



(21) 申请号 201880016990.4

(22) 申请日 2018.03.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110462024 A

(43) 申请公布日 2019.11.15

(30) 优先权数据
17159754.5 2017.03.07 EP
17179309.4 2017.07.03 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.09

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/055620 2018.03.07

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/162563 EN 2018.09.13

(73) 专利权人 巴塞尔大学
地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 加纳罗·得利博罗
马尔科·莱波雷 露西娅·莫利

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245
专利代理师 陈燕娴

(51) Int.Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 2014160030 A2, 2014.10.02

Eun Jeong Won 等. Clinical relevance of circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their anti-cancer activity in patients with mucosal-associated cancer.《Oncotarget》.2016,第7卷(第46期),76274-76290.

MARCO LEPORE 等. FUNCTIONALLY DIVERSE HUMAN T CELLS RECOGNIZE NON-MICROBIAL ANTIGENS PRESENTED BY MR1.《ELIFE》.2017,第6卷e24476 1-22.

Lepore, M. et al.. Parallel T-cell cloning and deep sequencing of human MAIT cells reveal stable oligoclonal TCR β repertoire.《NATURE COMMUNICATIONS》.2014,第5卷第3866篇.

审查员 张丽玮

权利要求书3页 说明书18页
序列表44页 附图12页

(54) 发明名称

用于癌症免疫疗法的MR1限制性T细胞受体

(57) 摘要

本发明涉及分离可表达T细胞受体的T细胞的方法,该T细胞受体能够特异性结合通过与MR分子相关联的癌细胞呈递的抗原。该方法包括以下步骤:(a)提供T细胞制剂;(b)使制剂与表达MR1蛋白的癌细胞接触;(c)分离与所述癌细胞产生特异反应的T细胞。本发明进一步涉及一种制备T细胞制剂的方法,该T细胞制剂在转基因表达载体上表达选择性识别MR1的T细胞受体,该T细胞制剂在癌症治疗中的应用,以及编码响应MR1的T细胞受体的核酸和细胞的集合。

1. 一种分离表达T细胞受体的T细胞的方法,所述T细胞受体能够特异地结合由与MR1关联的癌细胞呈递的抗原,其中,所述的MR1指MR1基因产物Uniprot Q95460,所述方法包含以下步骤:

a. 提供T细胞制剂;然后
b. 在接触步骤中使所述T细胞制剂与表达MR1的癌细胞接触;
c. 在分离步骤中将所述癌细胞特异性反应的T细胞分离;其中,所述的T细胞受体蛋白包括一对选自下组的氨基酸序列:

- b. 序列鉴别号002和序列鉴别号022;
- c. 序列鉴别号003和序列鉴别号021;
- d. 序列鉴别号004和序列鉴别号020;
- e. 序列鉴别号005和序列鉴别号019;
- g. 序列鉴别号007和序列鉴别号018;或
- j. 序列鉴别号010和序列鉴别号014。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述接触步骤包含扩增步骤,其中所述分离的T细胞的制剂在所述表达MR1的癌细胞存在下扩增。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述扩增步骤在IL-2和/或IL-7和/或IL-15的存在下进行。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述分离步骤包含利用对CD3、CD69、CD137、CD150和/或ICOS的细胞表面标记物特异的配体染色所述T细胞制剂。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述分离步骤包括选定CD3⁺ CD137⁺、和/或CD3⁺ CD69⁺、和/或CD3⁺ CD150⁺、和/或CD3⁺ ICOS⁺ T细胞,之后进行流式细胞术分析和细胞分拣。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述细胞分拣为通过使用FACS或磁分离。

7. 根据权利要求4所述的方法,其中所述对细胞表面标记物特异的配体是抗体或抗体样分子。

8. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述分离步骤包含选定T细胞,当用表达MR1的细胞刺激时,与用不表达MR1的细胞刺激相比,所述T细胞表现出选自IFN- γ 和/或GM-CSF释放的细胞因子表达增加了2倍。

9. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,还包括确定编码在所述分离步骤中分离的T细胞的T细胞受体的核酸序列。

10. 一种制备表达T细胞受体的MR1T细胞制剂的方法,所述T细胞受体能够结合由与MR1分子关联的癌细胞呈递的抗原,所述的MR1分子指MR1基因产物Uniprot Q95460,所述方法包括以下步骤:

- a. 提供从患者获得的肿瘤样品;
- b. 将所述肿瘤样品与以下物质接触:
 - i. 多个T细胞克隆,其中每个T细胞克隆的特征在于:MR1T细胞受体分子能够特异性地结合由与MR1分子关联的癌细胞呈递的抗原;或者
 - ii. 从MR1T细胞受体分子中分离的多个标记和多聚化的可溶性TCR;
- c. 对所述肿瘤样品特异性反应的MR1T细胞受体进行识别;
- d. 提供T细胞制剂;

e. 将编码在T细胞克隆上表达的MR1反应性T细胞受体分子的核酸表达构建体引入所述T细胞制剂,产生转基因T细胞制剂,所述构建体鉴别为在步骤c中对所述肿瘤样品特异性反应;其中,所述的T细胞受体蛋白包括一对选自下组的氨基酸序列:

- b. 序列鉴别号002和序列鉴别号022;
- c. 序列鉴别号003和序列鉴别号021;
- d. 序列鉴别号004和序列鉴别号020;
- e. 序列鉴别号005和序列鉴别号019;
- g. 序列鉴别号007和序列鉴别号018;或
- j. 序列鉴别号010和序列鉴别号014。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述T细胞制剂是从所述同一患者获得。

12. 根据权利要求10所述的方法,其中所述T细胞制剂从HLA匹配的受试者。

13. 根据权利要求10所述的方法,其中从所述患者获得的所述T细胞制剂是从患者的外周血中获得。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述T细胞制剂是通过选定PBMC特征为 $CD3^+ CD4^+$ 、 $CD3^+ CD8^+$ 、 $CD3^+ CD27^+ CD45RA^+$ 、 $CD3^+ CD27^+ CD45RA^-$ 、 $CD3^+ CD27^- CD45RA^-$ 、 $CD3^+ CD57^-$ 或 $CD3^+ CD57^+$ 的T 细胞。

15. 根据权利要求10所述的方法,其中从所述患者获得的所述T细胞制剂从肿瘤活组织检查获得,之后相继在体外扩增。

16. 一种通过权利要求10至15所述的任一方法获得的MR1特异性T细胞制剂,所述的MR1分子指MR1基因产物Uniprot Q95460,所述制剂用于治疗或预防癌症。

17. 根据权利要求16所述的MR1特异性T细胞制剂,其中所述癌症是通过MR1表达来表征的癌症。

18. 一种表达载体,所述表达载体包含编码T细胞受体蛋白的核酸序列,所述的T细胞受体蛋白包含一对选自以下序列的氨基酸序列:

- b. 序列鉴别号002和序列鉴别号022;
- c. 序列鉴别号003和序列鉴别号021;
- d. 序列鉴别号004和序列鉴别号020;
- e. 序列鉴别号005和序列鉴别号019;
- g. 序列鉴别号007和序列鉴别号018;或
- j. 序列鉴别号010和序列鉴别号014。

19. 一种分离的T细胞受体蛋白异二聚体,所述T细胞受体蛋白异二聚体与MR1分子结合,其中,所述的MR1分子指MR1基因产物Uniprot Q95460,所述MR1分子在肿瘤细胞上表达,其中所述MR1分子呈递肿瘤相关抗原;所述分离的T细胞受体蛋白包含一对选自以下序列的氨基酸序列:

- b. 序列鉴别号002和序列鉴别号022;
- c. 序列鉴别号003和序列鉴别号021;
- d. 序列鉴别号004和序列鉴别号020;
- e. 序列鉴别号005和序列鉴别号019;
- g. 序列鉴别号007和序列鉴别号018;或

j. 序列鉴别号010和序列鉴别号014。

20. 一种重组细胞, 所述重组细胞包含根据权利要求18的表达载体或根据权利要求19项所述的T细胞受体蛋白异二聚体, 其中所述重组细胞是衍生自以下物质的T细胞:

a. 外周血; 或

b. 肿瘤浸润淋巴细胞。

21. 根据权利要求20的重组细胞, 所述重组细胞用于治疗或预防癌症, 其中, 所述的癌症是通过MR1表达来表征的癌症。

22. 根据权利要求21所述的重组细胞, 其中所述细胞通过过继性T细胞免疫疗法施用。

23. 核酸序列的集合, 其中所述集合的每个成员促进哺乳动物细胞中不同T细胞受体 α 链、T细胞受体 β 链或T细胞受体 α 链和 β 链组合的表达, 其中所述组合能够与呈递癌抗原的MR1分子特异性结合, 所述的MR1分子指MR1基因产物Uniprot Q95460; 且所述集合包含选自包括一对选自以下序列的T细胞受体分子的序列:

b. 序列鉴别号002和序列鉴别号022;

c. 序列鉴别号003和序列鉴别号021;

d. 序列鉴别号004和序列鉴别号020;

e. 序列鉴别号005和序列鉴别号019;

g. 序列鉴别号007和序列鉴别号018; 或

j. 序列鉴别号010和序列鉴别号014。

24. 一种重组T细胞集合, 其中所述集合的每个成员表达能够与呈递癌抗原的MR1分子特异性结合的T细胞受体作为转基因, 所述的MR1分子指MR1基因产物Uniprot Q95460, 且所述集合包含含有根据权利要求19所述的T细胞受体蛋白异二聚体的细胞。

25. 一种用于癌症治疗的组合物, 包括

表达MR1的核酸表达载体和以下物质:

a. 一种重组细胞, 所述重组细胞包含根据权利要求18所述的表达载体或根据权利要求19所述的T细胞受体蛋白异二聚体, 和/或

b. 一种通过权利要求10至15所述的任一项的方法获得的MR1特异性T细胞的制剂, 和/或

c. 一种根据权利要求18所述的表达载体;

所述的MR1指MR1基因产物Uniprot Q95460;

所述载体包含在哺乳动物细胞中能够操作的启动子序列的控制下编码MR1的核酸序列;

所述的表达MR1的核酸表达载体在施用物质a和/或物质b和/或物质c之前、同时或之后施用。

用于癌症免疫疗法的MR1限制性T细胞受体

[0001] 本发明涉及限于非多态性抗原呈递分子MR1的肿瘤反应性人T细胞抗原受体 (TCR) 的鉴别。从代表新型的人T细胞群 (由本发明人发现并称为MR1T细胞) 的克隆中分离功能性TCR转录物序列, 该人T细胞群在没有任何添加的外来抗原的情况下并以MR1依赖性方式与表达MR1的肿瘤细胞反应。本发明还涉及MR1限制性肿瘤反应性TCR基因序列在癌症治疗中的使用。

背景技术

[0002] T淋巴细胞可以检测多种不同的非肽抗原, 其包括由非多态性细胞表面分子呈递的脂质和磷酸化类异戊二烯。这些T细胞的异质表型和功能特性支持宿主保护免受感染、自身免疫和癌症的特殊作用。针对非肽抗原特异性的T细胞库最近增加到包括粘膜相关的不变T (MAIT) 细胞, 这些细胞对由宽泛范围的酵母和细菌产生的小核黄素前体作出反应, 并由MHC I类相关蛋白MR1呈递。MAIT细胞在人血液、肾脏和肠道中很常见, 并且包含驻留在肝脏中的大部分T细胞。活化后, MAIT细胞释放出一系列促炎和免疫调节细胞因子, 并可介导直接杀伤被微生物感染的细胞。尚不清楚MR1的作用是否超出了微生物代谢产物向MAIT细胞的呈递。

[0003] MR1为非多态性MHC I类蛋白, 其在许多细胞类型的表面上以低水平表达。MR1在多个菌种中高度保守, 人和小鼠MR1在蛋白质水平上具有>90%的序列同源性。

[0004] 本发明人提出了存在识别由MR1呈递的肿瘤相关抗原的人T细胞。这些新型T细胞可能参与肿瘤免疫监视, 因此代表了癌症免疫疗法的新工具。用供体或源于患者的T细胞的过继性疗法 (其设计成表达选定的肿瘤相关抗原表达特异性的TCR) 代表了在癌症患者中诱导临床相关的抗肿瘤免疫应答的有希望且安全的策略。然而, 鉴别的大多数肿瘤相关抗原迄今为止是由多态性MHC分子呈递的肽。MHC基因的极端多态性限制了该方法在表达独特MHC等位基因的那些患者中的应用。靶向与非多态性抗原呈递分子结合的肿瘤抗原 (诸如MR1) 可以克服该限制, 并且原则上适用于患有表达MR1的肿瘤的所有患者。使用识别MR1呈递的抗原的肿瘤反应性T细胞受体也可能具有补充由MHC呈递的肽抗原介导的抗肿瘤反应的优点, 这排除了肿瘤抗原与相同类型的呈递分子结合的交叉竞争。此外, 该策略可提供在相同肿瘤细胞上靶向不同性质的抗原的可能性, 从而最大限度地减少在选定性免疫压力下肿瘤逃逸变体的潜在发生。因此, 鉴别MR1呈递的肿瘤相关抗原以及识别这些抗原的MR1限制性TCR的表征可能对癌症免疫疗法具有重要意义。

[0005] 基于该现有技术, 本发明的目的是提供治疗癌症的新型手段和方法。该目的通过独立权利要求的主题实现, 并且通过本文公开的从属权利要求、示例和附图提供了进一步有利的解决方案。

[0006] 定义

[0007] 在本说明书的上下文中, 术语MR1是指MR1基因 (Entrez 3140) 或MR1基因产物 (Uniprot Q95460)。

[0008] 在本说明书的上下文中, 术语MR1T细胞是指表达能够与癌细胞呈递的MR1分子特

异性结合的T细胞受体的T细胞。

[0009] 在本说明书的上下文中,术语MR1T细胞受体是指能够特异性结合由与MR1分子相关的癌细胞呈递的抗原的T细胞受体。

[0010] 在本说明书中,术语阳性当在标记物表达的上下文中使用时,是指通过荧光标记的抗体测定的抗原的表达,其中该荧光至少高30% ($\geq 30\%$),特别是 $\geq 50\%$ 或 $\geq 80\%$,中值荧光强度与用同型匹配的抗体染色相比,该抗体不特异性结合相同的靶向。标记物的该表达由该标记物的名称后面的上标“加号”⁽⁺⁾表示,例如CD4⁺。

[0011] 在本说明书中,当在标记物表达的上下文中使用时,术语阴性是指由荧光标记的抗体测定的抗原的表达,其中中值荧光强度比不特异性结合相同靶向的同种型匹配抗体的中值荧光强度高小于30%,特别是高小于15%。标记物的该表达由标记物名称后面的上标减号⁽⁻⁾表示,例如CD127⁻。

[0012] 术语抗体是指完整抗体,包括但不限于免疫球蛋白G型(IgG)、A型(IgA)、D型(IgD)、E型(IgE)或M型(IgM),任何抗原结合片段或其单链和相关或衍生的构建体。该术语涵盖所谓的纳米抗体或单结构域抗体,由单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段。

发明内容

[0013] 在最广泛的意义上,本发明涉及治疗癌症的方法,其中从表达MR1的癌细胞(MR1T细胞)反应的T细胞分离的TCR序列在患者的T细胞群中基因转移后表达。这些外源性、转基因表达的TCR序列用于将表达MR1的癌细胞特异性识别赋予T细胞,作为对患者肿瘤的治疗。

[0014] 本发明类似地产生T细胞和T细胞制剂,其包含用MR1T细胞特异性TCR基因转导的多个T细胞。在某些实施方案中,用MR1T细胞TCR基因转导的T细胞可以与其他治疗干预组合用于过继性细胞免疫疗法。

[0015] 本发明还涉及一种促进鉴别从与本发明中采用的表达MR1的癌细胞(MR1T细胞)反应的T细胞分离的TCR序列的研究方法。这涵盖分离识别肿瘤相关抗原的MR1限制性T细胞的方法。来自正常供体或来自癌症患者的外周血的T细胞用代表患者中相同类型肿瘤的肿瘤细胞系刺激。用MR1基因转染这些肿瘤细胞系,从而在其质膜上表达大量的MR1蛋白。对活化的T细胞进行分选以表达活化标记物(例如CD137、或CD150、或CD69、或ICOS),并如公布的那样克隆(De Libero,从切除的人活组织检查或针抽吸物中产生T细胞克隆和上皮细胞系的方法)。在MHC 123-140(IREL,牛津;1997年)。测试各个克隆以MR1限制性方式识别肿瘤细胞、杀伤肿瘤细胞和释放炎性细胞因子的能力。对MR1限制性和肿瘤特异性T细胞克隆的TCR基因进行测序和识别。

[0016] 本发明还涉及根据我们先前建立的方案(De Libero,同上)从相同癌组织活组织检查制备肿瘤浸润性T细胞的方法。针对一组表达MR1蛋白的肿瘤细胞系测试各个T细胞克隆。研究了反应性最强的T细胞克隆的MR1限制性、肿瘤杀伤和炎性细胞因子的释放。对所选T细胞克隆的TCR基因进行测序。

具体实施方式

[0017] 本发明的第一方面涉及一种方法,该方法识别和/或分离表达能够特异性结合由与非多态性MHC I相关MR1抗原呈递分子相关的癌细胞呈递的癌症抗原的T细胞受体。该方

法包括以下步骤:

[0018] a. 提供从患者或健康供体分离的T细胞制剂, 然后

[0019] b. 在接触步骤中, 在没有外源微生物衍生抗原的情况下, 将该分离的T细胞制剂与表达MR1蛋白的癌细胞接触, 特别是共培养, 然后

[0020] c. 在分离步骤中以MR1依赖的方式将所述癌细胞特异反应的T细胞分离。

[0021] 在患有非肿瘤患者的生理环境中, MR1呈递细菌核黄素副产物(以上称为“外源微生物衍生的抗原”), 并将其呈递给粘膜不变的T细胞。

[0022] 在某些实施方案中, 接触步骤包括扩增步骤, 其中分离的T细胞制剂在表达MR1的癌细胞存在下扩增。在某些特定实施方案中, 照射癌细胞以便在与T细胞接触之前阻止其生长。如果要将两种细胞类型保持在共培养中持续延长的时间段并且要避免癌细胞对培养物的过度生长, 这将是有益的。

[0023] 在其他环境中, 特别是在临床使用(见下文)中, 培养时间短, 癌细胞可以在没有照射的情况下使用。

[0024] 在某些实施方案中, 扩增步骤在IL-2、IL-7和IL-15的存在下进行。

[0025] 在某些实施方案中, 分离步骤包括用一种或多种配体染色, 特别是对选自CD3、CD69、CD137、CD150和/或ICOS的细胞表面标记物特异的一种或多种(单克隆)抗体。在特别优选的实施方案中, 分离步骤包括选定CD3⁺CD137⁺、和/或CD3⁺CD69⁺、和/或CD3⁺CD150⁺、和/或CD3⁺ICOS⁺T细胞, 然后进行流式细胞分析和细胞分选, 特别是通过使用FACS或磁分离(MACS)。此处标记物的阳性表达(+)意指与用同型匹配的抗体染色相比, 中值荧光强度增加至少30%, 该同型匹配的抗体不特异性结合相同的细胞。换句话说, 使用FACS或MACS分离表达CD3和CD137、和/或CD3和CD69、和/或CD3和CD150、和/或CD3和ICOS的T细胞。技术人员知道, 在经由FACS分离细胞的情况下, 可以在单个步骤中分离对两种(或更多种)不同标记物的表达呈阳性的细胞。如果使用磁分离, 则必须进行两个单独的步骤以分离对于表达两种不同标记物呈阳性的细胞。

[0026] 分离步骤包括选定显示MR1限制性活性的T细胞。换句话说, 该步骤包括分离由MR1上呈递的抗原活化的T细胞。

[0027] 在某些实施方案中, 分离步骤包括选定T细胞, 当用表达MR1的细胞刺激时, 其与用不表达MR1的细胞刺激相比, 表现出选自IFN- γ 和/或GM-CSF释放的细胞因子表达增加2倍。

[0028] 技术人员知道表达MR1的癌细胞在MR1上呈递特定的癌抗原或许多特定的癌抗原。

[0029] 在某些实施方案中, 分离步骤包括选定T细胞, 当用表达MR1的肿瘤细胞刺激时, 其与用不表达MR1肿瘤细胞(相同来源或相同细胞系)刺激相比, 表现出选自IFN- γ 和/或GM-CSF释放的细胞因子表达增加2倍。

[0030] 反应性细胞是响应于表达MR1的癌细胞(以MR1限制性方式呈递癌抗原)接触的细胞, 上调活化标记物(特别是前述段落中引用的标记物), 释放细胞因子并开始增殖。

[0031] 换句话说, 显示MR1限制活性的T细胞是可以由MR1显示的肿瘤相关的抗原激活的T细胞。

[0032] 这些细胞可以在用对标记物特异的适当荧光标记的抗体染色后通过荧光激活细胞分选(FACS)进行分选, 或者通过用适当抗体标记的磁珠进行分选(这是临床环境中常用的分选方法)。

[0033] 在某些实施方案中,分离步骤包括扩增根据其活化状态的函数分选的细胞的各个克隆,然后选定显示MR1限制活性的T细胞克隆,特别是当用表达MR1的细胞刺激时,与用不表达MR1的细胞刺激相比,表现出2倍增加的选自IFN- γ 和/或GM-CSF的细胞因子表达的细胞。

[0034] 在某些实施方案中,该方法还包括确定编码在分离步骤中分离的T细胞的T细胞受体的核酸序列。在某些实施方案中,该方法包括确定编码在分离步骤中分离的T细胞的两种T细胞受体链的两种核酸序列。

[0035] 本发明的另一方面涉及一种在不存在外源抗原时产生与MR1反应的转基因MR1T细胞制剂的方法。该方法首先涵盖确定哪些T细胞受体最可能对患者中特定的表达MR1的癌症具有反应性,然后从转移到细胞中的表达构建体制备表达这些特异性T细胞受体基因的T细胞群,以及施用这些设计的T细胞进入患者体内。

[0036] 该方法包括以下步骤:

[0037] a. 提供从患者获得的肿瘤样品;

[0038] b. 将所述肿瘤样品与多个对MR1反应的MR1T细胞受体分子接触,并且

[0039] -在多个T细胞克隆上呈递,其中每个T细胞克隆的特征在于与MR1反应的MR1T细胞受体分子;或

[0040] -作为所标记的可溶性MR1T细胞受体分子,并且以非细胞依赖性方式测定其识别;

[0041] c. 识别对所述肿瘤样品特异性反应的许多T细胞克隆;

[0042] d. 提供T细胞制剂,特别是从同一患者获得的T细胞制剂;

[0043] e. 将编码在步骤c中鉴别为对所述肿瘤样品特异反应的T细胞克隆上表达的MR1反应性T细胞受体分子的核酸表达构建体引入所述T细胞制剂,产生转基因T细胞制剂

[0044] 因此可以将对患者的转基因T细胞制剂施用给患者。

[0045] 在某些实施方案中,所述T细胞制剂从同一患者获得(自体过继性T细胞疗法)。该方法具有避免不良反应风险的优点,特别是由设计的T细胞制剂的内源性T细胞受体驱动的同种免疫反应。

[0046] 在某些实施方案中,所述T细胞制剂从另一个受试者获得,特别是与HLA匹配的受试者(同种异体过继性T细胞疗法)。虽然取决于HLA匹配的质量,同种免疫的风险可能很大,但与定制的患者个体疗法高得多的成本和监管障碍相比,大量选定预先制备的TC制剂的后勤和程序优势可能有助于该疗法在更大的患者群体中进行。

[0047] 将MR1T细胞受体表达构建体引入T细胞制剂中可以通过慢病毒转导实现,本发明人在MR1T细胞的工作中经常使用慢病毒转导,或通过DNA表达载体(质粒)或RNA转染的标准方法。技术人员知道相关的方案和程序。

[0048] 任选地,转基因T细胞制剂可以在施用于患者之前保持培养一段时间以扩增其数量,并且又任选地,进一步刺激其分化成特别期望的T细胞亚组。

[0049] 在某些实施方案中,从所述患者获得的T细胞制剂获自患者的外周血,特别是其中所述T细胞制剂通过选定外周血单核细胞(PBMC)以表达一种或多种选自含有CD4、CD8、CD27、CD45RA和CD57群的T细胞标记物而获得的。

[0050] 在某些实施方案中,从所述患者获得的T细胞制剂是从肿瘤活检中获得的,随后相继在体外扩增。在某些实施方案中,在植物凝集素、IL-2、IL-7和IL-15的存在下,T细胞扩

