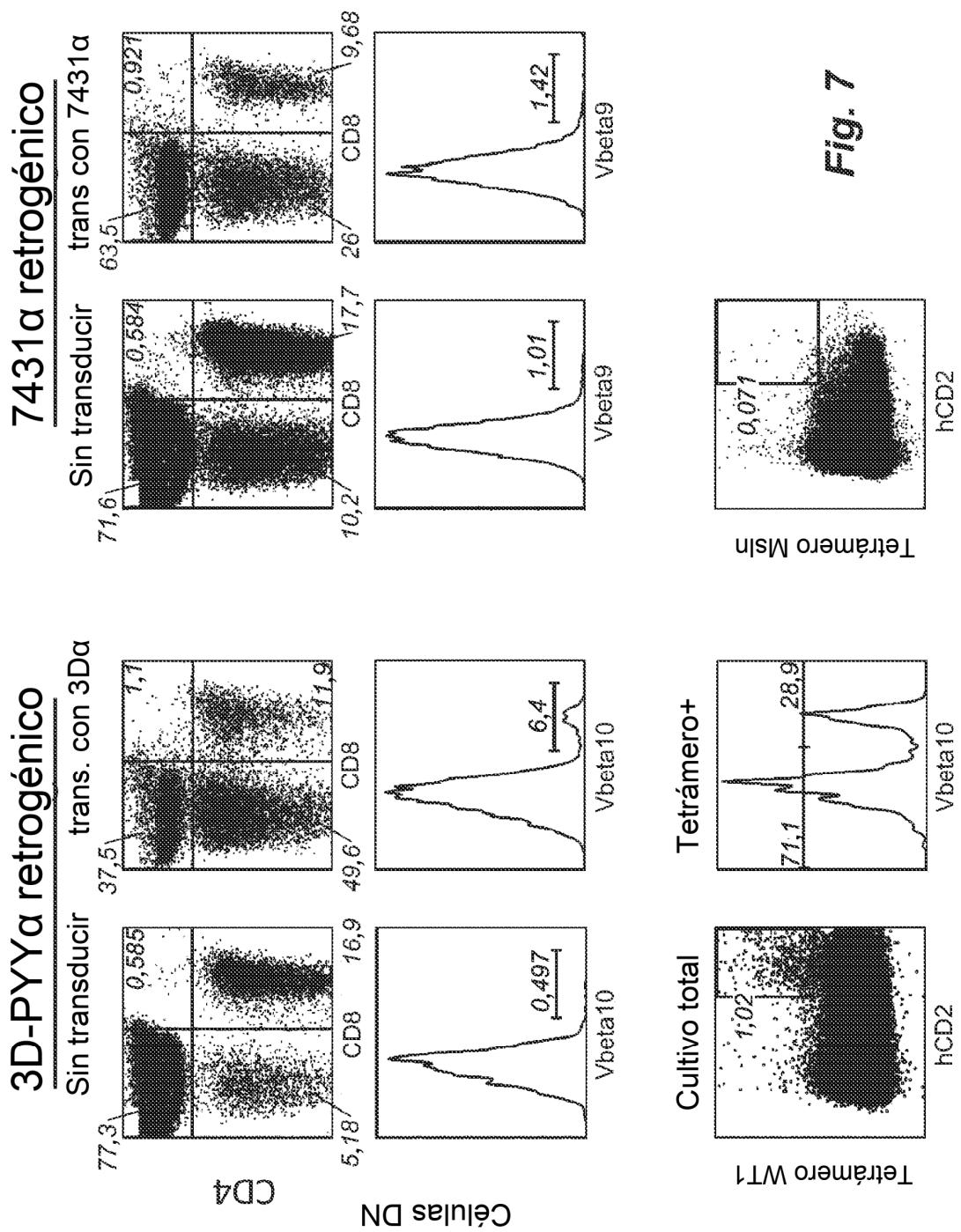


Fig. 7