增。通过磁分选分离增殖T细胞并用于T细胞受体设计或用于克隆和分离肿瘤特异性MR1限制性T细胞。分离的MR1T细胞用于TCR基因克隆。

[0051] 多个MR1特异性T细胞克隆可以在程序之前制备,并且以库或组的形式保持,以便在需要快速表征出现肿瘤时进行临时使用。该步骤基本上是将鉴别特定肿瘤实体的MR1特异性T细胞受体分子的鉴别。

[0052] 或者,可以产生可溶性MR1T TCR并使其多聚化(参见Subbramanian等人。自然生物技术,22,1429,(2004))。TCR多聚体将用荧光染料标记并用于染色从肿瘤活组织检查分离的肿瘤细胞。可溶性MR1T TCR多聚体的结合将指示MR1T TCR识别肿瘤细胞的能力,因此将有助于选定适合该患者的基因疗法的MR1T TCR。

[0053] 本发明的另一方面涉及表达载体,其包含并导致转录编码功能性T细胞受体异二聚体的核酸序列,或能够与T细胞受体 β 链一起形成功能性T细胞受体异二聚体的T细胞受体 α 链,和/或能够与T细胞受体 α 链一起形成功能性T细胞受体异二聚体的T细胞受体 β 链。值得注意的是,本发明人也发现了MR1特异性 γ - δ 异二聚体,因此同样适用于这些链。

[0054] 在表达载体包含编码T细胞受体 α 链或T细胞受体 β 链(或 γ 或链)的核酸序列的实施方案中,必须将两种不同的表达载体(一种编码 α 链(链)和一种编码 β 链(δ 链))引入细胞中,以使所述细胞能够表达功能性T细胞受体异二聚体。T细胞受体异二聚体特异性结合MR1分子,其中所述MR1分子在肿瘤细胞上表达并呈递肿瘤相关抗原。

[0055] 上述核酸序列的表达由可在哺乳动物细胞,特别是人T细胞中操作的启动子序列控制。在某些实施方案中,启动子是组成型活化的启动子,例如通常用于分子生物学的CMV即刻早期启动子。在某些其他实施方案中,启动子是诱导型启动子。

[0056] 在本发明该方面的某些实施方案中,表达载体中包含的核酸序列是或包含选自序列鉴别号027至038的核酸序列,和/或编码选自序列鉴别号001至012(α 链)的氨基酸序列。

[0057] 在本发明该方面的某些实施方案中,表达载体中包含的核酸序列是或包含选自序列鉴别号039至050的核酸序列,和/或编码选自序列鉴别号013至024(β 链)的氨基酸序列。

[0058] 在某些实施方案中,核酸序列编码由序列鉴别号051编码的T细胞受体 γ 链或编码由序列鉴别号025指定的T细胞受体 γ 链。

[0059] 在某些实施方案中,核酸序列编码由序列鉴别号052编码的T细胞受体 δ 链或编码由序列鉴别号026指定的T细胞受体 δ 链。

[0060] 本发明的另一方面涉及一种编码功能性T细胞受体异二聚体的核酸序列。T细胞受体异二聚体特异性地结合在呈递肿瘤相关抗原的肿瘤细胞上表达的非多态性MHC I相关(MR1)的抗原呈递分子。

[0061] 在某些实施方案中,核酸序列编码T细胞受体 α 链并且选自序列鉴别号027至038,或编码由选自序列鉴别号001至012的氨基酸序列指定的T细胞受体 α 链。

[0062] 在某些实施方案中,核酸序列编码T细胞受体 β 链并且选自序列鉴别号039至050或编码由选自序列鉴别号013至024的氨基酸序列指定的T细胞受体 β 链。

[0063] 在某些实施方案中,MR1 T细胞受体由本文公开的一条 α 链和一条 β 链构成。本发明人出人意料地发现 α 和 β 链可以组合以产生能够识别MR1的功能性TCR分子。

[0064] 在某些实施方案中,MR1T细胞受体由一个 α 链和一个 β 链构成,如以下列表的序列

所指定:

- [0065] a. 序列鉴别号001和序列鉴别号023;
- [0066] b. 序列鉴别号002和序列鉴别号022;
- [0067] c. 序列鉴别号003和序列鉴别号021;
- [0068] d. 序列鉴别号004和序列鉴别号020;
- [0069] e. 序列鉴别号005和序列鉴别号019;
- [0070] f. 序列鉴别号006和序列鉴别号017;
- [0071] g. 序列鉴别号007和序列鉴别号018;
- [0072] h. 序列鉴别号008和序列鉴别号016;
- [0073] i. 序列鉴别号009和序列鉴别号015;
- [0074] j. 序列鉴别号010和序列鉴别号014;
- [0075] k. 序列鉴别号011和序列鉴别号013;
- [0076] l. 序列鉴别号012和序列鉴别号024;或
- [0077] m. 序列鉴别号025和序列鉴别号026;

[0078] 本发明的另一方面涉及一种与非多态性MHC I相关的MR1抗原呈递分子结合的T细胞受体蛋白。MR1分子在肿瘤细胞上表达并呈递肿瘤相关抗原。在某些实施方案中,通过根据本发明第一方面的方法鉴别结合非多态性MHC I相关MR1抗原呈递分子的T细胞受体蛋白。

[0079] 在某些实施方案中,T细胞受体蛋白包含T细胞受体 α 链,其特征在于选自序列鉴别号001至012的氨基酸序列,以及T细胞受体 β 链,其特征在于选自序列鉴别号013至024的氨基酸序列。

[0080] 在某些实施方案中,T细胞受体蛋白包含通过氨基酸序列的序列鉴别号25为表征的T细胞受体 γ 链,和通过氨基酸序列的序列鉴别号26为表征的T细胞受体 δ 链。

[0081] 本发明的另一方面涉及一种重组细胞,其包含如前述段落所述的根据本发明的表达载体和/或根据本发明的T细胞受体多肽。技术人员知道,在表达载体仅包含编码T细胞受体 α 链(或 γ 链)或T细胞受体 β 链(或 δ 链)的核酸序列,而不是两者都包含的情况下,必须将两种不同的表达载体(一种编码 α/γ 链,以及一种编码 β/δ 链)引入重组细胞中,以便使所述细胞能够表达功能性T细胞受体异二聚体。在某些实施方案中,重组细胞是源于外周血的T细胞。在某些实施方案中,重组细胞源于肿瘤浸润淋巴细胞。

[0082] 本发明的另一个方面涉及根据本发明前述方面的重组细胞在癌症治疗或预防方法中的使用。该方法包括施用重组细胞。

[0083] 在某些实施方案中,癌症通过MR1表达为表征。

[0084] 在某些实施方案中,通过过继性T细胞免疫疗法实现该施用。

[0085] 本发明进一步涉及一种治疗或预防癌症复发的方法,包括施用根据本发明的重组细胞。在某些实施方案中,癌症通过MR1表达为表征。

[0086] 在某些实施方案中,通过过继性T细胞免疫疗法实现该施用。

[0087] 本发明还涉及核酸序列的集合,其中该集合的每个成员编码不同的T细胞受体 α 链、T细胞受体 β 链、T细胞受体 γ 链、T细胞受体 δ 链或T细胞受体 α 链和 β 链的组合,或T细胞受体 γ 链和 δ 链的组合,其中所述组合能够特异性结合呈递癌症抗原的MR1分子。核酸序列能

够促进哺乳动物细胞中T细胞受体 α 链、 β 链或 α 和 β 链组合的表达。

[0088] 该收集将用于选定转基因构建体,以转移到从患者收集的T细胞中。在鉴别出最适合在该治疗方法的第一阶段对肿瘤所呈递的一组特定肿瘤抗原发起反应的TCR序列后,医生将需要能够从在GMP下制造的该集合中选定预先产生的表达载体,以快速实现基因转移到患者的T细胞中。

[0089] 在某些实施方案中,该集合包含选自序列鉴别号27至序列鉴别号52的序列,和/或该集合包含编码选自序列鉴别号1至序列鉴别号26的T细胞受体分子(或构成 α 或 β 、或 γ 或 δ 链的T细胞受体)的序列。

[0090] 本发明的另一个方面涉及一种重组T细胞集合,其中该集合的每个成员表达能够与呈递癌抗原的MR1分子特异性结合的T细胞受体作为转基因。在某些实施方案中,该集合包含重组T细胞,该重组T细胞包含根据本发明各自方面的T细胞受体蛋白异二聚体。

[0091] 本发明人鉴别并分离了一种新型人MR1限制性T细胞群体,该群体以MR1依赖性方式对多种肿瘤细胞产生反应。MR1T细胞克隆通常在不同健康个体的血液中发现,表达不同的TCR基因,并且不识别先前鉴别的MR1微生物或叶酸衍生配体。相反,他们认识到从肿瘤细胞中分离并由MR1呈递的各种不同组的未知抗原。目前正在进行与肿瘤细胞相关的刺激性抗原的鉴别和表征。MR1T细胞克隆识别并杀伤不同类型的肿瘤细胞,因此在体外显示出标记的抗肿瘤活性。此外,他们释放Th1、Th2和Th17细胞因子的不同组合,并显示多种趋化因子受体表达谱、表明表型和功能异质性。重要的是,当从各个的MR1T细胞克隆分离的配对的TCR α 和 β 基因或TCR γ 和 δ 基因转移到TCR缺陷的T细胞中时,受体T细胞获得识别表达MR1的肿瘤细胞的能力,从而表明MR1T细胞TCR基因转移对于该类型的肿瘤识别是足够的,并且可以用于指示选定的T细胞识别表达MR1的肿瘤细胞。

[0092] 总之,这些发现揭示了一种新型功能多样的肿瘤反应性人T细胞群,其限于非多态性MR1分子,在肿瘤免疫中具有不同的潜在作用,从而为癌症免疫监测和免疫疗法提供新的概念框架。

[0093] 在本说明书中,使用以下缩写:APC:抗原呈递细胞; β 2m: β 2微球蛋白;Dc:树突状细胞;GM-CSF:粒细胞-巨噬细胞菌落刺激因子;HPLC:高压液相色谱法;IFN- γ :干扰素- γ ; mAb:单克隆抗体;MAIT细胞:粘膜相关的不变T细胞;MHC:主要组织相容性复合体;MR1:MHC I类相关分子;MR1T细胞:MR1限制性T细胞;PBMC:外周血单核细胞;TCR:T细胞受体;TIL:肿瘤浸润淋巴细胞。

[0094] 通过以下示例和附图进一步说明本发明,从中可以得出进一步的实施方案和优点。这些示例旨在说明本发明,但不限制其范围。

附图说明

[0095] 图1.MR1T细胞不识别微生物抗原。(A)CCRFSB、THP-1和A375-MR1细胞对MR1的表面表达。灰色直方图表示用同型匹配的对照mAb染色。在不存在(无Ag)或存在大肠杆菌裂解物(大肠杆菌)和/或抗MR1阻断mAb(α -MR1)的情况下,由三种细胞系在A中刺激(B)MR1T细胞克隆DGB129或(C)MAIT细胞克隆SMC3。MAIT克隆SMC3先前从健康供体的PBMC中分离并表达经典的MAIT表型和功能。柱表示IFN- γ 释放(平均值 $\pm$ SD)。THP-1细胞刺激(D)DGB129 MR1T或(E)SMC3 MAIT细胞,组成型表达表面MR1,载有合成的6,7-二甲基-8-D-核糖基噻(RL-6,7-

二聚体)具有或不具有抗MR1 mAb。柱表示平均IFN- γ 释放+SD。数据代表四个(A、B和C),两个(D和E)。 $*P<0.05$ (非配对学生t检验)。

[0096] 图2.从外周T细胞中分离MR1T细胞克隆的策略。(A)在不存在外源抗原的情况下与A375-MR1细胞过夜共培养后,用经照射的A375-MR1细胞预先扩增的纯化T细胞的FACS分析。左点图显示活细胞中的CD3和细胞追踪紫(CTV)染色。右点图显示CD3阳性CTV阴性门控细胞的CD69和CD137表达。箭头表示门控分馏结构。数字表示门内细胞的百分比。来自供体A的细胞示出为代表性供体。(B,D)从供体A和B筛选的T细胞克隆的累积结果。如A中所示,从CD3⁺CTV⁻CD137⁺分选的T细胞产生T细胞克隆。图表显示各个克隆(x轴)及其IFN- γ 释放(y轴),表示为响应于A375-MR1细胞对A375 WT细胞分泌的细胞因子的量之间的比率。每个点代表单个T细胞克隆,在指定的实验条件下同时测试。垂直线表示显示MR1限制性反应性的T细胞克隆的数量(即显示IFN- γ 释放率高于任意截止值2的克隆)。结果代表两个独立实验。(C,E)在阻断抗MR1 mAb(α -MR1)存在下用A375 WT、A375-MR1和A375-MR1刺激后,供体A和来自供体B的11个克隆的14个代表性克隆释放IFN- γ 。点代表每个克隆的IFN- γ 释放(重复培养物的平均值 $\pm$ SD)。结果代表三个独立实验。 $*P<0.05$ (非配对学生t检验)。

[0097] 图3.MR1T细胞在健康个体的血液中是常见的。(A)在与A375 WT或A375-MR1细胞过夜共培养后,来自代表性供体(供体C)的纯化T细胞的流式血细胞术分析。点图显示活CD3⁺细胞上的CD69和CD137表达。数字表示门中细胞的百分比。(B)与A375 WT或A375-MR1细胞过夜共培养后来自5个不同供体的CD69⁺CD137⁺T细胞的频率。(C)来自供体C的T细胞克隆刺激测定的累积结果。从CD3⁺CD69⁺CD137⁺分选的T细胞产生T细胞克隆,如右点图所示。该图显示了测试克隆的数量(x轴)和IFN- γ 释放(y轴),表示为响应于A375-MR1细胞对A375 WT细胞分泌的细胞因子的量之间的比率。每个点代表单个T细胞克隆,在指定的实验条件下同时测试。垂直线表示显示MR1限制性反应性的T细胞克隆的数量(即显示IFN- γ 释放率高于任意截止值2的克隆)。结果代表两个独立实验。(D)来自供体C的8个代表性MR1限制性T细胞克隆在没有外源抗原的情况下识别A375-MR1但不识别A375 WT细胞。通过阻断抗MR1 mAb(α -MR1)抑制T细胞克隆对A375-MR1细胞的反应性。点代表在三个实验条件下测试的每个克隆的IFN- γ 释放(重复培养物的平均值 $\pm$ SD)。结果代表三个独立实验。 $*P<0.05$ (非配对学生t检验)。

[0098] 图4.MR1T TCR基因转移赋予A375细胞MR1限制性识别。表达具有A375细胞的MAIT MRC25 TCR(J.RT3-MAIT)的表达DGB129 TCR(SKW3-DGB129)和(B)J.RT3-T3.5细胞的(A)SKW-3细胞的刺激表达(A375-MR1)或缺少(A375 WT)MR1,具有或不具有大肠杆菌裂解物和抗MR1 mAb。在存在或不存在抗MR1 mAb的情况下,用A375-MR1或A375 WT细胞表达三种单独MR1T细胞克隆(C)DGA4(SKW3-DGA4)、(D)DGB70(SKW3-DGB70)和(E)JMA(SKW3-JMA)的TCR的SKW-3细胞的刺激。示出了转导的T细胞的重复培养物的CD69中值荧光强度(MFI)+SD。还示出了在不存在APC的情况下培养的转导T细胞的CD69 MFI。当与A375-MR1或A375 WT孵育时,模拟转导的T细胞示出了CD69表达的背景水平(未示出)。数据代表三次独立的实验。 $*P<0.05$ (非配对学生t检验)。

[0099] 图5.MR1T细胞克隆对各种类型肿瘤细胞的鉴别识别。(A)在没有(无Ag)或存在大肠杆菌裂解物(大肠杆菌)的情况下,通过代表性SMC3 MAIT细胞克隆识别表达MR1组成型表面水平的四种人细胞系,该裂解物具有或不具有抗MR1阻断mAb(α -MR1)。(B)通过具有或不

具有抗MR1 mAb (α -MR1) 的13个MR1T细胞克隆识别与A中相同的细胞类型。图表显示IFN- γ 释放(重复培养物的平均值 $\pm$ SD)。

[0100] 图6.MR1T细胞克隆不与微生物配体或6-FP反应。(A) 在存在或不存在大肠杆菌裂解物的情况下,7个MR1T细胞克隆和一个对照MAIT细胞克隆与表达(A375-MR1) 或不表达A375细胞(A375 WT)MR1共培养的反应。还示出了由抗-MR1 mAb (α -MR1) 阻断T细胞克隆反应性。(B) 在6-甲酰蝶呤(6-FP) 存在下,MR1T细胞克隆对表达WT MR1分子(A375-MR1) 或K43A突变的MR1分子(A375-MR1 K43A) 的A375细胞的响应。(C) 用A375-MR1或A375-MR1 K43A细胞刺激对照MAIT细胞克隆MRC25或对照TCR γ 9V δ 2克隆G2B9,该细胞预先分别在不存在或存在6-FP的情况下与大肠杆菌裂解物或唑来膦酸盐一起孵育。结果表示为在重复培养物中测量的IFN- γ 的平均值 $\pm$ SD。结果代表三个独立实验。 $*P<0.05$ (非配对学生t检验)。

[0101] 图7.MR1T细胞克隆不识别Ac-6-FP。(A) 在不存在或存在乙酰基-6-甲酰基蝶呤(Ac-6-FP) 的情况下通过A375-MR1细胞刺激三个代表性MR1T细胞克隆。(B) 在不存在或存在Ac-6-FP的情况下,用大肠杆菌裂解物脉冲的A375-MR1细胞刺激两个MAIT细胞克隆(MRC25和SMC3)。(C) 在不存在或存在Ac-6-FP (25 μ g/ml) 的情况下,用唑来膦酸盐(Zo1) 处理A375-MR1细胞,并用于刺激TCRV γ 9-V δ 2细胞克隆(G2B9)。(D) 在不存在或存在Ac-6-FP (25 μ g/ml) 的情况下,使用表达K43A突变体MR1分子(A375-MR1 K43A) 的A375细胞刺激A中示出的三个MR1T细胞克隆。(E) 在不存在或存在Ac-6-FP (25 μ g/ml) 的情况下,用大肠杆菌裂解物脉冲的A375-MR1 K43A细胞刺激B中使用的两个MAIT细胞克隆。结果表示为在重复培养物中评估的IFN- γ 释放的平均值 $\pm$ SD,并且代表三个独立实验。 $*P<0.05$ (未配对学生的t-检验)。

[0102] 图8.MR1T细胞识别肿瘤细胞中存在的抗原,而不是源自RPMI 1640培养基。通过MR1过表达(A) A375细胞(A375-MR1) 和(B) THP-1细胞(THP1-MR1) 在RPMI 1640或PBS中生长4天刺激DGB129 MR1T细胞克隆,两者都补充有5%的人血清。示出了抗MR1阻断mAb (α -MR1) 对T细胞克隆反应性的抑制。DGB129细胞识别载有分离自(C) THP-1细胞裂解物或来自(D) 体内生长的小鼠乳腺肿瘤EMT6的分馏的APC。分馏E1和E2含有疏水分子;分馏N1至N4含有亲水分子。(E) DGB70 MR1T细胞与THP-1裂解物的N3分馏反应。(F) 通过加载到塑料结合的重组MR1上的THP-1衍生的分馏N3和N4刺激DGB129和DGB70 T细胞。示出了重复培养物的IFN- γ 或GM-CSF平均值 $\pm$ SD的T细胞释放(代表三次独立实验)。总细胞因子释放在组A、组B、组F中示出;在组C、组D、组E中示出了背景上的折叠增加。 $*P<0.05$ (非配对学生的t检验)。

[0103] 图9.MR1T细胞显示出不同的抗肿瘤反应。表达MR1的肿瘤细胞系THP-1和A375与MR1T细胞克隆(A) DGB129或(B) DGB70以指定的效应物:靶向(E:T) 比率培养过夜。该图示出了在各个实验条件下凋亡靶细胞的百分比,通过使用膜联蛋白V和碘化丙啶染色的流式细胞术评估。通过用抗CD3 mAb染色鉴别MR1T细胞并从分析中排除。抗MR1 (α -MR1) mAb对MR1T细胞克隆杀伤能力的抑制也以1:1E:T比例示出。(C) 通过具有或不具有抗MR1mAb (α -MR1) 的13个MR1T细胞克隆从健康个体分离的Mo-DC的识别。图表显示IFN- γ 释放(重复培养物的平均值 $\pm$ SD)。(D) 在不存在或存在抗MR1 (α -MR1) mAb的情况下,由代表性DGB129 MR1T细胞克隆识别来自三个供体的Mo-DC。示出上清液中的IFN- γ 释放并表示为平均值 $\pm$ SD。(E) 与具有或不具有抗MR1mAb (α -MR1) 的DGB129 MR1T细胞共培养后,Mo-DC上的共刺激分子CD83和CD86的流式细胞术分析。还示出了在不存在T细胞的情况下用LPS (10ng/ml) 刺激的Mo-DC组成的对照组。数字表示每个象限中细胞的百分比。(F) 在存在或不存在抗MR1 mAb (α -MR1) 的

情况下通过LS174T和HCT116胃肠道肿瘤细胞系和正常肠上皮细胞(GEC)刺激JMAN MR1T细胞克隆。柱显示IFN- γ 释放(重复培养物的平均值 $\pm$ SD)。所有结果均代表至少三次独立实验。 $*P<0.05$ (未配对学生的t-检验)。

[0104] 图10.MR1T细胞克隆的功能异质性。(A)由用A375-MR1细胞刺激的7个选定的MR1T细胞克隆释放的IFN- γ 。ELISA结果表示为在重复培养物中测量的IFN- γ 释放的平均值 $\pm$ SD。(B)通过对相同上清液进行多重细胞因子测定分析附加的16种细胞因子,其中IFN- γ 显示在A中。结果代表两个独立实验。

[0105] 图11.MR1T细胞克隆显示多种趋化因子受体表达谱。通过七个选定的静息MR1T细胞克隆对CXCR3、CCR4和CCR6表面表达进行流式细胞术分析。图表示出了通过将特定mAb染色的中值荧光强度(MFI)除以相应同型对照的MFI而计算的相对荧光强度。数据代表两个独立实验。

[0106] 图12.MR1T细胞减少小鼠中人黑素瘤肺结节的数量。向免疫失能的NSG小鼠注射表达MR1(A375-MR1)和MR1T细胞的人黑素瘤A375细胞。在第14天,处死小鼠并在印度墨水灌注后计数肺结节。

[0107] $P<0.0001$ (非配对学生的t检验)。

[0108] 表1.选定MR1反应性T细胞克隆的表型。

[0109] 表2.由MR1T细胞识别的肿瘤细胞系列表。

[0110] 示例

[0111] 方法

[0112] 细胞。以下人细胞系获自美国典型培养物保藏中心:A375(黑色素瘤)、THP-1(髓单核细胞白血病)、J.RT3-T3.5(TCR β 缺陷型T细胞白血病)、LS174T(结肠腺癌)、HCT116(结肠癌)、Huh7(肝细胞癌)、HEK 293(人胚肾)和CCRF-SB(急性B细胞淋巴母细胞白血病)。SKW-3细胞(TCR α 、 β 、 γ 和 δ 基因缺陷的人T细胞白血病)获自莱布尼茨研究所DSMZ-德国微生物和细胞培养物保藏中心。两个代表性的MAIT克隆(MRC25和SMC3)和一个TCR γ δ 克隆(G2B9)(Gober等人,《实验医学杂志》197,163-168(2003))在该研究中用作对照细胞,从两个健康供体的血液中产生,并如前所述保持在培养物中(Lepore等人,Nat Commun 5,3866(2014))。MR1T细胞从健康个体的外周血中分离出来,在采集血液时获得献血者的知情同意,并获得“北西伦理委员会和Zentralschweiz/EKNZ(139/13)”的批准。简而言之,通过阴性选定纯化的T细胞(EasySep™人T细胞富集试剂盒,StemCell)每周用辐射(80灰度)A375-MR1细胞(比例2:1)刺激一次,持续三周。人rIL-2(5U/ml;Hoffmann-La Roche),rIL-7和rIL-15(均为5ng/ml,PeproTech)在每次刺激后第+2和+5天加入。最后一次刺激后12天,洗涤细胞并与A375-MR1细胞共培养过夜(比例2:1)。然后CD3+CD69+CD37+细胞在PHA(1 μ g/ml,Wellcome Research Laboratories)、人rIL-2(100U/ml,Hoffmann-La Roche)和辐射PBMC(5×10^5 细胞/ml)存在下通过限制稀释进行分选和克隆。在其他实验中,使用与分选的CD3 $^+$ CD69 $^+$ CD137 $^+$ 相同的方案,在用A375-MR1细胞(比例2:1)进行单次过夜刺激时,产生MR1T细胞克隆。按照相同的方案周期性地再刺激T细胞克隆(Lepore等人,同上)。根据制造商的说明书,使用EasySep人CD14和CD19阳性选定试剂盒(StemCell Technologies)从健康供体的PBMC纯化单核细胞和B细胞(>90%纯度)。如前所述(Lepore等人,同上),通过在GM-CSF和IL-4存在下培养,使Mo-DC与纯化的CD14 $^+$ 单核细胞分化。根据公开的方案(Graves等人,

Journal of immunological methods 414,20-31(2014)) 从无肿瘤个体的肠活组织检查分离人正常肠上皮细胞(GEC)。

[0113] 表达与 $\beta 2m$ 共价联接的MR1A基因的细胞的产生。如前所述(Lepore等人,同上),通过PCR产生经由柔性Gly-Ser接头与 $\beta 2m$ 联接的人MR1A cDNA构建体。使用以下引物将MR1A cDNA中的K43A取代引入融合构建体:MR1K43A_f 5'-CTCGGCAGGCCGAGCCACGGGC(序列鉴别号53)和MR1K43A_r 5'GCCCCGTGGCTCGGCCTGCCGAG(序列鉴别号54)。将得到的WT和突变体构建体克隆到双向慢病毒载体(LV)中(Lepore等人,同上)。根据制造商的说明书,使用Metafectene Pro(Biontex),用单独的LV-MR1A- $\beta 2m$ 构建体与慢病毒包装质粒pMD2.G、pMDLg/pRRE和pRSV-REV(Addgene)一起转染HEK 293细胞。在 $8\mu\text{g/ml}$ 硫酸鱼精蛋白存在下,通过含有病毒颗粒的上清液的自旋感染转导A375和THP-1细胞。通过流式细胞术评估MR1的表面表达,并对阳性细胞进行FACS分选。

[0114] 可溶性重组 $\beta 2m$ -MR1-Fc融合蛋白。使用上述人MR1A- $\beta 2m$ 构建体作为模板获得 $\beta 2m$ -MR1-Fc融合构建体。使用引物: $\beta 2m$ XhoI_f5'-CTCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTA(SEQ ID 55)和MR1-IgG1_r 5'-GTGTGAGTTTGTGCTAGCCTGGGGGACCTG(SEQ ID 56),通过PCR扩增与 $\beta 2m$ -MR1A基因互补的DNA,从而排除MR1跨膜和细胞内结构域。使用以下引物产生与人IgG1重链的铰链区和CH2-CH3结构域互补的DNA:NheI-hinge-f5'-CAGGTCCCCCAGGCTAGCGACAAAACCTCACAC(SEQ ID 57)和IgG1NotI_r 5'-GCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGA(SEQ ID 58)pFUSE-hIgG1-Fc1(InvivoGen)。使用具有重叠延伸PCR的两步剪接将 $\beta 2m$ -MR1A和IgG1 PCR产物连接在一起,并将得到的构建体亚克隆到BCMGsNeo表达载体的XhoI/NotI位点中。使用Metafectene Pro(Biontex)用最终构建体转染CHO-K1细胞,通过有限稀释克隆并通过ELISA筛选以产生 $\beta 2m$ -MR1-Fc融合蛋白。适用于EX-CELL ACF CHO无血清培养基(Sigma)的选定克隆用于蛋白质生产,并且使用Protein-A-Sepharose(Thermo Fisher Scientific)根据制造商说明书纯化 $\beta 2m$ -MR1-Fc。使用抗-MR1 mAb 25.6(Biolegend)通过SDS-PAGE和蛋白质印记验证蛋白质完整性和纯度。

[0115] 流式细胞术和抗体。使用标准方案进行细胞表面标记。根据制造商的说明书使用True-NuclearTM转录因子缓冲液组进行细胞内标记。从Biolegend获得以下抗人mAb:CD4-APC(OKT4)、CD8 α -PE(TuGh4)、CD161-Alexa Fluor 647(HP-3G10)、CD69-PE(FN50)、CD3-PE/Cy7、亮紫-711、或Alexa-700(UCHT1)、CD137-生物素(n4b4-1)、CXCR3-亮紫421(G025H7)、CD83-生物素(HB15e)、MR1-PE(26.5)和TRAV1-2-PE(10C3)。CD86-FITC(2331)、CCR4-PECy7(1G1)和CCR6-PE(11A9)mAb来自BD Pharmingen。所有这些mAb以 $5\mu\text{g/ml}$ 使用。用链霉抗生物素蛋白-PE、-荧光基团488或-亮紫421($2\mu\text{g/ml}$,Biolegend)显示生物素化的mAb。在LSR Fortessa流式细胞仪(Becton Dickinson)上获得样品。使用Influx仪器(Becton Dickinson)进行细胞分选实验。基于前向散射面积和宽度/侧向散射和DAPI染色排除死细胞和双峰。使用FlowJo软件(TreeStar)分析所有数据。

[0116] MR1T细胞克隆的TCR基因分析。MR1T细胞克隆的TCR α 和 β 或基因TCR γ 和 δ 表达通过使用总cDNA和特异性引物的RT-PCR评估,或通过使用根据制造商说明书或pan γ δ TCR特异性单克隆抗体(B1,Biolegend)的IOtest[®]BetaMarkTCRV β Repertoire试剂盒(Beckman Coulter)的流式细胞术来评估。对于RT-PCR,使用NucleoSpin RNA II试剂盒(Macherey Nagel)制备RNA,并使用Superscript III逆转录酶(Invitrogen)合成cDNA。根据制造商的

指导 (TCR分型扩增试剂盒, Clontech), 使用 $V\alpha$ 、 $V\beta$ 、 $V\gamma$ 和 $V\delta$ 组引物扩增TCR α 、 β 、 γ 和 δ cDNA。通过测序鉴别功能性转录物, 然后使用ImMunoGeneTics信息系统 (<http://www.imgt.org>) 进行分析。

[0117] TCR基因转移。将来自MAIT细胞克隆MRC25的TCR α 和 β 功能性cDNA克隆到BCMGSNeo表达载体的XhoI/NotI位点 (Karasuyama和Melchers Eur. J. Immunol. 1988 18:97-104) 和所得的构建体用于根据标准程序通过电穿孔共转染J. RT3-T3.5细胞。将表达TRAV1-2和CD3的转染子进行FACS分选。将来自MR1T克隆的TCR α 和 β 或TCR γ 和 δ 功能性cDNA克隆到质粒52962 (Addgene) 表达载体的修饰版本的XmaI/BamHI位点。用如上所述产生的含病毒颗粒的上清液转导SKW-3细胞。基于CD3表达对细胞进行FACS分选。

[0118] 细胞和整个肿瘤裂解物的分馏。经由轻度超声处理在水中破碎, 从 2.5×10^9 THP-1细胞的单个沉淀物产生总细胞裂解物。然后将超声处理的物质离心 (15,000g, 以4℃持续15分钟), 并收集上清液 (S1)。接下来, 将沉淀重新悬浮在甲醇中, 经超声处理, 如前所述离心, 并将获得的上清液与S1上清液合并。甲醇的最终浓度为10%。然后将总细胞提取物上样到C18 Sep-Pak柱 (Waters Corporation) 上, 收集未结合的物质并干燥 (部分E-FT)。用75% (分馏E1) 和100% 甲醇 (分馏E2) 分批洗脱结合的物质。将E-FT物质重新混悬在乙腈/水 (9:1 体积/体积) 中并装载到NH₂ Sep-Pak柱 (Waters Corporation) 上。用增加量的水洗脱未结合的物质 (分馏N-FT) 和4个附加的分馏。分馏N1用35% H₂O洗脱, 分馏N2用60% H₂O洗脱, 分馏N3用100% H₂O洗脱, 以及分馏N4用100% H₂O和50mM乙酸铵 (pH7.0) 洗脱。将所有分馏干燥, 然后在-70℃下储存之前, 重新混悬于20% 甲醇 (分馏E1、E2和N-FT) 或100% H₂O (所有其他分馏) 中。

[0119] 如所述制备小鼠EMT6乳腺肿瘤 (Zippelius等人, Cancer Immunol Res 3, 236-244 (2015))。将新切除的肿瘤在盐水中充分洗涤、称重, 并使用Dounce组织研磨机将4g质量在7ml HPLC级水中匀浆。肿瘤匀浆经历两次冻-融循环, 在4℃下离心 (3,250g) 10分钟, 收集上清液并储存在-70℃。用2ml HPLC级水第二次提取沉淀, 在4℃下离心 (5,100g) 10分钟, 收集上清液并储存在-70℃下。在室温下通过涡旋将该沉淀物用9ml HPLC级甲醇进一步提取5分钟, 在4℃下离心 (5,100g) 10分钟, 并收集上清液。合并三个上清液, 干燥并重新混悬于水: 甲醇 (10:1) 中。如上所述使用C18和NH₂ Sep-Pak柱分馏物质。

[0120] T细胞活化测定。MR1限制性T细胞 (5×10^4 /孔, 除非另有指明) 与指定的靶细胞 (5×10^4 /孔) 在200 μ l总体积中一式两份或一式三份进行共培养。将T细胞与指定的APC一起培养24小时。在一些实验中, 加入抗MR1 mAb (克隆26.5) 或小鼠IgG2a同型对照mAb (均为30 μ g/ml) 并在加入T细胞之前孵化30分钟。从在LB培养基中生长的DH5 α 菌株 (Invitrogen) 制备大肠杆菌裂解物, 并在指数级生长期间收集。将细菌细胞在PBS中洗涤两次, 然后通过超声处理裂解。离心 (15,000g持续15分钟) 后, 收集上清液、干燥, 并在-70℃下储存。在加入T细胞之前, 用相当于 10^8 CFU/ml (除非另有说明) 的大肠杆菌裂解物将APC脉冲4小时。在一些实验中, 在与T细胞共培养之前, 将APC与6-FP或Ac-6-FP (Schircks Laboratories) 预孵育4小时。在用表达TCRV γ 9和IV δ 2链的TCR γ δ 细胞的对照实验中, 在加入T细胞之前, 首先用唑来膦酸盐 (10 μ g/ml) 处理APC 6小时。通过将 β 2m-MR1-Fc包被在96孔板 (4 μ g/ml) 上并在37℃下用柱纯化的细胞裂解物加载4小时, 用板结合的重组人 β 2m-MR1-Fc进行活化实验, 然后洗涤两次并添加T细胞。24小时后收集上清液, 并通过ELISA评估IFN- γ 或GM-CSF。根据制造商的

说明书,细胞培养上清液中的多种细胞因子和趋化因子使用Milliplex MAP人细胞因子/趋化因子磁珠板-预混合4plex (HCYTMAg-60K-PX41;Merck Millipore)。在Flexmap 3D系统 (Merck Millipore) 上获得样品,并使用Milliplex分析软件确定平均荧光强度和分析物浓度。

[0121] 杀伤肿瘤细胞。在存在或不存在抗MR1 mAb (30 μ g/ml, 克隆26.5) 的情况下,使用靶细胞系 (2×10^4 细胞/ml) 进行杀伤测定,该靶细胞系单独或与不同E/T比例的T细胞孵育24小时。如前所述,靶细胞用PE-膜联蛋白V (BD) 和碘化丙啶 (PI) (Sigma-Aldrich) 染色 (2)。通过用抗CD3 mAb染色鉴别T细胞并从分析中排除。细胞凋亡评估如下:膜联蛋白V⁺PI⁺=晚期凋亡和膜联蛋白V⁺PI⁺=坏死。在不存在T细胞的情况下凋亡+坏死细胞的百分比 (自发凋亡; 没有T细胞) 示出。

[0122] 统计值。使用未配对学生的t检验 (Prism 6, GraphPad软件) 分析数据。

[0123] 鉴别和表征健康供体中新型肿瘤反应性MR1限制性T细胞

[0124] 本发明人检测了在人MAIT细胞库的早期研究期间不与微生物配体反应的非典型MR1限制性T细胞克隆。该T细胞克隆 (DGB129) 识别组成型显示表面MR1的细胞系 (CCRF-SB淋巴细胞白血病细胞, 或THP-1单核细胞白血病细胞; 图1A) 或用MR1基因转染 (A375黑素瘤细胞; A375-MR1; 图1A) 在没有任何外源添加的抗原的情况下 (图1B)。MR1+靶细胞的无菌识别通过用抗MR1单克隆抗体 (mAb) 阻断而受到完全抑制 (图1B), 因此类似于平行评估的MAIT细胞对大肠杆菌衍生抗原的反应 (图1C)。重要的是, DGB129 T细胞也未能识别合成的MAIT细胞激动剂6,7-二甲基-8-D-核糖基噁 (RL-6,7-diMe; 图1D) 与对照MAIT细胞克隆不同, 该克隆通过该化合物以MR1依赖性方式刺激 (图1E)。DGB129细胞不表达典型的MAIT细胞的经典型半不变TCR (表1)。

[0125] 本发明人问起DGB129克隆是否代表不同于微生物反应性MAIT细胞的新型肿瘤反应性MR1限制性T细胞群。因此, 他们建立了一种分离和研究这些不可预测的MR1限制性T细胞的方法。来自两个健康供体的纯化T细胞用增殖标记物CellTrace紫色 (CTV) 标记, 并在不存在外源抗原的情况下用经照射的A375-MR1细胞刺激。用A375-MR1细胞再次攻击增殖细胞, 并通过有限稀释分选和克隆表达高水平活化标记CD137的那些细胞 (图2A)。然后询问各个T细胞克隆识别缺少MR1的A375-MR1和A375细胞 (A375-WT) 的能力。在两个供体中, 本发明人发现主要分馏的T细胞克隆 (分别为126/195和37/57) 显示A375-MR1细胞的特异性识别 (图2B、图D), 其被抗MR1阻断mAb抑制 (图2C、图E)。用12个MR1反应性T细胞克隆的TCR V β 特异性mAb染色显示它们表达7种不同的TRBV链 (TRBV4-3、6-5/6-6/6-9、9、18、25-1、28、29-1) 其中一些克隆共享相同的TRBV基因。此外, 没有一个表达TRAV1-2链, 对MAIT细胞来说是经典的。

[0126] 缺乏特异性标记物不允许通过标准流式细胞术在体外单独鉴别这些新型T细胞。因此, 通过在非常短时间的体外刺激和单个T细胞克隆实验之后组合流式细胞术分析来估计其频率。将来自五个健康供体的纯化的血液T细胞与MR1缺陷的或MR1足够的A375细胞共培养过夜, 并分析活化标记物CD69和CD137的表达 (图3A)。在筛选的所有五个供体中, 用A375-MR1细胞 (范围为T细胞的0.034-0.072%) 刺激后检测到的CD69⁺CD137⁺T细胞百分比始终高于与A375-WT细胞共培养后的百分比 (范围为0.015-0.032%) (图3A、图B)。由于两种类型的APC对MR1表达不同, MR1反应性T细胞在用MR1阳性APC刺激后导致活化的T细胞数量增

加。使用该方法,本发明人估计所分析的个体的循环T细胞库含有A375-MR1反应性T细胞,频率范围在1:2,500 ($0.072-0.032=0.04\%$) 和1:5,000 ($0.034-0.015=0.019$) 之间。该估计频率高于抗原暴露后肽特异性CD4⁺T细胞的频率(Lucas等人,J Virol 78:7284-7287;Su等人,Immunity 38:373-383)。这些观察结果得到平行实验的支持,其中克隆了来自这些供体之一(供体C,图3A,右图)的分选的CD69⁺CD137⁺过夜活化的T细胞。实际上,96个筛选的T细胞克隆中的31个(32%)显示出对A375-MR1细胞的特异性反应性(图3C),其被抗MR1 mAb抑制(图3D)。因此,该供体的血液T细胞中计算出的A375-MR1反应性T细胞的频率为1:5,000 ($0.065\times 0.32=0.02\%$),该值与估计范围一致。对来自三个供体的代表性T细胞克隆的详细分析证实其显示出不同的TCR α 和 β 链,并且表明CD4、CD8和CD161的差异表达(表1)。

[0127] 总的来说,这些发现表明,所鉴别的肿瘤反应性MR1限制性T细胞是健康人个体(下文称为MR1T细胞)血液中新的但常见的淋巴细胞多克隆群。

[0128] MR1T细胞TCR基因转移赋予MR1限制的肿瘤细胞识别

[0129] 本发明人接下来研究了MR1T细胞对肿瘤细胞的反应性是否由TCR介导。在TCR缺陷的SKW-3细胞中克隆来自不同MR1T细胞克隆的成对TCR α 和 β 基因的表达,赋予肿瘤细胞的MR1识别,其与原始MR1T细胞显示的类似,并且被抗MR1-mAb完全阻断(图4A-图C)。在对照实验中,代表性MAIT细胞克隆的TCR α 和 β 基因的转移赋予了仅在存在大肠杆菌抗原的情况下以MR1依赖性方式识别A375-MR1细胞的能力(图4D)。这些数据突出了TCR在介导肿瘤细胞的MR1T细胞识别中的关键作用,并且表明MR1T细胞TCR基因转移可以有效地将选定的T细胞的反应性重定向至表达MR1的肿瘤细胞。

[0130] MR1T细胞克隆对肿瘤细胞的鉴别识别

[0131] 已经产生了大量的MR1T细胞克隆与表达MR1的A375黑素瘤细胞反应,本发明人接下来研究了其是否也能识别组成型表达表面MR1的其他类型的肿瘤细胞,包括THP-1髓单核细胞、Huh7肝细胞瘤细胞、HCT116结肠癌细胞和LS 174T杯状结肠腺癌细胞。所有这些细胞类型在微生物抗原存在下以MR1依赖性方式支持MAIT细胞活化(图5A)。相同的细胞能够在不同程度上诱导选定的MR1T细胞克隆的无菌活化。大多数测试的MR1T细胞克隆识别THP-1细胞,随后是Huh7肝细胞瘤细胞、LS174T杯状细胞和HCT116结肠癌细胞(图5B)。重要的是,所有反应都被抗MR1 mAb阻断。

[0132] 这些数据进一步证实MR1T细胞是限于非多态性抗原呈递分子MR1的肿瘤反应性T细胞的新型和异质群体。

[0133] MR1T细胞识别肿瘤细胞中存在的MR1结合抗原

[0134] 本发明人接下来研究了MR1T细胞对肿瘤细胞的反应性的基础。首先,他们寻求明确排除MR1T细胞克隆能够识别微生物抗原的可能性,这类似于MAIT细胞。而对照MAIT细胞克隆仅在大肠杆菌裂解物存在下与A375-MR1细胞反应,不同的MR1T细胞克隆的活化没有被大肠杆菌裂解物增强(图6A)。与这些数据一致,MR1阴性的A375-WT细胞未能刺激任何类型的T细胞,无论大肠杆菌裂解物是否加入(图6A),重要的是抗-MR1 mAb有效阻断MR1T和MAIT细胞两者反应(图6A)。这些发现证实了存在于大肠杆菌中并刺激MAIT细胞的微生物配体不会刺激测试的MR1T细胞。

[0135] 然后,本发明人测试了MR1T细胞对已知的MR1配体6-FP和Ac-6-FP的反应,其先前已报道刺激TRAV1-2阴性T细胞的稀有亚组并抑制微生物抗原的MAIT细胞活化。在存在6-FP

或Ac-6-FP配体的情况下MR1T细胞刺激受损,其也损害了大肠杆菌对对照MAIT细胞的刺激,但不破坏由相同APC呈递的对同源抗原的对照TCR $\gamma\delta$ 细胞反应,因此排除了化合物毒性(图6B、图C和图7A至图C)。值得注意的是,当转录靶A375细胞以表达具有缺陷配体结合能力的突变MR1分子时,6-FP或Ac-6-FP未能抑制MR1T细胞或MAIT细胞的活化(通过赖氨酸43突变为丙氨酸,A375-MR1 K34A,用配体阻断席夫碱的形成;图6B、图C和图7D、图E)。用6-FP或Ac-6-FP观察到的特异性抑制表明MR1T细胞i) 不识别6-FP和Ac-6-FP;ii) 与MR1结合的细胞抗原反应;和iii) 受不需要与MR1形成希夫碱的配体刺激。

[0136] 为了获得关于识别的抗原的起源的进一步信息,本发明人问起肿瘤靶细胞的刺激能力是否依赖于培养基成分,因为一些MR1配体,例如6-FP可以源自用于细胞培养的RPMI 1640培养基中存在的叶酸。将THP-1和A375-MR1细胞彻底洗涤并在仅补充有5%人血清的磷酸盐缓冲盐水溶液(PBS)中培养4天。每天洗涤细胞,然后用于刺激DGB129 MR1T细胞,并在PBS中进行T细胞活化测定。在RPMI 1640或PBS中生长的THP-1和A375-MR1细胞显示相同的刺激能力(图8A、图B),因此表明培养基成分不负责MR1T细胞活化。为了直接研究刺激性抗原是否存在于靶肿瘤细胞中,本发明人然后使用两种类型的肿瘤裂解物作为抗原来源进行T细胞活化测定。第一裂解物从体外培养的THP-1细胞获得,而第二裂解物是在切除后立即从小鼠乳腺肿瘤制备的。获得两种疏水性和四种亲水性分馏,并使用组成型表达低水平MR1的THP-1细胞作为APC进行测试。DGB129克隆仅与部分N4反应,其含有从新鲜移植的小鼠肿瘤和体外培养的THP-1细胞两者分离的高度亲水性化合物(图8C、图D)。这些结果排除了刺激性抗原来源于RPMI 1640成分并表明其细胞来源的可能性。本发明人还用另一种代表性MR1T细胞克隆DGB70测试了THP-1裂解物产生的分馏。DGB70细胞识别分馏N3而不识别分馏N4(图8E),表明至少两种不同的复合物差异刺激两种MR1T克隆。将相同的分馏加载到塑料结合的MR1分子上并显示出替代和特异性刺激能力,即N3仅刺激DGB70细胞,而N4仅刺激DGB129细胞(图8F)。在不存在N3和N4分馏的情况下,两个克隆不与MR1反应,进一步表明需要特异性抗原。

[0137] 总之,这些数据表明MR1T细胞识别与不是源自培养基的配体复合的MR1,并且也存在于体内生长的肿瘤细胞中。

[0138] MR1T细胞显示出不同的抗肿瘤反应

[0139] 为了评估MR1T细胞的抗肿瘤活性,本发明人测试了其在体外直接杀伤肿瘤细胞的能力。两种代表性的MR1T细胞克隆(DGB129和DGB70)以各种效应子:靶比例有效杀伤表达MR1的THP-1和A375细胞两者(图9A、图B)。对照MAIT细胞克隆未能杀伤这两种细胞类型,尽管当靶向被大肠杆菌感染时其完全能够杀伤(未示出)。这些结果表明MR1T细胞显示出对表达MR1的肿瘤细胞的特异性细胞毒活性。

[0140] 已经发现MR1 T细胞识别并杀伤了髓单核细胞肿瘤细胞系THP-1,本发明人接下来解决了其是否也能识别正常骨髓细胞,这包括来自不同供体的单核细胞和单核细胞衍生的树突细胞(Mo-DC)。任何测试的MR1T细胞克隆都未识别单核细胞(未示出)。相反,一些MR1T细胞克隆以MR1依赖性方式与Mo-DC反应(图9C)。有趣的是,用代表性DGB129 MR1T细胞克隆进行的实验表明,Mo-DC的识别不会导致Mo-DC杀伤(未示出),而是通过Mo-DC促进CD83和CD86活化标记物的上调(图9D)。值得注意的是,抗-MR1 mAb完全抑制了DGB129细胞诱导的Mo-DC的活化(图9D)。这些数据表明,一些肿瘤反应性MR1T细胞引发直接的抗肿瘤活性并且

还促进先天免疫细胞的活化,这对建立有效的抗肿瘤免疫应答具有重要意义。

[0141] 当本发明人观察到一些MR1T细胞克隆与HCT116和LS174T肠肿瘤细胞反应时,他们接下来研究其是否也能识别从肠道活组织检查制备的正常肠上皮细胞(GEC)。GEC细胞对任何测试的HCT116或LS174T反应性MR1T细胞克隆都没有刺激作用(图9F),因此表明MR1T细胞克隆可能显示胃肠道肿瘤细胞的特异性识别而不对正常肠上皮细胞产生反应。

[0142] 为了进一步评估MR1T细胞识别肿瘤的特异性,本发明人最终研究了它们是否能与其他类型的正常细胞反应,包括嗜中性粒细胞、NK细胞、B细胞和T细胞。这些细胞中没有一种被测试的MR1T细胞识别(未示出)。

[0143] 总的来说,这些数据将MR1T细胞鉴别为人MR1限制性T淋巴细胞的新型和异质群体,其i)对各种类型的肿瘤细胞不同反应;ii)显示对肿瘤细胞的细胞毒活性;iii)不识别正常细胞体外-分化的Mo-DC和iv)不会杀伤Mo-DC而是诱导其活性。这些发现表明MR1T细胞显示出重要的抗肿瘤特性,并且值得开发用于其免疫治疗潜力。

[0144] MR1T细胞在功能上是异质的

[0145] 本发明人最终分析了A375-MR1肿瘤细胞刺激后代表性MR1T细胞克隆的细胞因子分泌谱。测试的所有克隆释放IFN- γ (图10A)。然而,本发明人还观察到Th1(IL-2、TNF- α 和TNF- β)、Th2(IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13)和Th17细胞因子(IL-17A、G-CSF、GM-CSF)和其他可溶性因子(MIP-1 β 、可溶性CD40L PDGF-AA和VEGF的不同表达谱;图10B)。由MR1T细胞表达的细胞因子的可变组合和数量表明该群体内具有相当大的功能可塑性。例如,克隆DGA4分泌大量IL-17A、IL-6、TNF- α 和GM-CSF,但未能分泌原型Th2细胞因子IL-4、IL-5、IL-10或IL-13,因此显示出'非典型'Th17样表型。相反,克隆TC5A87释放了大量的VEGF和PDGF-AA,但只有少量的Th1或Th2细胞因子,而没有IL-17A。值得注意的是,研究的7个克隆中的4个(DGB129、CH9A3、DGB70、JMA)显示出细胞因子释放的Th2-偏斜特征,这是最近与保护性抗肿瘤免疫相关的功能表型。

[0146] 本发明人接下来研究了已知由具有不同功能的T细胞亚组差异表达的三种选定趋化因子受体的表达,并且其替代组合表达调节T细胞再循环和向不同归巢位点的迁移。除DGA4外,所有MR1T细胞克隆显示高水平的CXCR3(图11)。此外,本发明人观察到CCR4和CCR6的不同表达模式(图11),这进一步表明MR1T细胞是异质的。

[0147] 在最后一系列研究中,研究了MR1T细胞是否使用肺实体肿瘤模型在体内维持其肿瘤杀伤能力。静脉内注射表达MR1的A375黑素瘤细胞的小鼠接受DGB129细胞或不处理。在第14天,处死小鼠并计算肺中肿瘤结节的数目。虽然未处理的小鼠显示200至250个结节,但用MR1T细胞处理的小鼠显示1-6个结节(图12)。这些结果证实,体内生长的肿瘤细胞产生刺激MR1T细胞的抗原。重要的是,它们提供了MR1T细胞体内杀伤实体瘤细胞的有效能力的有力证据。

[0148] 总之,这些数据表明,此处测试的肿瘤MR1反应性T克隆在表型上和功能上是多样的,因此表明MR1T细胞包括具有不同再循环模式和组织归巢能力的多个亚组,并且可能在肿瘤免疫中具有不同的作用。最后,这些数据将MR1T细胞鉴别为识别MR1:肿瘤相关抗原复合物并可参与具有多种效应功能的抗肿瘤免疫应答的人T淋巴细胞的新群体。

[0149] 表1. 选定MR1反应性T细胞克隆的表型。

	克隆	CD4	CD8 α	CD161	TCR β
	DGB129	-	+	-	TRBV12-4
	DGB70	-	-	-	TRBV28
[0150]	DGA28	-	+	+	TRBV29-1
	DGA4	-	-	+	TRBV6-1
	JMA	-	+	-	TRBV25-1
	TC5A87	-	+	-	TRBV25-1
[0151]	CH9A3	-	+	-	TRBV5-5

[0152] 表2。由人MR1T细胞识别的肿瘤细胞系。

细胞系	起源
-----	----

A375: 人黑色素瘤

CCRF-SB: 人 B 淋巴细胞白血病

[0153] Huh7: 人肝细胞癌

HCT116: 人结肠癌

LS 174T: 人结肠腺癌

THP-1: 人髓单核细胞白血病

[0154] 以下示例进一步说明了应用本发明的临床工作流程: 筛选表达MR1的癌症

[0155] 使用对人MR1特异的mAb和MR1 mRNA的PCR扩增分析癌症患者的组织新鲜或新鲜冷冻组织活检组织的MR1表达。

[0156] 癌症治疗, 示例1: 选定用于识别表达原代MR1的癌细胞的最佳MRT1 TCR基因。

[0157] -分离体外的原代MR1⁺癌细胞用于刺激先前表征的MR1T细胞克隆的库。每个克隆表达不同的TCR基因并识别不同类型的癌细胞。

[0158] -选定对患者的癌细胞最佳反应的MR1T细胞克隆, 并将其TCR基因用于TCR基因疗法。根据细胞因子释放和/或表面标记物表达测定反应。通过内部(细胞因子)或表面标记染色用对测定的活化标记物具有反应性的抗体测定细胞, 例如但不限于CD3、CD69、CD137、CD150和/或ICOS(表面标记物)和INF- γ 以及GM-CSF(细胞因子)。

[0159] -当可用的可溶性MR1T TCR将被多聚化并用于染色从肿瘤活组织检查分离的肿瘤细胞。与肿瘤细胞结合的MR1T TCR多聚体将允许快速选定适合该患者的基因疗法的MR1T TCR。

[0160] -几种循环的患者T细胞群可用作受体T细胞 (**Naïve**、中枢记忆、效应记忆、CD4⁺、CD8⁺或CD4, CD8双阴性T细胞)。选定**Naïve** T细胞, 当其被识别MR1-肿瘤抗原的TCR基因转导时, 允许未标记的T淋巴细胞在肿瘤细胞存在下成熟。使用中枢和效应记忆细胞是因为它们在识别表达MR1的肿瘤细胞时提供即时增殖和效应功能(肿瘤杀伤)。选定CD4细胞以提供足够数量的T辅助细胞, 其促进具有抗肿瘤功能的其他细胞的生长和扩增。选定CD8 T细胞以促进肿瘤细胞的杀伤。选定CD4至CD8双阴性T细胞用于其先天样功能, 诸如立即释放大量杀伤效应分子(TNF α 、颗粒酶和颗粒溶素)。

[0161] -表达转导的TCR基因和具有选定的效应子功能的T细胞用于过继细胞疗法(ACT)。

[0162] 来自患者外周血的T细胞用对表面标记物(CD4、CD8、CD27、CD45RA、CD57)特异的单克隆抗体染色并分选。用Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 (ThermoFisher) 激活每个分选的群体, 并在24小时后用编码为个体患者选定的MR1T TCR的TCR基因转染。这产生了修饰的T细胞制剂(受体T细胞)。在一些情况下, 受体T细胞也通过基因编辑方法修饰以失活PD1、ILT2和ILT4抑制基因或用CD137和CD134基因转导以促进细胞存活、细胞扩增和增强抗癌效应子功能。

[0163] 受体的癌症患者使用非清髓性化疗制备方案(60mg/kg环磷酰胺施用2天; 2525mg/m²氟达拉滨施用5天)进行淋巴细胞清除, 随后将T细胞和IL-2转移至耐受性720,000IU/kg。在某些情况下, 200或1200厘戈瑞(cGy; 1Gy=100拉德)将全身照射加入制备方案中。将表达MR1T外源TCR基因(修饰的T细胞制剂)的T细胞转移到受体中。

[0164] 将TCR基因克隆到安全的重组慢病毒载体中(参见例如Provasi等人, Nat Med 18, 807-815(2012)), 其含有自杀基因并且在不存在其他辅助病毒的情况下不能产生成熟的病毒颗粒。在一些情况下, 将TCR基因克隆到含有自杀基因的载体中(例如, 参见Greco等人, Front Pharmacol 6, 95(2015)), 从而降低了由不需要的基因插入引起的风险。在一些情况下, 编码TCR MR1T基因的RNA在受体细胞中转染(参见例如Zhao等人。分子疗法13, 151, 2006))。

[0165] 癌症疗法, 示例2:从待治疗患者的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中分离MR1T细胞。

[0166] -根据我们先前建立的方案(De Libero, 同上), 从癌组织活组织检查制备自体TIL。

[0167] -使用补充有IL-2、IL-7和IL-15的培养基, 在体外扩增T细胞2至3周。

[0168] -测试扩增的T细胞对自体MR1⁺癌细胞的反应性。增加活化标记物(CD137、CD150、CD69、ICOS)表面表达的T细胞被认为是癌症特异性的, 如果它们被抗MR1单克隆抗体的存在所抑制, 则它们被认为是MR1依赖性的。

[0169] -如上所述, 癌症反应性T细胞根据上述活化标记物之一的表达进行分选, 并扩增以及用于ACT。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 巴塞尔大学
 [0003] <120> 用于癌症免疫疗法的MR1限制性T细胞受体
 [0004] <130> uz254wo
 [0005] <160> 58
 [0006] <170> PatentIn 版本 3.5
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 267
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 人类
 [0011] <400> 1
 [0012] Met Trp Gly Val Phe Leu Leu Tyr Val Ser Met Lys Met Gly Gly Thr
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Thr Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly
 [0015] 20 25 30
 [0016] Ala Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly
 [0017] 35 40 45
 [0018] Leu Phe Trp Tyr Gln Gln His Ala Gly Glu Ala Pro Thr Phe Leu Ser
 [0019] 50 55 60
 [0020] Tyr Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Leu Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Glu Leu Gln
 [0023] 85 90 95
 [0024] Met Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys Ala Val Met Asp Ser Ser Tyr
 [0025] 100 105 110
 [0026] Lys Leu Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Leu Val Arg Pro Asp Ile
 [0027] 115 120 125
 [0028] Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser
 [0029] 130 135 140
 [0030] Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val
 [0031] 145 150 155 160
 [0032] Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu
 [0033] 165 170 175
 [0034] Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser
 [0035] 180 185 190
 [0036] Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile
 [0037] 195 200 205
 [0038] Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys

[0039]	210	215	220
[0040]	Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn		
[0041]	225	230	235 240
[0042]	Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe		
[0043]	245	250	255
[0044]	Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0045]	260	265	
[0046]	<210> 2		
[0047]	<211> 271		
[0048]	<212> PRT		
[0049]	<213> 人类		
[0050]	<400> 2		
[0051]	Met Leu Leu Ile Thr Ser Met Leu Val Leu Trp Met Gln Leu Ser Gln		
[0052]	1	5	10 15
[0053]	Val Asn Gly Gln Gln Val Met Gln Ile Pro Gln Tyr Gln His Val Gln		
[0054]	20	25	30
[0055]	Glu Gly Glu Asp Phe Thr Thr Tyr Cys Asn Ser Ser Thr Thr Leu Ser		
[0056]	35	40	45
[0057]	Asn Ile Gln Trp Tyr Lys Gln Arg Pro Gly Gly His Pro Val Phe Leu		
[0058]	50	55	60
[0059]	Ile Gln Leu Val Lys Ser Gly Glu Val Lys Lys Gln Lys Arg Leu Thr		
[0060]	65	70	75 80
[0061]	Phe Gln Phe Gly Glu Ala Lys Lys Asn Ser Ser Leu His Ile Thr Ala		
[0062]	85	90	95
[0063]	Thr Gln Thr Thr Asp Val Gly Thr Tyr Phe Cys Ala Ala Ala Gly Gly		
[0064]	100	105	110
[0065]	Thr Ser Tyr Gly Lys Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Ile Leu Thr Val		
[0066]	115	120	125
[0067]	His Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp		
[0068]	130	135	140
[0069]	Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser		
[0070]	145	150	155 160
[0071]	Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp		
[0072]	165	170	175
[0073]	Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala		
[0074]	180	185	190
[0075]	Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn		
[0076]	195	200	205
[0077]	Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser		

[0078]	210	215	220
[0079]	Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu		
[0080]	225	230	235
[0081]	Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys		
[0082]	245	250	255
[0083]	Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0084]	260	265	270
[0085]	<210> 3		
[0086]	<211> 277		
[0087]	<212> PRT		
[0088]	<213> 人类		
[0089]	<400> 3		
[0090]	Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu		
[0091]	1	5	10
[0092]	Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser		
[0093]	20	25	30
[0094]	Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser		
[0095]	35	40	45
[0096]	Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu		
[0097]	50	55	60
[0098]	Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln		
[0099]	65	70	75
[0100]	Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg		
[0101]	85	90	95
[0102]	Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu		
[0103]	100	105	110
[0104]	Thr Trp Thr Asp Arg Gly Ser Thr Leu Gly Arg Leu Tyr Phe Gly Arg		
[0105]	115	120	125
[0106]	Gly Thr Gln Leu Thr Val Trp Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala		
[0107]	130	135	140
[0108]	Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu		
[0109]	145	150	155
[0110]	Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser		
[0111]	165	170	175
[0112]	Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp		
[0113]	180	185	190
[0114]	Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala		
[0115]	195	200	205
[0116]	Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe		

[0117]	210	215	220
[0118]	Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe		
[0119]	225	230	235
[0120]	Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe		
[0121]	245	250	255
[0122]	Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu		
[0123]	260	265	270
[0124]	Arg Leu Trp Ser Ser		
[0125]	275		
[0126]	<210> 4		
[0127]	<211> 280		
[0128]	<212> PRT		
[0129]	<213> 人类		
[0130]	<400> 4		
[0131]	Met Ala Met Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Ile Leu Trp Leu Gln Thr		
[0132]	1	5	10
[0133]	Asp Trp Val Asn Ser Gln Gln Lys Asn Asp Asp Gln Gln Val Lys Gln		
[0134]	20	25	30
[0135]	Asn Ser Pro Ser Leu Ser Val Gln Glu Gly Arg Ile Ser Ile Leu Asn		
[0136]	35	40	45
[0137]	Cys Asp Tyr Thr Asn Ser Met Phe Asp Tyr Phe Leu Trp Tyr Lys Lys		
[0138]	50	55	60
[0139]	Tyr Pro Ala Glu Gly Pro Thr Phe Leu Ile Ser Ile Ser Ser Ile Lys		
[0140]	65	70	75
[0141]	Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg Phe Thr Val Phe Leu Asn Lys Ser Ala		
[0142]	85	90	95
[0143]	Lys His Leu Ser Leu His Ile Val Pro Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala		
[0144]	100	105	110
[0145]	Val Tyr Phe Cys Ala Ala Ser Leu Tyr Asn Gln Gly Gly Lys Leu Ile		
[0146]	115	120	125
[0147]	Phe Gly Gln Gly Thr Glu Leu Ser Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro		
[0148]	130	135	140
[0149]	Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser		
[0150]	145	150	155
[0151]	Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser		
[0152]	165	170	175
[0153]	Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg		
[0154]	180	185	190
[0155]	Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser		

[0156]	195	200	205
[0157]	Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp		
[0158]	210	215	220
[0159]	Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu		
[0160]	225	230	235
[0161]	Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val		
[0162]	245	250	255
[0163]	Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu		
[0164]	260	265	270
[0165]	Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0166]	275	280	
[0167]	<210> 5		
[0168]	<211> 274		
[0169]	<212> PRT		
[0170]	<213> 人类		
[0171]	<400> 5		
[0172]	Met Glu Lys Asn Pro Leu Ala Ala Pro Leu Leu Ile Leu Trp Phe His		
[0173]	1	5	10
[0174]	Leu Asp Cys Val Ser Ser Ile Leu Asn Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser		
[0175]	20	25	30
[0176]	Leu His Val Gln Glu Gly Asp Ser Thr Asn Phe Thr Cys Ser Phe Pro		
[0177]	35	40	45
[0178]	Ser Ser Asn Phe Tyr Ala Leu His Trp Tyr Arg Trp Glu Thr Ala Lys		
[0179]	50	55	60
[0180]	Ser Pro Glu Ala Leu Phe Val Met Thr Leu Asn Gly Asp Glu Lys Lys		
[0181]	65	70	75
[0182]	Lys Gly Arg Ile Ser Ala Thr Leu Asn Thr Lys Glu Gly Tyr Ser Tyr		
[0183]	85	90	95
[0184]	Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys		
[0185]	100	105	110
[0186]	Ala Ser Gly Asp Ser Gly Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser		
[0187]	115	120	125
[0188]	Leu Leu Val Thr Pro His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln		
[0189]	130	135	140
[0190]	Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp		
[0191]	145	150	155
[0192]	Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr		
[0193]	165	170	175
[0194]	Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser		

[0195]	180							185							190						
[0196]	Asn	Ser	Ala	Val	Ala	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn					
[0197]	195							200							205						
[0198]	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro					
[0199]	210							215							220						
[0200]	Glu	Ser	Ser	Cys	Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp					
[0201]	225							230							235						
[0202]	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu					
[0203]	245							250							255						
[0204]	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp					
[0205]	260							265							270						
[0206]	Ser	Ser																			
[0207]	<210> 6																				
[0208]	<211> 276																				
[0209]	<212> PRT																				
[0210]	<213> 人类																				
[0211]	<400> 6																				
[0212]	Met	Asn	Tyr	Ser	Pro	Gly	Leu	Val	Ser	Leu	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly					
[0213]	1 5 10 15																				
[0214]	Arg	Thr	Arg	Gly	Asn	Ser	Val	Thr	Gln	Met	Glu	Gly	Pro	Val	Thr	Leu					
[0215]	20 25 30																				
[0216]	Ser	Glu	Glu	Ala	Phe	Leu	Thr	Ile	Asn	Cys	Thr	Tyr	Thr	Ala	Thr	Gly					
[0217]	35 40 45																				
[0218]	Tyr	Pro	Ser	Leu	Phe	Trp	Tyr	Val	Gln	Tyr	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Gln					
[0219]	50 55 60																				
[0220]	Leu	Leu	Leu	Lys	Ala	Thr	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly					
[0221]	65 70 75 80																				
[0222]	Phe	Glu	Ala	Thr	Tyr	Arg	Lys	Glu	Thr	Thr	Ser	Phe	His	Leu	Glu	Lys					
[0223]	85 90 95																				
[0224]	Gly	Ser	Val	Gln	Val	Ser	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Leu	Thr					
[0225]	100 105 110																				
[0226]	Ile	Trp	Asp	Tyr	Gly	Gly	Ser	Gln	Gly	Asn	Leu	Ile	Phe	Gly	Lys	Gly					
[0227]	115 120 125																				
[0228]	Thr	Lys	Leu	Ser	Val	Lys	Pro	Asn	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val					
[0229]	130 135 140																				
[0230]	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe					
[0231]	145 150 155 160																				
[0232]	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp					
[0233]	165 170 175																				

[0234]	Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe		
[0235]		180	185 190
[0236]	Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys		
[0237]		195	200 205
[0238]	Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro		
[0239]		210	215 220
[0240]	Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu		
[0241]		225	230 235 240
[0242]	Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg		
[0243]		245	250 255
[0244]	Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg		
[0245]		260	265 270
[0246]	Leu Trp Ser Ser		
[0247]		275	
[0248]	<210> 7		
[0249]	<211> 269		
[0250]	<212> PRT		
[0251]	<213> 人类		
[0252]	<400> 7		
[0253]	Met Val Leu Lys Phe Ser Val Ser Ile Leu Trp Ile Gln Leu Ala Trp		
[0254]	1	5	10 15
[0255]	Val Ser Thr Gln Leu Leu Glu Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ser Ile Gln		
[0256]		20	25 30
[0257]	Glu Gly Glu Asn Leu Thr Val Tyr Cys Asn Ser Ser Ser Val Phe Ser		
[0258]		35	40 45
[0259]	Ser Leu Gln Trp Tyr Arg Gln Glu Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu		
[0260]		50	55 60
[0261]	Val Thr Val Val Thr Gly Gly Glu Val Lys Lys Leu Lys Arg Leu Thr		
[0262]	65	70	75 80
[0263]	Phe Gln Phe Gly Asp Ala Arg Lys Asp Ser Ser Leu His Ile Thr Ala		
[0264]		85	90 95
[0265]	Ala Gln Pro Gly Asp Thr Gly Leu Tyr Leu Cys Ala Gly Glu Asn Ser		
[0266]		100	105 110
[0267]	Gly Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro		
[0268]		115	120 125
[0269]	His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys		
[0270]		130	135 140
[0271]	Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr		
[0272]		145	150 155 160

[0273]	Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
[0274]	165 170 175
[0275]	Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
[0276]	180 185 190
[0277]	Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
[0278]	195 200 205
[0279]	Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
[0280]	210 215 220
[0281]	Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
[0282]	225 230 235 240
[0283]	Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
[0284]	245 250 255
[0285]	Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0286]	260 265
[0287]	<210> 8
[0288]	<211> 275
[0289]	<212> PRT
[0290]	<213> 人类
[0291]	<400> 8
[0292]	Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu
[0293]	1 5 10 15
[0294]	Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asp Pro Gly Pro
[0295]	20 25 30
[0296]	Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Val Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser
[0297]	35 40 45
[0298]	Asn Ser Ala Phe Gln Tyr Phe Met Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Arg Lys
[0299]	50 55 60
[0300]	Gly Pro Glu Leu Leu Met Tyr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Lys Glu Asp
[0301]	65 70 75 80
[0302]	Gly Arg Phe Thr Ala Gln Val Asp Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ser Leu
[0303]	85 90 95
[0304]	Phe Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
[0305]	100 105 110
[0306]	Met Ser Leu Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr
[0307]	115 120 125
[0308]	Ser Leu Ile Val His Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr
[0309]	130 135 140
[0310]	Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr
[0311]	145 150 155 160

[0312]	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val
[0313]					165					170					175	
[0314]	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Thr	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys
[0315]					180					185					190	
[0316]	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala
[0317]					195					200					205	
[0318]	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser
[0319]					210					215					220	
[0320]	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys	Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr
[0321]	225															240
[0322]	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile
[0323]					245										255	
[0324]	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu
[0325]					260					265					270	
[0326]	Trp	Ser	Ser													
[0327]					275											
[0328]	<210>	9														
[0329]	<211>	275														
[0330]	<212>	PRT														
[0331]	<213>	人类														
[0332]	<400>	9														
[0333]	Met	Leu	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Ile	Ile	Leu	Trp	Met	Gln	Leu	Thr	Trp
[0334]	1				5					10					15	
[0335]	Val	Ser	Gly	Gln	Gln	Leu	Asn	Gln	Ser	Pro	Gln	Ser	Met	Phe	Ile	Gln
[0336]					20					25				30		
[0337]	Glu	Gly	Glu	Asp	Val	Ser	Met	Asn	Cys	Thr	Ser	Ser	Ser	Ile	Phe	Asn
[0338]					35					40				45		
[0339]	Thr	Trp	Leu	Trp	Tyr	Lys	Gln	Asp	Pro	Gly	Glu	Gly	Pro	Val	Leu	Leu
[0340]					50					55				60		
[0341]	Ile	Ala	Leu	Tyr	Lys	Ala	Gly	Glu	Leu	Thr	Ser	Asn	Gly	Arg	Leu	Thr
[0342]	65									70				75		80
[0343]	Ala	Gln	Phe	Gly	Ile	Thr	Arg	Lys	Asp	Ser	Phe	Leu	Asn	Ile	Ser	Ala
[0344]					85									90		95
[0345]	Ser	Ile	Pro	Ser	Asp	Val	Gly	Ile	Tyr	Phe	Cys	Ala	Gly	Gln	Leu	Gly
[0346]					100									105		110
[0347]	Gly	Ala	Gly	Gly	Thr	Ser	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr
[0348]					115					120				125		
[0349]	Ile	Leu	Thr	Val	His	Pro	Asn	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr
[0350]					130					135				140		

[0351]	Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr
[0352]	145 150 155 160
[0353]	Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val
[0354]	165 170 175
[0355]	Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys
[0356]	180 185 190
[0357]	Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala
[0358]	195 200 205
[0359]	Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser
[0360]	210 215 220
[0361]	Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr
[0362]	225 230 235 240
[0363]	Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile
[0364]	245 250 255
[0365]	Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu
[0366]	260 265 270
[0367]	Trp Ser Ser
[0368]	275
[0369]	<210> 10
[0370]	<211> 274
[0371]	<212> PRT
[0372]	<213> 人类
[0373]	<400> 10
[0374]	Met Thr Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp
[0375]	1 5 10 15
[0376]	Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val
[0377]	20 25 30
[0378]	Gln Glu Gly Asp Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala
[0379]	35 40 45
[0380]	Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Gly Pro Gln
[0381]	50 55 60
[0382]	Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg
[0383]	65 70 75 80
[0384]	Ile Ala Val Thr Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile
[0385]	85 90 95
[0386]	Thr Glu Thr Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Asn
[0387]	100 105 110
[0388]	Trp Ser Pro Gln Gly Asn Glu Lys Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Arg
[0389]	115 120 125

[0390]	Leu Thr Ile Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
[0391]	130 135 140
[0392]	Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
[0393]	145 150 155 160
[0394]	Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
[0395]	165 170 175
[0396]	Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
[0397]	180 185 190
[0398]	Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
[0399]	195 200 205
[0400]	Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
[0401]	210 215 220
[0402]	Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
[0403]	225 230 235 240
[0404]	Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu
[0405]	245 250 255
[0406]	Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp
[0407]	260 265 270
[0408]	Ser Ser
[0409]	<210> 11
[0410]	<211> 267
[0411]	<212> PRT
[0412]	<213> 人类
[0413]	<400> 11
[0414]	Met Trp Gly Val Phe Leu Leu Tyr Val Ser Met Lys Met Gly Gly Thr
[0415]	1 5 10 15
[0416]	Thr Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly
[0417]	20 25 30
[0418]	Ala Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly
[0419]	35 40 45
[0420]	Leu Phe Trp Tyr Gln Gln His Ala Gly Glu Ala Pro Thr Phe Leu Ser
[0421]	50 55 60
[0422]	Tyr Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe
[0423]	65 70 75 80
[0424]	Leu Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Glu Leu Gln
[0425]	85 90 95
[0426]	Met Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys Ala Ser Met Asp Ser Asn Tyr
[0427]	100 105 110
[0428]	Gln Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys Pro Asp Ile

[0429]	115	120	125
[0430]	Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser		
[0431]	130	135	140
[0432]	Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val		
[0433]	145	150	155
[0434]	Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu		
[0435]	165	170	175
[0436]	Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser		
[0437]	180	185	190
[0438]	Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile		
[0439]	195	200	205
[0440]	Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys		
[0441]	210	215	220
[0442]	Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn		
[0443]	225	230	235
[0444]	Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe		
[0445]	245	250	255
[0446]	Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0447]	260	265	
[0448]	<210> 12		
[0449]	<211> 274		
[0450]	<212> PRT		
[0451]	<213> 人类		
[0452]	<400> 12		
[0453]	Met Ile Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser		
[0454]	1	5	10
[0455]	Trp Val Trp Ser Gln Arg Lys Glu Val Glu Gln Asp Pro Gly Pro Phe		
[0456]	20	25	30
[0457]	Asn Val Pro Glu Gly Ala Thr Val Ala Phe Asn Cys Thr Tyr Ser Asn		
[0458]	35	40	45
[0459]	Ser Ala Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Cys Arg Lys Glu		
[0460]	50	55	60
[0461]	Pro Lys Leu Leu Met Ser Val Tyr Ser Ser Gly Asn Glu Asp Gly Arg		
[0462]	65	70	75
[0463]	Phe Thr Ala Gln Leu Asn Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Leu Leu Ile		
[0464]	85	90	95
[0465]	Arg Asp Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Val Val Asn		
[0466]	100	105	110
[0467]	Arg Phe Thr Arg Asp Gly Asn Lys Leu Val Phe Gly Ala Gly Thr Ile		

[0468]	115	120	125
[0469]	Leu Arg Val Lys Ser Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln		
[0470]	130	135	140
[0471]	Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp		
[0472]	145	150	155
[0473]	Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr		
[0474]	165	170	175
[0475]	Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser		
[0476]	180	185	190
[0477]	Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn		
[0478]	195	200	205
[0479]	Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro		
[0480]	210	215	220
[0481]	Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp		
[0482]	225	230	235
[0483]	Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu		
[0484]	245	250	255
[0485]	Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp		
[0486]	260	265	270
[0487]	Ser Ser		
[0488]	<210> 13		
[0489]	<211> 314		
[0490]	<212> PRT		
[0491]	<213> 人类		
[0492]	<400> 13		
[0493]	Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Gly Ser Gly Leu Gly Ala		
[0494]	1	5	10
[0495]	Val Val Ser Gln His Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly Thr Ser		
[0496]	20	25	30
[0497]	Val Lys Ile Glu Cys Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr Met Phe		
[0498]	35	40	45
[0499]	Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala Thr Ser		
[0500]	50	55	60
[0501]	Asn Glu Gly Ser Lys Ala Thr Tyr Glu Gln Gly Val Glu Lys Asp Lys		
[0502]	65	70	75
[0503]	Phe Leu Ile Asn His Ala Ser Leu Thr Leu Ser Thr Leu Thr Val Thr		
[0504]	85	90	95
[0505]	Ser Ala His Pro Glu Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala Lys Val		
[0506]	100	105	110

[0507]	Thr Ser Gly Gln His Gln Gly Thr Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro		
[0508]	115	120	125
[0509]	Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro		
[0510]	130	135	140
[0511]	Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln		
[0512]	145	150	155
[0513]	Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val		
[0514]	165	170	175
[0515]	Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser		
[0516]	180	185	190
[0517]	Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg		
[0518]	195	200	205
[0519]	Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn		
[0520]	210	215	220
[0521]	Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu		
[0522]	225	230	235
[0523]	Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val		
[0524]	245	250	255
[0525]	Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser		
[0526]	260	265	270
[0527]	Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu		
[0528]	275	280	285
[0529]	Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met		
[0530]	290	295	300
[0531]	Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly		
[0532]	305	310	
[0533]	<210> 14		
[0534]	<211> 311		
[0535]	<212> PRT		
[0536]	<213> 人类		
[0537]	<400> 14		
[0538]	Met Thr Ile Arg Leu Leu Cys Tyr Met Gly Phe Tyr Phe Leu Gly Ala		
[0539]	1	5	10
[0540]	Gly Leu Met Glu Ala Asp Ile Tyr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Ile		
[0541]	20	25	30
[0542]	Gly Thr Gly Lys Lys Ile Thr Leu Glu Cys Ser Gln Thr Met Gly His		
[0543]	35	40	45
[0544]	Asp Lys Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Asp Pro Gly Met Glu Leu His Leu		
[0545]	50	55	60

[0546]	Ile His Tyr Ser Tyr Gly Val Asn Ser Thr Glu Lys Gly Asp Leu Ser
[0547]	65 70 75 80
[0548]	Ser Glu Ser Thr Val Ser Arg Ile Arg Thr Glu His Phe Pro Leu Thr
[0549]	85 90 95
[0550]	Leu Glu Ser Ala Arg Pro Ser His Thr Ser Gln Tyr Leu Cys Ala Ser
[0551]	100 105 110
[0552]	Ser Glu Tyr Ile Gln Tyr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Phe Gly Glu Gly
[0553]	115 120 125
[0554]	Ser Trp Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu
[0555]	130 135 140
[0556]	Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys
[0557]	145 150 155 160
[0558]	Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu
[0559]	165 170 175
[0560]	Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr
[0561]	180 185 190
[0562]	Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr
[0563]	195 200 205
[0564]	Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro
[0565]	210 215 220
[0566]	Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn
[0567]	225 230 235 240
[0568]	Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser
[0569]	245 250 255
[0570]	Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr
[0571]	260 265 270
[0572]	Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly
[0573]	275 280 285
[0574]	Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala
[0575]	290 295 300
[0576]	Met Val Lys Arg Lys Asp Phe
[0577]	305 310
[0578]	<210> 15
[0579]	<211> 312
[0580]	<212> PRT
[0581]	<213> 人类
[0582]	<400> 15
[0583]	Met Gly Phe Arg Leu Leu Cys Cys Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala
[0584]	1 5 10 15

[0585]	Gly	Pro	Val	Asp	Ser	Gly	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Lys	His	Leu	Ile	Thr
[0586]				20					25					30		
[0587]	Ala	Thr	Gly	Gln	Arg	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Ser	Pro	Arg	Ser	Gly	Asp
[0588]			35					40					45			
[0589]	Leu	Ser	Val	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ser	Leu	Asp	Gln	Gly	Leu	Gln	Phe
[0590]		50					55					60				
[0591]	Leu	Ile	Gln	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Glu	Glu	Arg	Ala	Lys	Gly	Asn	Ile	Leu
[0592]	65					70				75					80	
[0593]	Glu	Arg	Phe	Ser	Ala	Gln	Gln	Phe	Pro	Asp	Leu	His	Ser	Glu	Leu	Asn
[0594]				85					90					95		
[0595]	Leu	Ser	Ser	Leu	Glu	Leu	Gly	Asp	Ser	Ala	Leu	Tyr	Phe	Cys	Ala	Ser
[0596]			100					105					110			
[0597]	Ser	Val	Gly	Gly	Gly	Leu	Ala	Asp	Thr	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr
[0598]		115					120					125				
[0599]	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val
[0600]	130					135				140						
[0601]	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala
[0602]	145					150				155					160	
[0603]	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu
[0604]			165					170					175			
[0605]	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp
[0606]		180				185						190				
[0607]	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys
[0608]		195				200						205				
[0609]	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg
[0610]	210					215					220					
[0611]	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp
[0612]	225				230				235					240		
[0613]	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala
[0614]			245					250				255				
[0615]	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln
[0616]		260						265				270				
[0617]	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys
[0618]		275					280					285				
[0619]	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met
[0620]	290					295					300					
[0621]	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly								
[0622]	305					310										
[0623]	<210>	16														

[0624]	<211>	313
[0625]	<212>	PRT
[0626]	<213>	人类
[0627]	<400>	16
[0628]	Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala	
[0629]	1	5 10 15
[0630]	Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu	
[0631]	20	25 30
[0632]	Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His	
[0633]	35	40 45
[0634]	Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu	
[0635]	50	55 60
[0636]	Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro	
[0637]	65	70 75 80
[0638]	Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg	
[0639]	85	90 95
[0640]	Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser	
[0641]	100	105 110
[0642]	Gly Ile Ser Gly Thr Ala Ser Ser Tyr Asn Ser Pro Leu His Phe Gly	
[0643]	115	120 125
[0644]	Asn Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro	
[0645]	130	135 140
[0646]	Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr	
[0647]	145	150 155 160
[0648]	Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His	
[0649]	165	170 175
[0650]	Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val	
[0651]	180	185 190
[0652]	Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser	
[0653]	195	200 205
[0654]	Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln	
[0655]	210	215 220
[0656]	Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser	
[0657]	225	230 235 240
[0658]	Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile	
[0659]	245	250 255
[0660]	Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val	
[0661]	260	265 270
[0662]	Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu	

[0663]	275	280	285
[0664]	Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu		
[0665]	290	295	300
[0666]	Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe		
[0667]	305	310	
[0668]	<210> 17		
[0669]	<211> 309		
[0670]	<212> PRT		
[0671]	<213> 人类		
[0672]	<400> 17		
[0673]	Met Gly Pro Gly Leu Leu His Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Thr		
[0674]	1	5	10
[0675]	Gly His Gly Asp Ala Met Val Ile Gln Asn Pro Arg Tyr Gln Val Thr		
[0676]	20	25	30
[0677]	Gln Phe Gly Lys Pro Val Thr Leu Ser Cys Ser Gln Thr Leu Asn His		
[0678]	35	40	45
[0679]	Asn Val Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Gln Ala Pro Lys Leu		
[0680]	50	55	60
[0681]	Leu Phe His Tyr Tyr Asp Lys Asp Phe Asn Asn Glu Ala Asp Thr Pro		
[0682]	65	70	75
[0683]	Asp Asn Phe Gln Ser Arg Arg Pro Asn Thr Ser Phe Cys Phe Leu Asp		
[0684]	85	90	95
[0685]	Ile Arg Ser Pro Gly Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Leu Cys Ala Thr		
[0686]	100	105	110
[0687]	Ser Arg Glu Trp Glu Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Leu		
[0688]	115	120	125
[0689]	Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe		
[0690]	130	135	140
[0691]	Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val		
[0692]	145	150	155
[0693]	Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp		
[0694]	165	170	175
[0695]	Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro		
[0696]	180	185	190
[0697]	Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser		
[0698]	195	200	205
[0699]	Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe		
[0700]	210	215	220
[0701]	Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr		

[0702]	225	230	235	240
[0703]	Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp			
[0704]	245	250	255	
[0705]	Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val			
[0706]	260	265	270	
[0707]	Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu			
[0708]	275	280	285	
[0709]	Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg			
[0710]	290	295	300	
[0711]	Lys Asp Ser Arg Gly			
[0712]	305			
[0713]	<210> 18			
[0714]	<211> 315			
[0715]	<212> PRT			
[0716]	<213> 人类			
[0717]	<400> 18			
[0718]	Met Thr Ile Arg Leu Leu Cys Tyr Met Gly Phe Tyr Phe Leu Gly Ala			
[0719]	1	5	10	15
[0720]	Gly Leu Met Glu Ala Asp Ile Tyr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Ile			
[0721]	20	25	30	
[0722]	Gly Thr Gly Lys Lys Ile Thr Leu Glu Cys Ser Gln Thr Met Gly His			
[0723]	35	40	45	
[0724]	Asp Lys Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Asp Pro Gly Met Glu Leu His Leu			
[0725]	50	55	60	
[0726]	Ile His Tyr Ser Tyr Gly Val Asn Ser Thr Glu Lys Gly Asp Leu Ser			
[0727]	65	70	75	80
[0728]	Ser Glu Ser Thr Val Ser Arg Ile Arg Thr Glu His Phe Pro Leu Thr			
[0729]	85	90	95	
[0730]	Leu Glu Ser Ala Arg Pro Ser His Thr Ser Gln Tyr Leu Cys Ala Ser			
[0731]	100	105	110	
[0732]	Ser Gln Leu Tyr Arg Asp Thr Ser Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly			
[0733]	115	120	125	
[0734]	Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro			
[0735]	130	135	140	
[0736]	Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr			
[0737]	145	150	155	160
[0738]	Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His			
[0739]	165	170	175	
[0740]	Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val			

[0741]	180							185							190						
[0742]	Ser	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser					
[0743]	195							200							205						
[0744]	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln					
[0745]	210							215							220						
[0746]	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser					
[0747]	225							230							235						
[0748]	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile					
[0749]	245							250							255						
[0750]	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu					
[0751]	260							265							270						
[0752]	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu					
[0753]	275							280							285						
[0754]	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu					
[0755]	290							295							300						
[0756]	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly										
[0757]	305							310							315						
[0758]	<210> 19																				
[0759]	<211> 309																				
[0760]	<212> PRT																				
[0761]	<213> 人类																				
[0762]	<400> 19																				
[0763]	Met	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Cys	Trp	Val	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala					
[0764]	1 5 10 15																				
[0765]	Gly	Pro	Val	Asp	Ala	Gly	Val	Thr	Gln	Ser	Pro	Thr	His	Leu	Ile	Lys					
[0766]	20 25 30																				
[0767]	Thr	Arg	Gly	Gln	His	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Ser	Pro	Ile	Ser	Gly	His					
[0768]	35 40 45																				
[0769]	Lys	Ser	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Val	Leu	Gly	Gln	Gly	Pro	Gln	Phe					
[0770]	50 55 60																				
[0771]	Ile	Phe	Gln	Tyr	Tyr	Glu	Lys	Glu	Glu	Arg	Gly	Arg	Gly	Asn	Phe	Pro					
[0772]	65 70 75 80																				
[0773]	Asp	Arg	Phe	Ser	Ala	Arg	Gln	Phe	Pro	Asn	Tyr	Ser	Ser	Glu	Leu	Asn					
[0774]	85 90 95																				
[0775]	Val	Asn	Ala	Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Ser	Ala	Leu	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser					
[0776]	100 105 110																				
[0777]	Ser	Phe	Asp	Val	Gly	Leu	Pro	Pro	Leu	His	Phe	Gly	Asn	Gly	Thr	Arg					
[0778]	115 120 125																				
[0779]	Leu	Thr	Val	Thr	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala					

[0780]	130	135	140
[0781]	Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr		
[0782]	145	150	155
[0783]	Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser		
[0784]	165	170	175
[0785]	Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro		
[0786]	180	185	190
[0787]	Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu		
[0788]	195	200	205
[0789]	Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn		
[0790]	210	215	220
[0791]	His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu		
[0792]	225	230	235
[0793]	Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu		
[0794]	245	250	255
[0795]	Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln		
[0796]	260	265	270
[0797]	Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala		
[0798]	275	280	285
[0799]	Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val		
[0800]	290	295	300
[0801]	Lys Arg Lys Asp Phe		
[0802]	305		
[0803]	<210> 20		
[0804]	<211> 308		
[0805]	<212> PRT		
[0806]	<213> 人类		
[0807]	<400> 20		
[0808]	Met Gly Ser Trp Thr Leu Cys Cys Val Ser Leu Cys Ile Leu Val Ala		
[0809]	1	5	10
[0810]	Lys His Thr Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr		
[0811]	20	25	30
[0812]	Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His		
[0813]	35	40	45
[0814]	Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu		
[0815]	50	55	60
[0816]	Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro		
[0817]	65	70	75
[0818]	Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu		

[0819]	85																90				95							
[0820]	Lys	Ile	Gln	Pro	Ser	Glu	Pro	Arg	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala												
[0821]	100																105				110							
[0822]	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Thr	Glu	Ala	Phe	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu												
[0823]	115																120				125							
[0824]	Thr	Val	Val	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val												
[0825]	130																135				140							
[0826]	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu												
[0827]	145																150				155				160			
[0828]	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp												
[0829]	165																170				175							
[0830]	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro	Gln												
[0831]	180																185				190							
[0832]	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser												
[0833]	195																200				205							
[0834]	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His												
[0835]	210																215				220							
[0836]	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp												
[0837]	225																230				235				240			
[0838]	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala												
[0839]	245																250				255							
[0840]	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly												
[0841]	260																265				270							
[0842]	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr												
[0843]	275																280				285							
[0844]	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys												
[0845]	290																295				300							
[0846]	Arg	Lys	Asp	Phe																								
[0847]	305																											
[0848]	<210> 21																											
[0849]	<211> 311																											
[0850]	<212> PRT																											
[0851]	<213> 人类																											
[0852]	<400> 21																											
[0853]	Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	Ala	Phe	Cys	Phe	Leu	Ala	Val												
[0854]	1																5				10				15			
[0855]	Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Gln	Ser	Ser	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys												
[0856]	20																25				30							
[0857]	Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Cys	Val	Gln	Asp	Met	Asp	Hi												

[0858]	35	40	45
[0859]	Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu		
[0860]	50	55	60
[0861]	Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro		
[0862]	65	70	75
[0863]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile		
[0864]	85	90	95
[0865]	Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser		
[0866]	100	105	110
[0867]	Ser Leu Gly Ala Thr Gly Ala Asn Glu Lys Leu Phe Phe Gly Ser Gly		
[0868]	115	120	125
[0869]	Thr Gln Leu Ser Val Leu Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu		
[0870]	130	135	140
[0871]	Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys		
[0872]	145	150	155
[0873]	Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu		
[0874]	165	170	175
[0875]	Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr		
[0876]	180	185	190
[0877]	Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr		
[0878]	195	200	205
[0879]	Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro		
[0880]	210	215	220
[0881]	Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn		
[0882]	225	230	235
[0883]	Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser		
[0884]	245	250	255
[0885]	Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr		
[0886]	260	265	270
[0887]	Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly		
[0888]	275	280	285
[0889]	Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala		
[0890]	290	295	300
[0891]	Met Val Lys Arg Lys Asp Phe		
[0892]	305	310	
[0893]	<210> 22		
[0894]	<211> 311		
[0895]	<212> PRT		
[0896]	<213> 人类		

[0897]	<400> 22															
[0898]	Met	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Ser	Val	Phe	Ser	
[0899]	1			5					10					15		
[0900]	Ala	Val	Ile	Ser	Gln	Lys	Pro	Ser	Arg	Asp	Ile	Cys	Gln	Arg	Gly	Thr
[0901]				20					25					30		
[0902]	Ser	Leu	Thr	Ile	Gln	Cys	Gln	Val	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Met	Met	Phe
[0903]				35					40					45		
[0904]	Trp	Tyr	Arg	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Ile	Ala	Thr	Ala
[0905]		50					55					60				
[0906]	Asn	Gln	Gly	Ser	Glu	Ala	Thr	Tyr	Glu	Ser	Gly	Phe	Val	Ile	Asp	Lys
[0907]	65					70					75				80	
[0908]	Phe	Pro	Ile	Ser	Arg	Pro	Asn	Leu	Thr	Phe	Ser	Thr	Leu	Thr	Val	Ser
[0909]					85					90					95	
[0910]	Asn	Met	Ser	Pro	Glu	Asp	Ser	Ser	Ile	Tyr	Leu	Cys	Ser	Val	Gly	Ala
[0911]				100					105					110		
[0912]	Gly	Gln	Gly	Pro	Tyr	Thr	Asp	Thr	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg
[0913]				115					120					125		
[0914]	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala
[0915]		130						135					140			
[0916]	Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr
[0917]	145					150					155				160	
[0918]	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser
[0919]					165					170					175	
[0920]	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro
[0921]				180						185					190	
[0922]	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu
[0923]				195					200					205		
[0924]	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn
[0925]		210						215					220			
[0926]	His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu
[0927]	225					230					235					240
[0928]	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu
[0929]					245						250					255
[0930]	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln
[0931]				260						265					270	
[0932]	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala
[0933]				275						280					285	
[0934]	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val
[0935]		290						295					300			

[0936]	Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly		
[0937]	305	310	
[0938]	<210> 23		
[0939]	<211> 312		
[0940]	<212> PRT		
[0941]	<213> 人类		
[0942]	<400> 23		
[0943]	Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Val Ala Phe Ser Leu Leu Trp Ala		
[0944]	1	5	10 15
[0945]	Ser Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu		
[0946]	20	25	30
[0947]	Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His		
[0948]	35	40	45
[0949]	Asn Ser Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu		
[0950]	50	55	60
[0951]	Ile Tyr Tyr Ser Ala Ser Glu Gly Thr Thr Asp Lys Gly Glu Val Pro		
[0952]	65	70	75 80
[0953]	Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Leu Asn Lys Arg Glu Phe Ser Leu Arg		
[0954]	85	90	95
[0955]	Leu Glu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser		
[0956]	100	105	110
[0957]	Ser Glu Val Thr Gly Gly Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr		
[0958]	115	120	125
[0959]	Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val		
[0960]	130	135	140
[0961]	Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala		
[0962]	145	150	155 160
[0963]	Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu		
[0964]	165	170	175
[0965]	Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp		
[0966]	180	185	190
[0967]	Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys		
[0968]	195	200	205
[0969]	Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg		
[0970]	210	215	220
[0971]	Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp		
[0972]	225	230	235 240
[0973]	Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala		
[0974]	245	250	255

[0975]	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln
[0976]				260					265					270		
[0977]	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys
[0978]				275					280					285		
[0979]	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met
[0980]				290					295					300		
[0981]	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly								
[0982]	305								310							
[0983]	<210>	24														
[0984]	<211>	307														
[0985]	<212>	PRT														
[0986]	<213>	人类														
[0987]	<400>	24														
[0988]	Met	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Ser	Val	Phe	Ser	
[0989]	1				5					10					15	
[0990]	Ala	Val	Ile	Ser	Gln	Lys	Pro	Ser	Arg	Asp	Ile	Cys	Gln	Arg	Gly	Thr
[0991]					20					25					30	
[0992]	Ser	Leu	Thr	Ile	Gln	Cys	Gln	Val	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Met	Met	Phe
[0993]					35					40					45	
[0994]	Trp	Tyr	Arg	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Ile	Ala	Thr	Ala
[0995]					50					55					60	
[0996]	Asn	Gln	Gly	Ser	Glu	Ala	Thr	Tyr	Glu	Ser	Gly	Phe	Val	Ile	Asp	Lys
[0997]	65						70					75				80
[0998]	Phe	Pro	Ile	Ser	Arg	Pro	Asn	Leu	Thr	Phe	Ser	Thr	Leu	Thr	Val	Ser
[0999]						85					90					95
[1000]	Asn	Met	Ser	Pro	Glu	Asp	Ser	Ser	Ile	Tyr	Leu	Cys	Ser	Val	Glu	Gly
[1001]					100						105				110	
[1002]	Arg	Gly	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Thr
[1003]					115						120				125	
[1004]	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro
[1005]								135						140		
[1006]	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu
[1007]	145						150					155				160
[1008]	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn
[1009]						165						170				175
[1010]	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys
[1011]						180						185				190
[1012]	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu
[1013]															195	
															200	
																205

[1014]	Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
[1015]	210 215 220
[1016]	Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
[1017]	225 230 235 240
[1018]	Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
[1019]	245 250 255
[1020]	Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
[1021]	260 265 270
[1022]	Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
[1023]	275 280 285
[1024]	Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
[1025]	290 295 300
[1026]	Ser Arg Gly
[1027]	305
[1028]	<210> 25
[1029]	<211> 310
[1030]	<212> PRT
[1031]	<213> 人类
[1032]	<400> 25
[1033]	Met Gln Trp Ala Leu Ala Val Leu Leu Ala Phe Leu Ser Pro Ala Ser
[1034]	1 5 10 15
[1035]	Gln Lys Ser Ser Asn Leu Glu Gly Arg Thr Lys Ser Val Ile Arg Gln
[1036]	20 25 30
[1037]	Thr Gly Ser Ser Ala Glu Ile Thr Cys Asp Leu Ala Glu Gly Ser Thr
[1038]	35 40 45
[1039]	Gly Tyr Ile His Trp Tyr Leu His Gln Glu Gly Lys Ala Pro Gln Arg
[1040]	50 55 60
[1041]	Leu Leu Tyr Tyr Asp Ser Tyr Thr Ser Ser Val Val Leu Glu Ser Gly
[1042]	65 70 75 80
[1043]	Ile Ser Pro Gly Lys Tyr Asp Thr Tyr Gly Ser Thr Arg Lys Asn Leu
[1044]	85 90 95
[1045]	Arg Met Ile Leu Arg Asn Leu Ile Glu Asn Asp Ser Gly Val Tyr Tyr
[1046]	100 105 110
[1047]	Cys Ala Thr Trp Glu Thr Gln Glu Leu Gly Lys Lys Ile Lys Val Phe
[1048]	115 120 125
[1049]	Gly Pro Gly Thr Lys Leu Ile Ile Thr Asp Lys Gln Leu Asp Ala Asp
[1050]	130 135 140
[1051]	Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro Ser Ile Ala Glu Thr Lys
[1052]	145 150 155 160

[1053]	Leu	Gln	Lys	Ala	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Leu	Leu	Glu	Lys	Phe	Phe	Pro
[1054]					165				170						175	
[1055]	Asp	Val	Ile	Lys	Ile	His	Trp	Gln	Glu	Lys	Lys	Ser	Asn	Thr	Ile	Leu
[1056]				180					185						190	
[1057]	Gly	Ser	Gln	Glu	Gly	Asn	Thr	Met	Lys	Thr	Asn	Asp	Thr	Tyr	Met	Lys
[1058]				195					200					205		
[1059]	Phe	Ser	Trp	Leu	Thr	Val	Pro	Glu	Lys	Ser	Leu	Asp	Lys	Glu	His	Arg
[1060]		210						215					220			
[1061]	Cys	Ile	Val	Arg	His	Glu	Asn	Asn	Lys	Asn	Gly	Val	Asp	Gln	Glu	Ile
[1062]	225					230					235					240
[1063]	Ile	Phe	Pro	Pro	Ile	Lys	Thr	Asp	Val	Ile	Thr	Met	Asp	Pro	Lys	Asp
[1064]					245					250					255	
[1065]	Asn	Cys	Ser	Lys	Asp	Ala	Asn	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Gln	Leu	Thr	Asn
[1066]				260					265					270		
[1067]	Thr	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Ser	Val	Val
[1068]			275					280					285			
[1069]	Tyr	Phe	Ala	Ile	Ile	Thr	Cys	Cys	Leu	Leu	Arg	Arg	Thr	Ala	Phe	Cys
[1070]		290					295					300				
[1071]	Cys	Asn	Gly	Glu	Lys	Ser										
[1072]	305					310										
[1073]	<210> 26															
[1074]	<211> 295															
[1075]	<212> PRT															
[1076]	<213> 人类															
[1077]	<400> 26															
[1078]	Met	Leu	Phe	Ser	Ser	Leu	Leu	Cys	Val	Phe	Val	Ala	Phe	Ser	Tyr	Ser
[1079]	1				5				10					15		
[1080]	Gly	Ser	Ser	Val	Ala	Gln	Lys	Val	Thr	Gln	Ala	Gln	Ser	Ser	Val	Ser
[1081]				20					25					30		
[1082]	Met	Pro	Val	Arg	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	Asn	Cys	Leu	Tyr	Glu	Thr	Ser
[1083]			35					40					45			
[1084]	Trp	Trp	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Phe	Trp	Tyr	Lys	Gln	Leu	Pro	Ser	Lys	Glu
[1085]		50					55					60				
[1086]	Met	Ile	Phe	Leu	Ile	Arg	Gln	Gly	Ser	Asp	Glu	Gln	Asn	Ala	Lys	Ser
[1087]	65					70					75				80	
[1088]	Gly	Arg	Tyr	Ser	Val	Asn	Phe	Lys	Lys	Ala	Val	Lys	Ser	Val	Ala	Leu
[1089]				85						90					95	
[1090]	Thr	Ile	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Glu	Asp	Ser	Ala	Lys	Tyr	Phe	Cys	Ala
[1091]				100					105					110		

[1092]	Leu Gly Val Gln Ala Leu Leu Pro Ile Leu Gly Asp Thr Thr Asp Lys
[1093]	115 120 125
[1094]	Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Arg Val Thr Val Glu Pro Arg Ser Gln
[1095]	130 135 140
[1096]	Pro His Thr Lys Pro Ser Val Phe Val Met Lys Asn Gly Thr Asn Val
[1097]	145 150 155 160
[1098]	Ala Cys Leu Val Lys Glu Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Arg Ile Asn Leu
[1099]	165 170 175
[1100]	Val Ser Ser Lys Lys Ile Thr Glu Phe Asp Pro Ala Ile Val Ile Ser
[1101]	180 185 190
[1102]	Pro Ser Gly Lys Tyr Asn Ala Val Lys Leu Gly Lys Tyr Glu Asp Ser
[1103]	195 200 205
[1104]	Asn Ser Val Thr Cys Ser Val Gln His Asp Asn Lys Thr Val His Ser
[1105]	210 215 220
[1106]	Thr Asp Phe Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp His Val Lys Pro Lys
[1107]	225 230 235 240
[1108]	Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys
[1109]	245 250 255
[1110]	Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Val Leu
[1111]	260 265 270
[1112]	Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe Leu Leu
[1113]	275 280 285
[1114]	Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu
[1115]	290 295
[1116]	<210> 27
[1117]	<211> 801
[1118]	<212> DNA
[1119]	<213> 人类
[1120]	<400> 27
[1121]	atgtggggag ttttccttct ttatgtttcc atgaagatgg gaggcactac aggacaaaac 60
[1122]	attgaccagc ccactgagat gacagctacg gaaggtgcca ttgtccagat caactgcacg 120
[1123]	taccagacat ctgggttcaa cgggctgttc tgggtaccagc aacatgctgg cgaagcacc 180
[1124]	acatttctgt cttacaatgt tctggatggg ttggaggaga aaggctggtt ttcttcattc 240
[1125]	cttagtcggt ctaaagggtg cagttacctc cttttgaagg agctccagat gaaagactct 300
[1126]	gcctcttacc tctgtgctgt gatggatagc agctataaat tgatcttcgg gagggggacc 360
[1127]	agactgctgg tcaggcctga tatccagaac cctgacctg ccgtgtacca gctgagagac 420
[1128]	tctaaatcca gtgacaagtc tgtctgccta ttcaccgatt ttgattctca aacaaatgtg 480
[1129]	tcacaaagta aggattctga tgtgtatatc acagacaaaa ctgtgctaga catgagggtct 540
[1130]	atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaca aatctgactt tgcattgtgca 600

[1131]	aacgccttca acaacagcat tattccagaa gacaccttct tccccagccc agaaagtcc 660
[1132]	tgtgatgtca agctggtcga gaaaagcttt gaaacagata cgaacctaaa ctttcaaaac 720
[1133]	ctgtcagtga ttgggttccg aatcctcctc ctgaaagtgg ccgggtttta tctgctcatg 780
[1134]	acgctgcggc tgtgtccag c 801
[1135]	<210> 28
[1136]	<211> 813
[1137]	<212> DNA
[1138]	<213> 人类
[1139]	<400> 28
[1140]	atgctactca tcacatcaat gttggtctta tggatgcaat tgtcacaggt gaatggacaa 60
[1141]	caggtaatgc aaattcctca gtaccagcat gtacaagaag gagaggactt caccacgtac 120
[1142]	tgcaattcct caactacttt aagcaatata cagtggata agcaaaggcc tgggtggacat 180
[1143]	cccgtttttt tgatacagtt agtgaagagt ggagaagtga agaagcagaa aagactgaca 240
[1144]	tttcagtttg gagaagcaaa aaagaacagc tccctgcaca tcacagccac ccagactaca 300
[1145]	gatgtaggaa cctacttctg tgcggctgct ggtggtacta gctatggaaa gctgacattt 360
[1146]	ggacaaggga ccatcttgac tgtccatcca aatatccaga accctgacct tgccgtgtac 420
[1147]	cagctgagag actctaaatc cagtgcagag tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct 480
[1148]	caaacaaatg tgtcacaag taaggattct gatgtgtata tcacagacaa aactgtgcta 540
[1149]	gacatgaggt ctatggactt caagagcaac agtgctgtgg cctggagcaa caaatctgac 600
[1150]	tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc attattccag aagacacctt cttccccagc 660
[1151]	ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc gagaaaagct ttgaaacaga tacgaacct 720
[1152]	aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt 780
[1153]	aatctgctca tgacgtgcg gctgtgtgcc agc 813
[1154]	<210> 29
[1155]	<211> 830
[1156]	<212> DNA
[1157]	<213> 人类
[1158]	<400> 29
[1159]	atgaagacat ttgctggatt ttcgttcctg tttttgtggc tgcagctgga ctgtatgagt 60
[1160]	agaggagagg atgtggagca gagtcttttc ctgagtgtcc gagagggaga cagctccgtt 120
[1161]	ataaactgca cttacacaga cagctcctcc acctacttat actggtataa gcaagaacct 180
[1162]	ggagcaggtc tccagttgct gacgtatatt ttttcaaata tggacatgaa acaagaccaa 240
[1163]	agactcactg ttctattgaa taaaaaggat aaacatctgt ctctgcgcac tgcagacacc 300
[1164]	cagactgggg actcagctat ctacttctgt gcagagacct ggaccgacag aggcctcaacc 360
[1165]	ctggggaggc tatacttttg aagaggaact cagttgactg tctggcctga tatccagaac 420
[1166]	cctgaccctg ccgtgtacca gctgagagac tctaaatcca gtgacaagtc tgtctgccta 480
[1167]	ttcaccgatt ttgattctca aacaaatgtg tcacaaagta aggattctga tgtgtatatc 540
[1168]	acagacaaaa ctgtgctaga catgaggtct atggacttca agagcaacag tgctgtggcc 600
[1169]	tggagcaaca aatctgactt tgcattgtga aacgccttca acaacagcat tattccagaa 660

[1170]	gacaccttct	tccccagccc	agaaagttcc	tgtgatgtca	agctggtcga	gaaaagcttt	720
[1171]	gaaacagata	cgaacctaaa	ctttcaaaac	ctgtcagtga	ttgggttccg	aatcctcctc	780
[1172]	ctgaaagtgg	cgggttttaa	tctgctcatg	acgttgcggc	tgtggtccag		830
[1173]	<210>	30					
[1174]	<211>	840					
[1175]	<212>	DNA					
[1176]	<213>	人类					
[1177]	<400>	30					
[1178]	atggccatgc	tcctgggggc	atcagtgtctg	attctgtggc	ttcagacaga	ctgggtaaac	60
[1179]	agtcaacaga	agaatgatga	ccagcaagtt	aagcaaaatt	caccatccct	gagcgtccag	120
[1180]	gaaggaagaa	tttctattct	gaactgtgac	tatactaaca	gcatgtttga	ttatttccta	180
[1181]	tggtacaaaa	aataccctgc	tgaaggctct	acattcctga	tatctataag	ttccattaag	240
[1182]	gataaaaatg	aagatggaag	attcaactgtc	ttcttaaaaca	aaagtgccaa	gcacctctct	300
[1183]	ctgcacattg	tgccttccca	gcctggagac	tctgcagtgt	acttctgtgc	agcaagtctt	360
[1184]	tataaccagg	gaggaaagct	tatcttcgga	cagggaacgg	agttatctgt	gaaacccaat	420
[1185]	atccagaacc	ctgaccctgc	cgtgtaccag	ctgagagact	ctaaatccag	tgacaagtct	480
[1186]	gtctgcctat	tcaccgattt	tgattctcaa	acaaatgtgt	cacaaagtaa	ggattctgat	540
[1187]	gtgtatatca	cagacaaaac	tgtgctagac	atgaggctca	tggacttcaa	gagcaacagt	600
[1188]	gctgtggcct	ggagcaacaa	atctgacttt	gcatgtgcaa	acgccttcaa	caacagcatt	660
[1189]	attccagaag	acaccttctt	ccccagccca	gaaagttcct	gtgatgtcaa	gctggtcgag	720
[1190]	aaaagctttg	aaacagatac	gaacctaaac	tttcaaaacc	tgtcagtgat	tgggttccga	780
[1191]	atcctcctcc	tgaaagtggc	cgggtttaat	ctgctcatga	cgctgcggct	gtggtccagc	840
[1192]	<210>	31					
[1193]	<211>	822					
[1194]	<212>	DNA					
[1195]	<213>	人类					
[1196]	<400>	31					
[1197]	atggagaaga	atccttttggc	agccccatta	ctaatectct	ggtttcatct	tgactgcgtg	60
[1198]	agcagcatac	tgaacgtgga	acaaagtcct	cagtcactgc	atgttcagga	gggagacagc	120
[1199]	accaattttca	cctgcagctt	cccttccage	aatttttatg	ccttacactg	gtacagatgg	180
[1200]	gaaactgcaa	aaagccccga	ggccttgttt	gtaatgactt	taaattggga	tgaaaagaag	240
[1201]	aaaggacgaa	taagtgccac	tcttaatacc	aaggagggtt	acagctatct	gtacatcaaa	300
[1202]	ggatcccagc	ctgaagactc	agccacatac	ctctgtgcct	cgggggattc	cgggtatgca	360
[1203]	ctcaacttcg	gcaaaggcac	ctcgtgtgtg	gtcacacccc	atatccagaa	ccctgaccct	420
[1204]	gccgtgtacc	agctgagaga	ctctaaatcc	agtgacaagt	ctgtctgcct	attcaccgat	480
[1205]	tttgattctc	aaacaaatgt	gtcacaaagt	aaggattctg	atgtgtatat	cacagacaaa	540
[1206]	actgtgctag	acatgaggtc	tatggacttc	aagagcaaca	gtgctgtggc	ctggagcaac	600
[1207]	aaatctgact	ttgcatgtgc	aaacgccttc	aacaacagca	ttattccaga	agacaccttc	660
[1208]	ttccccagcc	cagaaagttc	ctgtgatgtc	aagctggctg	agaaaagctt	tgaaacagat	720

[1209]	acgaacctaa actttcaaaa cctgtcagtg attgggttcc gaatcctcct cctgaaagtg	780
[1210]	gccgggttta atctgctcat gacgctgcgg ctgtggtcca gc	822
[1211]	<210> 32	
[1212]	<211> 828	
[1213]	<212> DNA	
[1214]	<213> 人类	
[1215]	<400> 32	
[1216]	atgaactatt ctccaggctt agtatctctg atactcttac tgcttggaag aacccgtgga	60
[1217]	aattcagtgga cccagatgga agggccagtg actctctcag aagaggcctt cctgactata	120
[1218]	aactgcacgt acacagccac aggataccct tcccttttct ggtatgtcca atatcctgga	180
[1219]	gaaggtctac agctcctcct gaaagccacg aaggctgatg acaagggaag caacaaaggt	240
[1220]	tttgaagcca cataccgtaa agaaaccact tctttccact tggagaaagg ctcagttcaa	300
[1221]	gtgtcagact cagcgggtgta cttctgtgct ctgacaatat gggattatgg aggaagccaa	360
[1222]	ggaaatctca tctttggaaa aggcactaaa ctctctgtta aaccaaatat ccagaaccct	420
[1223]	gaccctgccg tgtaccagct gagagactct aaatccagtg acaagtctgt ctgcctattc	480
[1224]	accgattttg attctcaaac aaatgtgtca caaagtaagg attctgatgt gtatatcaca	540
[1225]	gacaaaactg tgctagacat gaggtctatg gacttcaaga gcaacagtgct tgtggcctgg	600
[1226]	agcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac	660
[1227]	acctttcttc ccagcccaga aagttcctgt gatgtcaagc tggtcgagaa aagctttgaa	720
[1228]	acagatacga acctaaactt tcaaaacctg tcagtgattg ggttccgaat cctcctcctg	780
[1229]	aaagtggccg ggtttaatct gctcatgacg ctgcggctgt ggtccagc	828
[1230]	<210> 33	
[1231]	<211> 807	
[1232]	<212> DNA	
[1233]	<213> 人类	
[1234]	<400> 33	
[1235]	atggctcctga aattctccgt gtccattctt tggattcagt tggcatgggt gagcaccag	60
[1236]	ctgctggagc agagccctca gtttctaagc atccaagagg gagaaaatct cactgtgtac	120
[1237]	tgcaactcct caagtgtttt ttccagctta caatggtaca gacaggagcc tggggaaggt	180
[1238]	cctgtcctcc tgggtgacagt agttacgggt ggagaagtga agaagctgaa gagactaacc	240
[1239]	tttcagtttg gtgatgcaag aaaggacagt tctctccaca tcaactgcagc ccagcctggt	300
[1240]	gatacaggcc tctacctctg tgcaggagaa aattccgggt atgcactcaa cttcggcaaa	360
[1241]	ggcacctcgc tgttggtcac accccatata cagaacctg accctgccgt gtaccagctg	420
[1242]	agagactcta aatccagtgca caagtctgtc tgcctattca ccgattttga ttctcaaaca	480
[1243]	aatgtgtcac aaagtaagga ttctgatgtg tatatcacag acaaaactgt gctagacatg	540
[1244]	aggtctatgg acttcaagag caacagtgtc gtggcctgga gcaacaaatc tgactttgca	600
[1245]	tgtgcaaagc ctttcaacaa cagcattatt ccagaagaca ctttctccc cagcccagaa	660
[1246]	agttcctgtg atgtcaagct ggtcgagaaa agctttgaaa cagatacga cctaaacttt	720
[1247]	caaaacctgt cagtgattgg gttccgaatc ctctcctga aagtggccgg gtttaatctg	780

[1248]	ctcatgacgc tgcggctgtg gtccagc 807
[1249]	<210> 34
[1250]	<211> 825
[1251]	<212> DNA
[1252]	<213> 人类
[1253]	<400> 34
[1254]	atgatgaaat ccttgagagt tttactggtg atcctgtggc ttcagttaag ctgggtttgg 60
[1255]	agccaacaga aggaggtgga gcaggatcct ggaccactca gtgttccaga gggagccatt 120
[1256]	gtttctctca actgcactta cagcaacagt gcttttcaat acttcatgtg gtacagacag 180
[1257]	tattccagaa aaggccctga gttgctgatg tacacatact ccagtggtaa caaagaagat 240
[1258]	ggaaggttta cagcacaggt cgataaatcc agcaagtata tctccttggt catcagagac 300
[1259]	tcacagccca gtgattcagc cacctacctc tgtgcaatga gcctatcagg aggaagctac 360
[1260]	atacctacat ttggaagagg aaccagcctt attgttcatc cgtatatcca gaaccctgac 420
[1261]	cctgccgtgt accagctgag agactctaaa tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc 480
[1262]	gattttgatt ctcaaacaaa tgtgtcacia agtaaggatt ctgatgtgta tatcacagac 540
[1263]	aaaactgtgc tagacatgag gtctatggac ttcaagagca acagtgtgtg ggccctggagc 600
[1264]	aacaaatctg actttgcatg tgcaaacgcc ttcaacaaca gcattattcc agaagacacc 660
[1265]	ttcttcccca gccagaaaag ttctgtgatg gtcaagctgg tcgagaaaag ctttgaaaca 720
[1266]	gatacgaacc taaactttca aaacctgtca gtgattgggt tccgaatcct cctcctgaaa 780
[1267]	gtggccgggt ttaatctgct catgacgctg cggctgtggt ccagc 825
[1268]	<210> 35
[1269]	<211> 825
[1270]	<212> DNA
[1271]	<213> 人类
[1272]	<400> 35
[1273]	atgctccttg aacattttatt aataatcttg tggatgcagc tgacatgggt cagtgggtcaa 60
[1274]	cagctgaatc agagtccctca atctatgttt atccaggaag gagaagatgt ctccatgaac 120
[1275]	tgcacttctt caagcatatt taacacctgg ctatggtaca agcaggaccc tggggaagggt 180
[1276]	cctgtcctct tgatagcctt atataaggct ggtgaattga cctcaaatgg aagactgact 240
[1277]	gctcagtttg gtataaccag aaaggacagc ttctgaata tctcagcatc catacctagt 300
[1278]	gatgtaggca tctacttctg tgctgggcag ctaggagggg ctggtggtac tagctatgga 360
[1279]	aagctgacat ttggacaagg gaccatcttg actgtccatc caaatatcca gaaccctgac 420
[1280]	cctgccgtgt accagctgag agactctaaa tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc 480
[1281]	gattttgatt ctcaaacaaa tgtgtcacia agtaaggatt ctgatgtgta tatcacagac 540
[1282]	aaaactgtgc tagacatgag gtctatggac ttcaagagca acagtgtgtg ggccctggagc 600
[1283]	aacaaatctg actttgcatg tgcaaacgcc ttcaacaaca gcattattcc agaagacacc 660
[1284]	ttcttcccca gccagaaaag ttctgtgatg gtcaagctgg tcgagaaaag ctttgaaaca 720
[1285]	gatacgaacc taaactttca aaacctgtca gtgattgggt tccgaatcct cctcctgaaa 780
[1286]	gtggccgggt ttaatctgct catgacgctg cggctgtggt ccagc 825

[1287]	<210> 36	
[1288]	<211> 822	
[1289]	<212> DNA	
[1290]	<213> 人类	
[1291]	<400> 36	
[1292]	atgacatcca ttcgagctgt atttatattc ctgtggctgc agctggactt ggtgaatgga	60
[1293]	gagaatgtgg agcagcatcc ttcaaccctg agtgtccagg agggagacag cgctgttatc	120
[1294]	aagtgtactt attcagacag tgcctcaaac tacttccctt ggtataagca agaacttgga	180
[1295]	aaaggacctc agcttattat agacattcgt tcaaagtgtg gcgaaaagaa agaccaacga	240
[1296]	attgctgtta cattgaacaa gacagccaaa catttctccc tgcacatcac agagacccaa	300
[1297]	cctgaagact cggctgtcta cttctgtgca gcaaactgga gcccgcaagg aaatgagaaa	360
[1298]	ttaacctttg ggactggaac aagactcacc atcataccca atatccagaa ccctgaccct	420
[1299]	gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt ctgtctgcct attcaccgat	480
[1300]	tttgattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg atgtgtatat cacagacaaa	540
[1301]	actgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca gtgctgtggc ctggagcaac	600
[1302]	aaatctgact ttgcatgtgc aaacgccttc aacaacagca ttattccaga agacaccttc	660
[1303]	ttccccagcc cagaaagttc ctgtgatgtc aagctggctg agaaaagctt tgaaacagat	720
[1304]	acgaacctaa actttcaaaa cctgtcagtg attgggttcc gaatcctcct cctgaaagtg	780
[1305]	gccgggttta atctgctcat gacgtgcgg ctgtggtcca gc	822
[1306]	<210> 37	
[1307]	<211> 801	
[1308]	<212> DNA	
[1309]	<213> 人类	
[1310]	<400> 37	
[1311]	atgtggggag ttttccttct ttatgtttcc atgaagatgg gaggcactac aggacaaaac	60
[1312]	attgaccagc ccactgagat gacagctacg gaaggtgcca ttgtccagat caactgcacg	120
[1313]	taccagacat ctgggttcaa cgggctgttc tggtaggaga aacatgctgg cgaagcacc	180
[1314]	acatttctgt cttacaatgt tctggatggg ttggaggaga aaggctggtt ttcttcattc	240
[1315]	cttagtcggt ctaaagggtc cagttacctc cttttgaagg agctccagat gaaagactct	300
[1316]	gcctcttacc tctgtgcttc catggatagc aactatcagt taatctgggg cgctgggacc	360
[1317]	aagctaatta taaagccaga tatccagaac cctgaccctg ccgtgtacca gctgagagac	420
[1318]	tctaaatcca gtgacaagtc tgtctgccta ttaccgatt ttgattctca aacaaatgtg	480
[1319]	tcacaaagta aggattctga tgtgtatata acagacaaaa ctgtgctaga catgaggtct	540
[1320]	atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaca aatctgactt tgcattgtga	600
[1321]	aacgccttca acaacagcat tattccagaa gacaccttct tccccagccc agaaagtcc	660
[1322]	tgtgatgtca agctggctga gaaaagcttt gaaacagata cgaacctaaa ctttcaaaac	720
[1323]	ctgtcagtgga ttgggttccg aatcctcctc ctgaaagtgg ccgggtttta tctgctcatg	780
[1324]	acgctgcggc tgtggtccag c	801
[1325]	<210> 38	

[1326]	<211> 822
[1327]	<212> DNA
[1328]	<213> 人类
[1329]	<400> 38
[1330]	atgatatcct tgagagtttt actggtgata ctgtggcttc agttaagctg ggtttggagc 60
[1331]	caacggaagg aggtggagca ggatcctgga cccttcaatg ttccagaggg agccactgtc 120
[1332]	gctttcaact gtacttacag caacagtgtc tctcagtcct tcttctggta cagacaggat 180
[1333]	tgcaggaaag aacctaatgt gctgatgtcc gtatactcca gtggtaatga agatggaagg 240
[1334]	tttacagcac agctcaatag agccagccag tataattccc tgctcatcag agactccaag 300
[1335]	ctcagtgtat cagccaccta cctctgtgtg gtgaacagat tcacaaggga tggaaacaaa 360
[1336]	ctgggtctttg gcgcaggaac cattctgaga gtcaagtcct atatccagaa ccctgaccct 420
[1337]	gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt ctgtctgcct attcaccgat 480
[1338]	tttgattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg atgtgtatat cacagacaaa 540
[1339]	actgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca gtgctgtggc ctggagcaac 600
[1340]	aaatctgact ttgcatgtgc aaacgccttc aacaacagca ttattccaga agacaccttc 660
[1341]	ttccccagcc cagaaagttc ctgtgatgtc aagctggctg agaaaagctt tgaaacagat 720
[1342]	acgaacctaa actttcaaaa cctgtcagtg attgggttcc gaatcctcct cctgaaagtg 780
[1343]	gccgggttta atctgctcat gacgctgcgg ctgtggtcca gc 822
[1344]	<210> 39
[1345]	<211> 942
[1346]	<212> DNA
[1347]	<213> 人类
[1348]	<400> 39
[1349]	atgctgctgc ttctgctgct tctggggcca ggctccgggc ttggtgctgt cgtctctcaa 60
[1350]	catccgagct gggttatctg taagagtgga acctctgtga agatcgagtg ccgttccctg 120
[1351]	gactttcagg ccacaactat gttttgggtat cgtcagttcc cgaaacagag tctcatgtctg 180
[1352]	atggcaactt ccaatgaggg ctccaaggcc acatacgagc aaggcgctga gaaggacaag 240
[1353]	tttctcatca accatgcaag cctgaccttg tccactctga cagtgaccag tgcccatcct 300
[1354]	gaagacagca gcttctacat ctgcagtgcg aaggtgacta gcgggcaaca ccaagggacc 360
[1355]	acagatacgc agtatatttg cccaggcacc cggtgacag tgctcgagga cctgaaaaaac 420
[1356]	gtgttccac ccgaggtcgc tgtgtttgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa 480
[1357]	aaggccacac tgggtgtgcct ggccacaggc ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg 540
[1358]	tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg gtcagcacag acccgagcc cctcaaggag 600
[1359]	cagcccgccc tcaatgactc cagatactgc ctgagcagcc gctgagggt ctcggccacc 660
[1360]	ttctggcaga acccccgcaa ccacttccgc tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag 720
[1361]	aatgacgagt ggaccagga tagggccaaa cctgtcacc agatcgctag cgccgaggcc 780
[1362]	tggggtagag cagactgtgg cttcacctcc gagtcttacc agcaaggggt cctgtctgcc 840
[1363]	accatcctct atgagatctt gctagggaag gccaccttgt atgccgtgct ggctcagtgc 900
[1364]	ctcgtgctga tggccatggt caagagaaag gattccagag gc 942

[1365]	<210>	40	
[1366]	<211>	933	
[1367]	<212>	DNA	
[1368]	<213>	人类	
[1369]	<400>	40	
[1370]	atgactatca	ggctcctctg	ctacatgggc ttttattttc tgggggcagg cctcatggaa 60
[1371]	gctgacatct	accagacccc	aagataacctt gttataggga caggaaagaa gatcactctg 120
[1372]	gaatgttctc	aaacatggg	ccatgacaaa atgtactggg atcaacaaga tccaggaatg 180
[1373]	gaactacacc	tcattccacta	ttcctatgga gtttaattcca cagagaaggg agatctttcc 240
[1374]	tctgagtcaa	cagtctccag	aataaggacg gagcattttc ccctgacctt ggagtctgcc 300
[1375]	aggccctcac	atacctctca	gtacctctgt gccagcagtg aatatatcca gtactctgga 360
[1376]	aacaccatat	attttggaga	gggaagttgg ctcaactgtg tagaggacct gaacaagggtg 420
[1377]	ttcccacccg	aggtegtctg	gtttgagcca tcagaagcag agatctccca caccctttcc 480
[1378]	gccacactgg	tgtgcctggc	cacaggcttc ttccctgacc acgtggagct gagctgggtg 540
[1379]	gtgaatggga	aggaggtgca	cagtgggggtc agcacggacc cgcagccctt caaggagcag 600
[1380]	cccgcctca	atgactccag	atactgcctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc 660
[1381]	tggcagaacc	cccgcaca	cttccgctgt caagtccagt tctacgggtc ctccggagaat 720
[1382]	gacgagtgga	cccaggatag	ggccaaaccc gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg 780
[1383]	ggtagagcag	actgtggctt	tacctcggtg tcctaccagc aaggggtcct gtctgccacc 840
[1384]	atcctctatg	agatcctgct	agggaaggcc accctgtatg ctgtgctggg cagcgcctt 900
[1385]	gtgttgatgg	ccatggtcaa	gagaaaggat ttc 933
[1386]	<210>	41	
[1387]	<211>	936	
[1388]	<212>	DNA	
[1389]	<213>	人类	
[1390]	<400>	41	
[1391]	atgggcttca	ggctcctctg	ctgtgtggcc ttttgtctcc tgggagcagg cccagtggat 60
[1392]	tctggagtca	cacaaacccc	aaagcacctg atcacagcaa ctggacagcg agtgacgtg 120
[1393]	agatgtctcc	ctaggtctgg	agacctctct gtgtactggg accaacaagag cctggaccag 180
[1394]	ggcctccagt	tcctcattca	gtattataat ggagaagaga gagcaaaagg aaacattctt 240
[1395]	gaacgattct	ccgcacaaca	gttccctgac ttgcactctg aactaaacct gagctctctg 300
[1396]	gagctggggg	actcagcttt	gtattttctgt gccagcagcg tcggaggggg atttggcagat 360
[1397]	acgcagtatt	ttggcccagg	caccggctg acagtgtctg aggacctgaa aaacgtgttc 420
[1398]	ccaccgagg	tcgtgtgtt	tgagccatca gaagcagaga tctccacac ccaaaaggcc 480
[1399]	acactggtgt	gcctggccac	aggcttctac cccgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 540
[1400]	aatgggaagg	aggtgcacag	tggggtcagc acagaccgc agccctcaa ggagcagccc 600
[1401]	gccctcaatg	actccagata	ctgcctgagc agccgcctga gggctctggc caccttctgg 660
[1402]	cagaaccccc	gcaaccactt	ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 720
[1403]	gagtggaccc	aggatagggc	caaacctgtc acccagatcg tcagcgcga ggccctggggg 780

[1404]	agagcagact	gtggcttcac	ctccgagtct	taccagcaag	gggtcctgtc	tgccaccatc	840
[1405]	ctctatgaga	tcttgctagg	gaaggccacc	ttgtatgccg	tgctgggtcag	tgccctcgtg	900
[1406]	ctgatggcca	tgggtcaagag	aaaggattcc	agaggc			936
[1407]	<210>	42					
[1408]	<211>	939					
[1409]	<212>	DNA					
[1410]	<213>	人类					
[1411]	<400>	42					
[1412]	atgagcatcg	gcctcctgtg	ctgtgcagcc	ttgtctctcc	tgtgggcagg	tccagtgaat	60
[1413]	gctgggtgtca	ctcagacccc	aaaattccag	gtcctgaaga	caggacagag	catgacactg	120
[1414]	cagtgtgccc	aggatatgaa	ccatgaatac	atgtcctggg	atcgacaaga	cccaggcatg	180
[1415]	gggctgagge	tgattcatta	ctcagttggg	gctgggtatca	ctgaccaagg	agaagtcccc	240
[1416]	aatggctaca	atgtctccag	atcaaccaca	gaggatttcc	cgctcagggt	gctgtcggct	300
[1417]	gctccctccc	agacatctgt	gtacttctgt	gccagcggaa	tcagcgggac	agcgagctcc	360
[1418]	tataattcac	ccctccactt	tgggaacggg	accaggctca	ctgtgacaga	ggacctgaac	420
[1419]	aaggtgttcc	cacccgaggt	cgctgtgttt	gagccatcag	aagcagagat	ctcccacacc	480
[1420]	caaaaggcca	cactgggtgtg	cctggccaca	ggcttcttcc	ctgaccacgt	ggagctgagc	540
[1421]	tgggtgggtga	atgggaagga	ggtgcacagt	ggggtcagca	cggacccgca	gcccctcaag	600
[1422]	gagcagcccc	ccctcaatga	ctccagatac	tgcttgagca	gccgcctgag	ggtctcggcc	660
[1423]	accttctggc	agaacccccg	caaccacttc	cgctgtcaag	tccagttcta	cgggctctcg	720
[1424]	gagaatgacg	agtggacca	ggatagggcc	aaacccgtca	cccagatcgt	cagcgccgag	780
[1425]	gcctggggta	gagcagactg	tggctttacc	tcggtgtcct	accagcaagg	ggctcctgtct	840
[1426]	gccaccatcc	tctatgagat	cctgctaggg	aaggccaccc	tgtatgctgt	gctgggtcagc	900
[1427]	gcccctgtgt	tgatggccat	ggtcaagaga	aaggatttc			939
[1428]	<210>	43					
[1429]	<211>	927					
[1430]	<212>	DNA					
[1431]	<213>	人类					
[1432]	<400>	43					
[1433]	atgggtcctg	ggcttctcca	ctggatggcc	ctttgtctcc	ttggaacagg	tcatggggat	60
[1434]	gccatgggtca	tccagaaccc	aagataccag	gttaccaggt	ttggaaagcc	agtgaccctg	120
[1435]	agttgttctc	agactttgaa	ccataacgtc	atgtactggg	accagcagaa	gtcaagtcag	180
[1436]	gccccaaagc	tgctgttcca	ctactatgac	aaagatttta	acaatgaagc	agacaccctc	240
[1437]	gataacttcc	aatccaggag	gccgaacact	tctttctgct	ttcttgacat	ccgtcacca	300
[1438]	ggcctggggg	acgcagccat	gtacctgtgt	gccaccagea	gagagtggga	gaccagctac	360
[1439]	ttcggggccag	gcacgcggct	cctgggtgctc	gaggacctga	aaaacgtgtt	cccaccgag	420
[1440]	gtcgtgtgtg	ttgagccatc	agaagcagag	atctcccaca	cccaaaaggc	cacactgggtg	480
[1441]	tgcttggtcca	caggcttcta	ccccgaccac	gtggagctga	gctgggtgggt	gaatgggaag	540
[1442]	gaggtgcaca	gtgggggtcag	cacagacccg	cagccccctca	aggagcagcc	cgcctcaat	600

[1443]	gactccagat actgcctgag cagccgcctg agggctctcg ccaccttctg gcagaacccc	660
[1444]	cgcaaccact tccgctgtca agtccagttc tacgggctct cggagaatga cgagtggacc	720
[1445]	caggataggg ccaaacctgt caccagatc gtcagcgccg aggcctgggg tagagcagac	780
[1446]	tgtggcttca cctccgagtc ttaccagcaa ggggtcctgt ctgccacat cctctatgag	840
[1447]	atcttgctag ggaaggccac cttgtatgcc gtgctgggtca gtgccctcgt gctgatggcc	900
[1448]	atggtcaaga gaaaggattc cagaggc	927
[1449]	<210> 44	
[1450]	<211> 945	
[1451]	<212> DNA	
[1452]	<213> 人类	
[1453]	<400> 44	
[1454]	atgactatca ggctcctctg ctacatgggc ttttattttc tgggggcagg cctcatggaa	60
[1455]	gctgacatct accagacccc aagatacctt gttataggga caggaaagaa gatcactctg	120
[1456]	gaatgttctc aaacctggg ccatgacaaa atgtactggg atcaacaaga tccaggaatg	180
[1457]	gaactacacc tcatecacta ttccatgga gttaatcca cagagaaggg agatctttcc	240
[1458]	tctgagtcaa cagtctccag aataaggacg gagcattttc ccctgaccct ggagtctgcc	300
[1459]	aggccctcac atacctctca gtacctctgt gccagcagcc aactttaccg ggacacctcg	360
[1460]	aacaccgggg agctgttttt tggagaaggc tctaggctga ccgtactgga ggacctgaaa	420
[1461]	aacgtgttcc caccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctccacacc	480
[1462]	caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc	540
[1463]	tggtgggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca cagaccgcga gccctcaag	600
[1464]	gagcagcccg ccctcaatga ctccagatac tgccagca gccgcctgag ggtctcgcc	660
[1465]	accttctggc agaacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg	720
[1466]	gagaatgacg agtggacca ggatagggcc aaacctgtca ccagatcgt cagcgccgag	780
[1467]	gcctggggta gagcagactg tggcttcacc tccagttctt accagcaagg ggtcctgtct	840
[1468]	gccaccatcc tctatgagat cttgctaggg aaggccacct tgtatgccgt gctggtcagt	900
[1469]	gccctcgtgc tgatggccat ggtcaagaga aaggattcca gaggc	945
[1470]	<210> 45	
[1471]	<211> 927	
[1472]	<212> DNA	
[1473]	<213> 人类	
[1474]	<400> 45	
[1475]	atgggccctg ggctcctctg ctgggtgctg ctttgtctcc tgggagcagg cccagtggac	60
[1476]	gctggagtca cccaaagtc cacacacctg atcaaaacga gaggacagca cgtgactctg	120
[1477]	agatgctctc ctatctctgg gcacaagagt gtgtcctggg accaacaggt cctgggtcag	180
[1478]	gggccccagt ttatctttca gtattatgag aaagaagaga gaggaagagg aaacttcct	240
[1479]	gacgattct cagctcgcca gtccctaac tatagctctg agctgaatgt gaacgccttg	300
[1480]	ttgctggggg actcgccct gtatctctgt gccagcagct ttgacgttg tttgccaccc	360
[1481]	ctccactttg ggaacgggac caggctcact gtgacagagg acctgaacaa ggtgttccca	420

[1482]	cccagagtcg ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacaccca aaaggccaca	480
[1483]	ctggtgtgcc tggccacagg cttcttccct gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat	540
[1484]	gggaaggagg tgcacagtgg ggtcagcacg gacccgcagc ccctcaagga gcagcccgcc	600
[1485]	ctcaatgact ccagatactg cctgagcagc cgcctgaggg tctcgccac cttctggcag	660
[1486]	aacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag	720
[1487]	tggaccagg atagggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccaggc ctggggtaga	780
[1488]	gcagactgtg gctttacctc ggtgtcctac cagcaagggg tctgtctgc caccatcctc	840
[1489]	tatgagatcc tgctagggaa ggccaccctg tatgctgtgc tggtcagcgc cttgtgttg	900
[1490]	atggccatgg tcaagagaaa ggatttc	927
[1491]	<210>	46
[1492]	<211>	924
[1493]	<212>	DNA
[1494]	<213>	人类
[1495]	<400>	46
[1496]	atgggctcct ggacctctg ctgtgtgtcc ctttgcattc tggtagcaaa gcacacagat	60
[1497]	gctggagtta tccagtcacc ccggcacgag gtgacagaga tgggacaaga agtgactctg	120
[1498]	agatgtaaac caatttcagg acacgactac cttttctggt acagacagac catgatgcgg	180
[1499]	ggactggagt tgctcattta ctttaacaac aacgttccga tagatgattc agggatgccc	240
[1500]	gaggatcgat tctcagctaa gatgccta atgcattct cactctgaa gatccagccc	300
[1501]	tcagaaccca gggactcagc tgtgtacttc tgtgccagca gctacagggg cactgaagct	360
[1502]	ttctttggac aaggcaccag actcacagtt gtagaggacc tgaacaaggt gttcccaccc	420
[1503]	gaggtcgctg tgtttgagcc atcagaagca gagatctccc acacccaaaa ggccacactg	480
[1504]	gtgtgcctgg ccacaggctt cttccctgac cacgtggagc tgagctggtg ggtgaatggg	540
[1505]	aaggaggtgc acagtggggc cagcacggac ccgcagcccc tcaaggagca gcccgcctc	600
[1506]	aatgactcca gatactgcct gagcagccgc ctgaggggtct cggccacctt ctggcagaac	660
[1507]	ccccgcaacc acttccgctg tcaagtccag ttctacgggc tctcgagaa tgacgagtgg	720
[1508]	accaggata gggccaaacc cgtcaccag atcgtcagcg ccgaggcctg gggtagagca	780
[1509]	gactgtggct ttacctgggt gtcctaccag caaggggtcc tgtctgccac catcctctat	840
[1510]	gagatcctgc tagggaaggc caccctgtat gctgtgctgg tcagcgccct tgtgttgatg	900
[1511]	gccatggtca agagaaagga tttc	924
[1512]	<210>	47
[1513]	<211>	933
[1514]	<212>	DNA
[1515]	<213>	人类
[1516]	<400>	47
[1517]	atgggaatca ggctcctgtg tcgtgtggcc ttttgtttcc tggctgtagg cctcgtagat	60
[1518]	gtgaaagtaa cccagagctc gagatatcta gtcaaaagga cgggagagaa agtttttctg	120
[1519]	gaatgtgtcc aggatatgga ccatgaaaat atgttctggt atcgacaaga cccaggtctg	180
[1520]	gggctacggc tgatctatct ctcatatgat gttaaaatga aagaaaaagg agatattcct	240

[1521]	gaggggtaca gtgtctctag agagaagaag gagecgttct ccctgattct ggagtccgcc	300
[1522]	agcaccaacc agacatctat gtacctctgt gccagcagct taggggcgac aggggctaata	360
[1523]	gaaaaactgt tttttggcag tggaaccag ctctctgtct tggaggacct gaacaagggtg	420
[1524]	ttcccacccg aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctccca caccctaaag	480
[1525]	gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc ttccctgacc acgtggagct gagctgggtgg	540
[1526]	gtgaatggga aggaggtgca cagtgggggtc agcacggacc cgcagcccct caaggagcag	600
[1527]	cccgcctca atgactccag atactgcctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc	660
[1528]	tggcagaacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat	720
[1529]	gacgagtga cccaggatag ggccaaaccc gtcaccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg	780
[1530]	ggtagagcag actgtggctt tacctcgggtg tcctaccagc aaggggtcct gtctgccacc	840
[1531]	atcctctatg agatcctgct aggggaaggcc accctgtatg ctgtgctggt cagcgccctt	900
[1532]	gtgttgatgg ccatggtcaa gagaaaggat ttc	933
[1533]	<210>	48
[1534]	<211>	933
[1535]	<212>	DNA
[1536]	<213>	人类
[1537]	<400>	48
[1538]	atgctgagtc ttctgtcct tctcctggga ctaggctctg tgttcagtgc tgtcatctct	60
[1539]	caaaagccaa gcaggatat ctgtcaacgt ggaacctccc tgacgatcca gtgtcaagtc	120
[1540]	gatagccaag tcacatgat gttctggtac cgtcagcaac ctggacagag cctgacactg	180
[1541]	atcgcaactg caaatcaggg ctctgaggcc acatatgaga gtggatttgt cattgacaag	240
[1542]	tttcccatca gccgcccata cctaacattc tcaactctga ctgtgagcaa catgagccct	300
[1543]	gaagacagca gcatatatct ctgcagcgtt ggggcggggc aaggacctta cacagatacg	360
[1544]	cagtattttg gcccaggcac ccggctgaca gtgctcgagg acctgaaaaa cgtgttccca	420
[1545]	cccgaggtcg ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacaccca aaaggccaca	480
[1546]	ctggtgtgcc tggccacagg cttctacccc gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat	540
[1547]	gggaaggagg tgcacagtgg ggtcagcaca gaccgcagc ccctcaagga gcagcccgcc	600
[1548]	ctcaatgact ccagatactg cctgagcagc cgcctgaggg tctcgccac cttctggcag	660
[1549]	aacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagtctctac ggctctcgga gaatgacgag	720
[1550]	tggaccagag atagggccaa acctgtcacc cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga	780
[1551]	gcagactgtg gcttcacctc cgagtcttac cagcaagggg tcctgtctgc caccatcctc	840
[1552]	tatgagatct tgctagggaa ggccaccttg tatgccgtgc tggtcagtgc cctcgtgctg	900
[1553]	atggccatgg tcaagagaaa ggattccaga ggc	933
[1554]	<210>	49
[1555]	<211>	936
[1556]	<212>	DNA
[1557]	<213>	人类
[1558]	<400>	49
[1559]	atgagcatcg gcctcctgtg ctgtgtggcc ttttctctcc tgtgggcaag tccagtgaat	60

[1560]	gctggtgtca ctcagacccc aaaattccag gtcctgaaga caggacagag catgacactg	120
[1561]	cagtgtgccc aggatatgaa ccataactcc atgtactggt atcgacaaga cccaggcatg	180
[1562]	ggactgaggc tgatttatta ctcagcttct gagggtagca ctgacaaagg agaagtcccc	240
[1563]	aatggctaca atgtctccag attaaacaaa cgggagttct cgctcaggct ggagtcggct	300
[1564]	gctccctccc agacatctgt gtacttctgt gccagcagtg aggtgacagg gggatacaat	360
[1565]	gagcagttct tcgggccagg gacacggctc accgtgctag aggacctgaa aaacgtgttc	420
[1566]	ccacccgagg tcgctgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctccacac ccaaaaggcc	480
[1567]	acactggtgt gcctggccac aggcttctac cccgaccacg tggagctgag ctggtgggtg	540
[1568]	aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acagaccgc agcccccaa ggagcagccc	600
[1569]	gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggctctggc caccttctgg	660
[1570]	cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac	720
[1571]	gagtggaccc aggatagggc caaacctgtc acccagatcg tcagcgcca ggccctgggt	780
[1572]	agagcagact gtggcttcac ctccagttct taccagcaag gggctctgtc tgccaccatc	840
[1573]	ctctatgaga tcttgctagg gaaggccacc ttgtatgccg tgctggtcag tgccctcgtg	900
[1574]	ctgatggcca tggcgaagag aaaggattcc agaggc	936
[1575]	<210>	50
[1576]	<211>	921
[1577]	<212>	DNA
[1578]	<213>	人类
[1579]	<400>	50
[1580]	atgctgagtc ttctgtcct tctcctggga ctaggctctg tgttcagtgc tgtcatctct	60
[1581]	caaaagccaa gcagggatat ctgtcaacgt ggaacctccc tgacgatcca gtgtcaagtc	120
[1582]	gatagccaag tcacatgat gttctggtac cgtcagcaac ctggacagag cctgacactg	180
[1583]	atcgcaactg caaatcaggg ctctgaggcc acatatgaga gtggatttgt cattgacaag	240
[1584]	tttcccatca gccgccc aaa cctaacattc tcaactctga ctgtgagcaa catgagccct	300
[1585]	gaagacagca gcatatatct ctgcagcgtt gaaggcaggg gttacgagca gtacttcggg	360
[1586]	ccgggcacca ggctcacggt cacagaggac ctgaaaaacg tgttcccacc cgaggctcgt	420
[1587]	gtgtttgagc catcagaagc agagatctcc cacacccaaa aggccacact ggtgtgcctg	480
[1588]	gccacaggct tctaccccga ccacgtggag ctgagctggt gggtagaatg gaaggagggtg	540
[1589]	cacagtgggg tcagcacaga ccgcagccc ctcaaggagc agcccgccct caatgactcc	600
[1590]	agatactgcc tgagcagccg cctgagggtc tcggccacct tctggcagaa cccccgcaac	660
[1591]	cacttccgct gtcaagtcca gttctacggg ctctcggaga atgacgagtg gaccaggat	720
[1592]	agggccaaac ctgtcaccca gatcgtcagc gccgaggcct gggtagagc agactgtggc	780
[1593]	ttcacctccg agtcttacca gcaagggtc ctgtctgcca ccatactcta tgagatcttg	840
[1594]	ctagggaagg ccaccttgta tgccgtgctg gtcagtgecc tcgtgctgat ggccatggtc	900
[1595]	aagagaaagg attccagagg c	921
[1596]	<210>	51
[1597]	<211>	930
[1598]	<212>	DNA

[1599]	<213> 人类	
[1600]	<400> 51	
[1601]	atgcagtggg ccctagcggg gcttctagct ttcctgtctc ctgccagtca gaaatcttcc	60
[1602]	aacttggaag ggagaacgaa gtcagtcacg aggcagactg ggtcatctgc tgaaatcact	120
[1603]	tgtgatcttg ctgaaggaag taccggctac atccactggg acctacacca ggaggggaag	180
[1604]	gccccacagc gtcttctgta ctatgactcc tacacctcca gcgttgtgtt ggaatcagga	240
[1605]	atcagcccag ggaagtatga tacttatgga agcacaagga agaacttgag aatgatactg	300
[1606]	cgaatcttta ttgaaaatga ctctggagtc tattactgtg ccacctggga aactcaagag	360
[1607]	ttgggcaaaa aaatcaaggt atttgggtccc ggaacaaagc ttatcattac agataaacia	420
[1608]	cttgatgcag atgtttcccc caagcccact atttttcttc cttcaattgc tgaaacaaag	480
[1609]	ctccagaagg ctggaacata cctttgtctt cttgagaaat ttttccctga tgttattaag	540
[1610]	atacattggc aagaaaagaa gagcaacacg attctgggat cccaggaggg gaacaccatg	600
[1611]	aagactaacg acacatacat gaaatcttagc tgggttaacg tgccagaaaa gtcactggac	660
[1612]	aaagaacaca gatgtatcgt cagacatgag aataataaaa acggagttga tcaagaaatt	720
[1613]	atctttcctc caataaagac agatgtcacc acaatggatc ccaaagacaa ttgttcaaaa	780
[1614]	gatgcaaatg atacactact gctgcagctc acaaacacct ctgcatatta catgtacctc	840
[1615]	ctcctgtccc tcaagagtgt ggtctatctt gccatcatca cctgctgtct gcttagaaga	900
[1616]	acggctttct gctgcaatgg agagaaatca	930
[1617]	<210> 52	
[1618]	<211> 885	
[1619]	<212> DNA	
[1620]	<213> 人类	
[1621]	<400> 52	
[1622]	atgctgttct ccagcctgct gtgtgtatct gtggccttca gctactctgg atcaagtgtg	60
[1623]	gccagaagg ttactcaagc ccagtcacga gtatccatgc cagtgaggaa agcagtcacc	120
[1624]	ctgaactgcc tgtatgaaac aagttgggtg tcatattata ttttttggtg caagcaactt	180
[1625]	cccagcaaag agatgatttt ctttatctgc cagggttctg atgaacagaa tgcaaaaagt	240
[1626]	ggctgctatt ctgtcaactt caagaaagca gtgaaatccg tcgccttaac catttcagcc	300
[1627]	ttacagctag aagattcagc aaagtacttt tgtgctcttg ggtccaagc cctcctaccc	360
[1628]	atactggggg ataccaccga taaactcacc tttggaaaag gaaccctgtg gactgtggaa	420
[1629]	ccaagaagtc agcctcacc caaacatcc gtttttgtca tgaaaaatgg aacaaatgtc	480
[1630]	gcttgtctgg tgaaggaatt ctaccccaag gatataagaa taaatctcgt gtcacccaag	540
[1631]	aagataacag agtttgatcc tgctattgtc atctctccca gtgggaagta caatgctgtc	600
[1632]	aagcttggtg aatatgaaga ttcaaattca gtgacatgtt cagttcaaca cgacaataaa	660
[1633]	actgtgcaat ccactgactt tgaagtgaag acagattcta cagatcacgt aaaaccaaag	720
[1634]	gaaactgaaa acacaaagca accttcaaag agctgccata aacccaaagc catagtcat	780
[1635]	accgagaagg tgaacatgat gtccctcaca gtgcttgggc tacgaatgct gtttgcaaag	840
[1636]	actgttgccg tcaatcttct cttgactgcc aagttatctt tcttg	885
[1637]	<210> 53	

[1638]	<211> 22
[1639]	<212> DNA
[1640]	<213> 人类
[1641]	<400> 53
[1642]	ctcggcaggc cgagccacgg gc 22
[1643]	<210> 54
[1644]	<211> 22
[1645]	<212> DNA
[1646]	<213> 人类
[1647]	<400> 54
[1648]	gcccgtggct cggcctgccg ag 22
[1649]	<210> 55
[1650]	<211> 27
[1651]	<212> DNA
[1652]	<213> 人工序列
[1653]	<220>
[1654]	<223> 具有限制性位点的引物
[1655]	<400> 55
[1656]	ctcgagatgt ctcgctccgt ggcctta 27
[1657]	<210> 56
[1658]	<211> 32
[1659]	<212> DNA
[1660]	<213> 人工序列
[1661]	<220>
[1662]	<223> 具有限制性位点的引物
[1663]	<400> 56
[1664]	gtgtgagttt tgctgctagc ctgggggacc tg 32
[1665]	<210> 57
[1666]	<211> 32
[1667]	<212> DNA
[1668]	<213> 人工序列
[1669]	<220>
[1670]	<223> 具有限制性位点的引物
[1671]	<400> 57
[1672]	caggtccccc aggctagega caaaactcac ac 32
[1673]	<210> 58
[1674]	<211> 31
[1675]	<212> DNA
[1676]	<213> 人工序列

-
- [1677] <220>
[1678] <223> 具有限制性位点的引物
[1679] <400> 58
[1680] gcggccgctc atttaccg agacaggag a 31

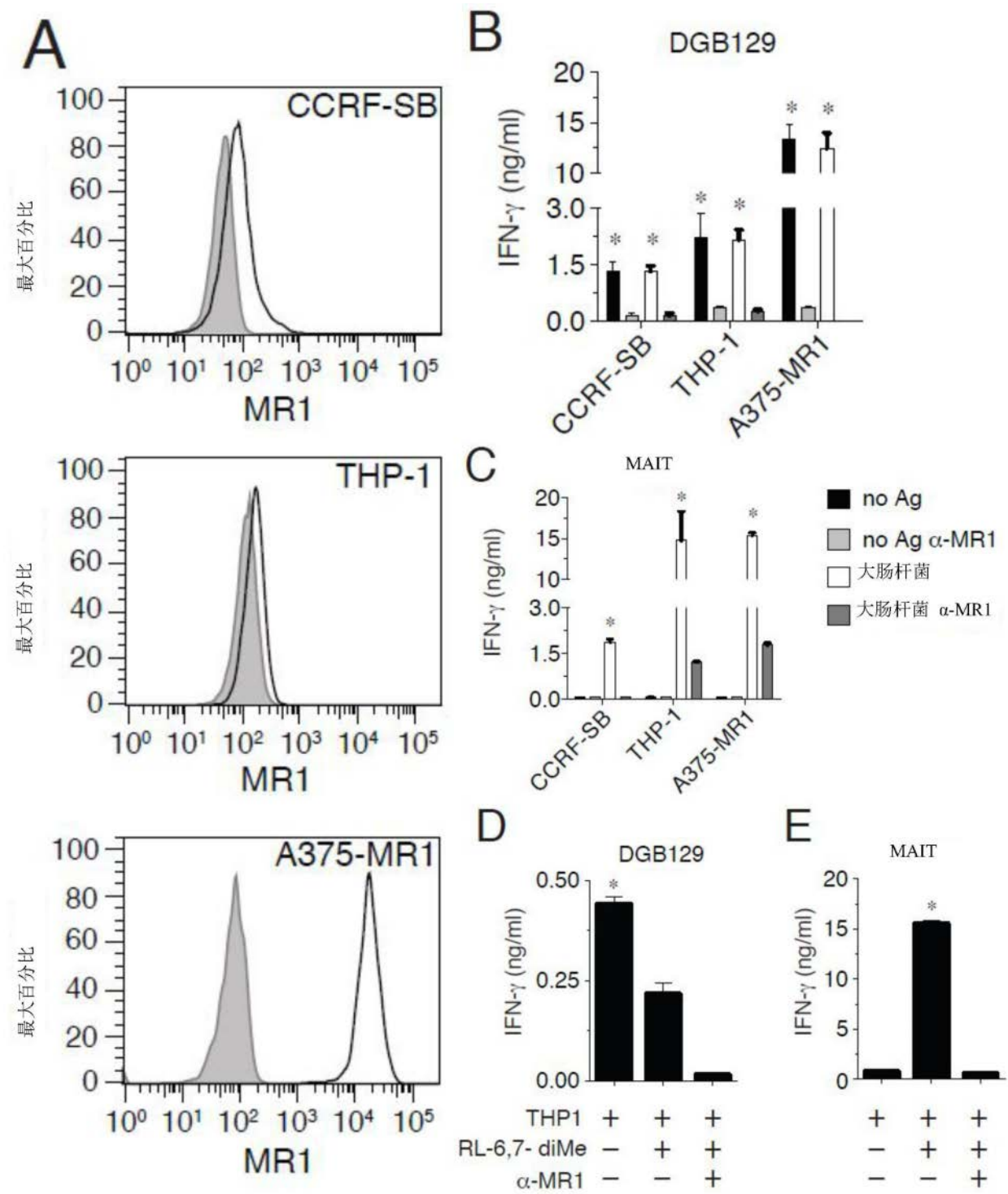


图1

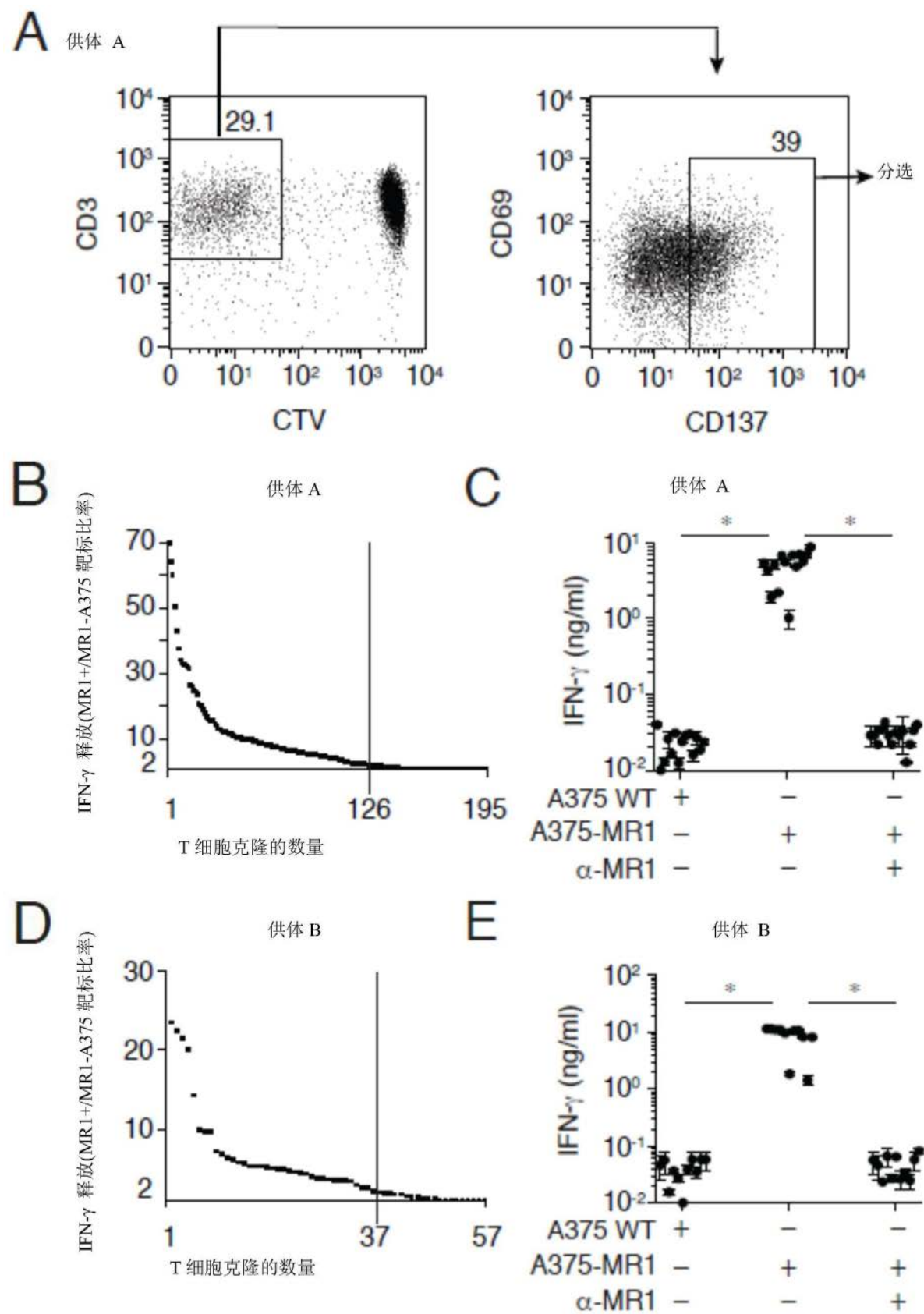


图2

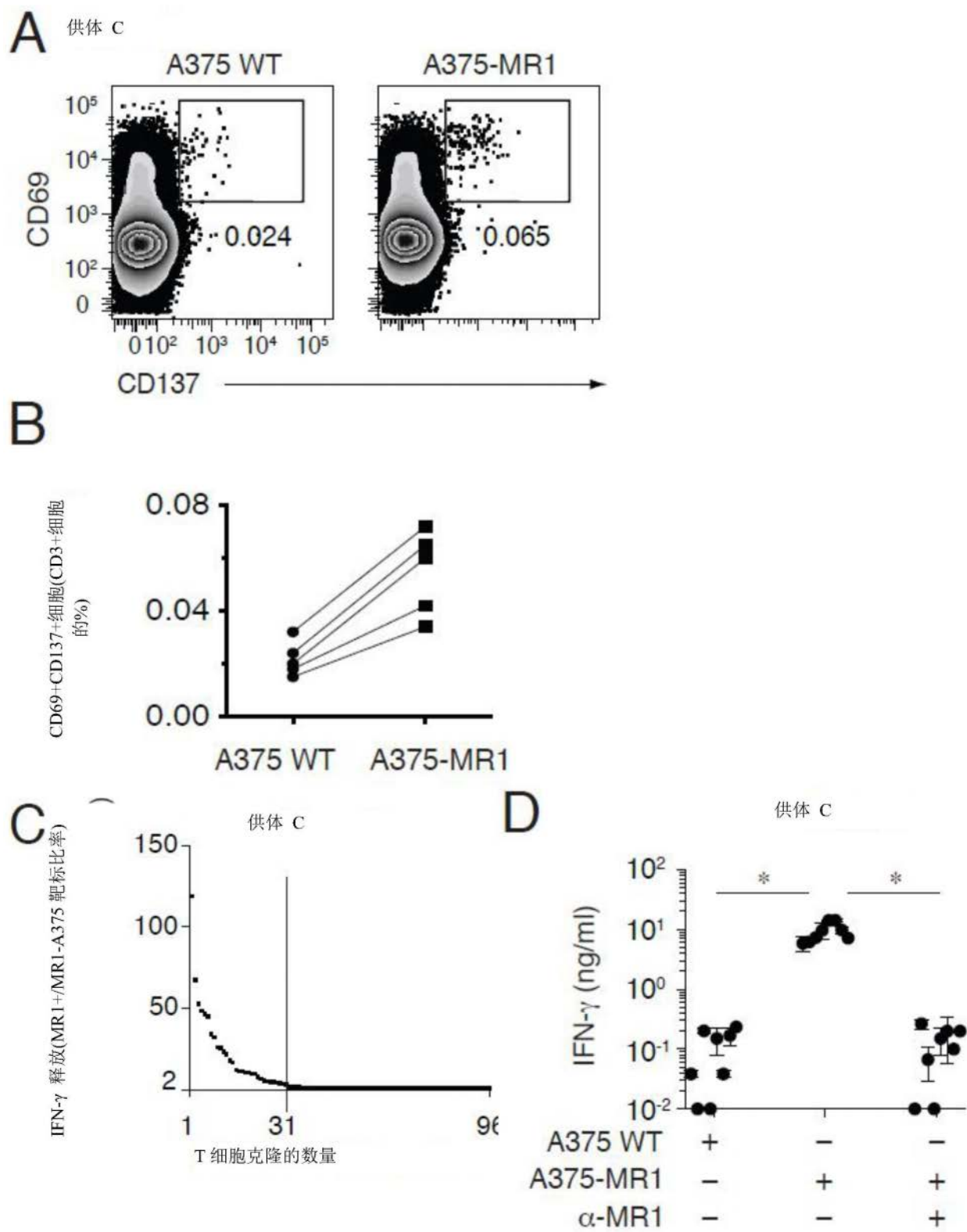


图3

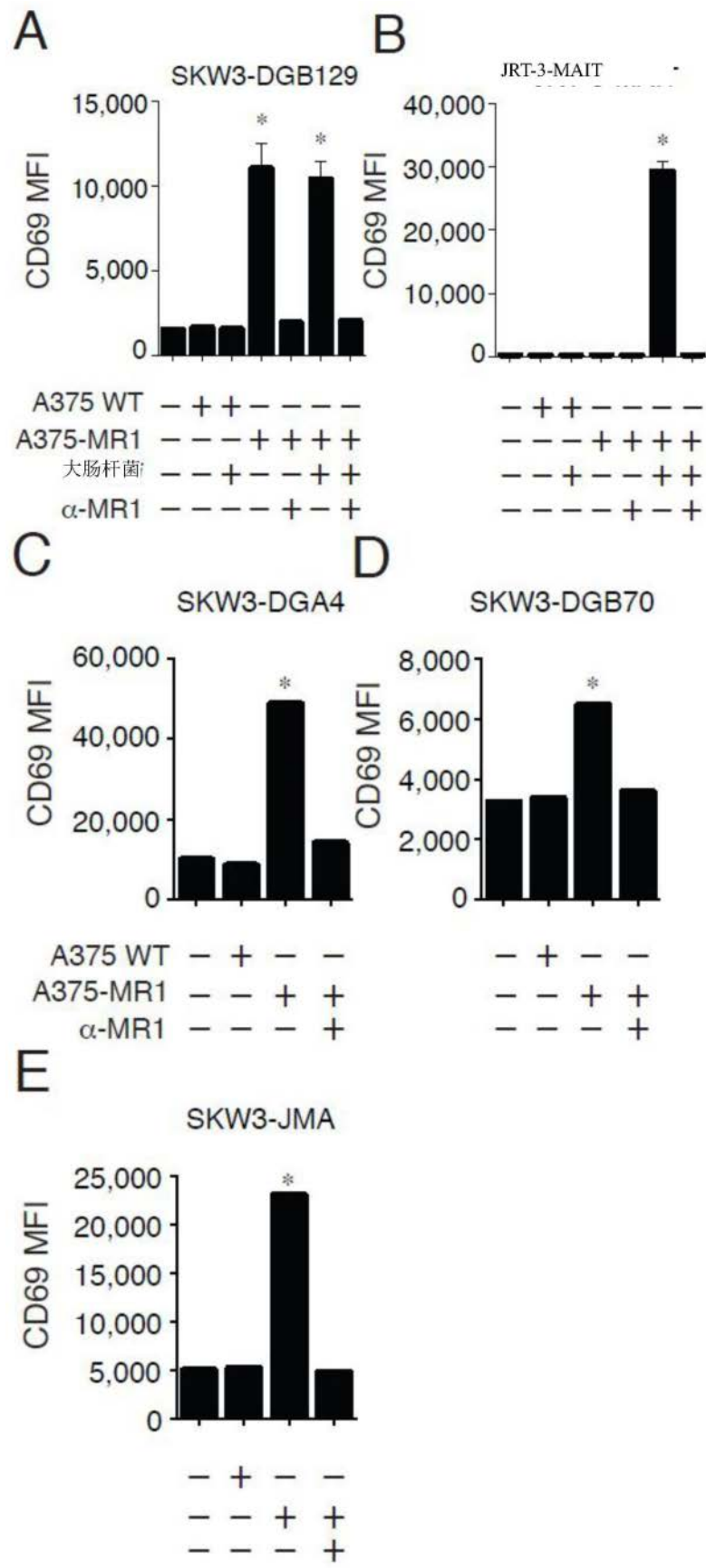


图4

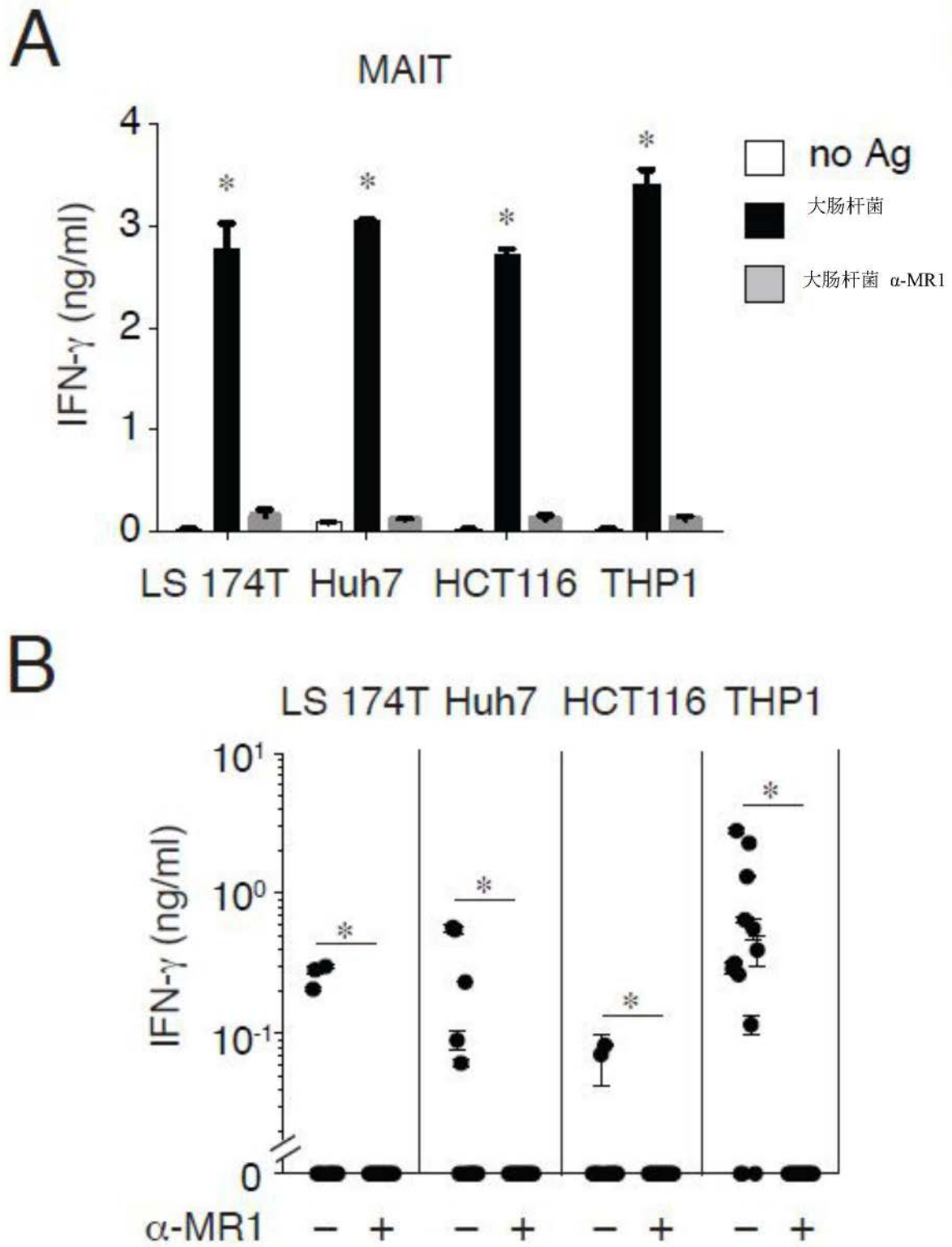


图5

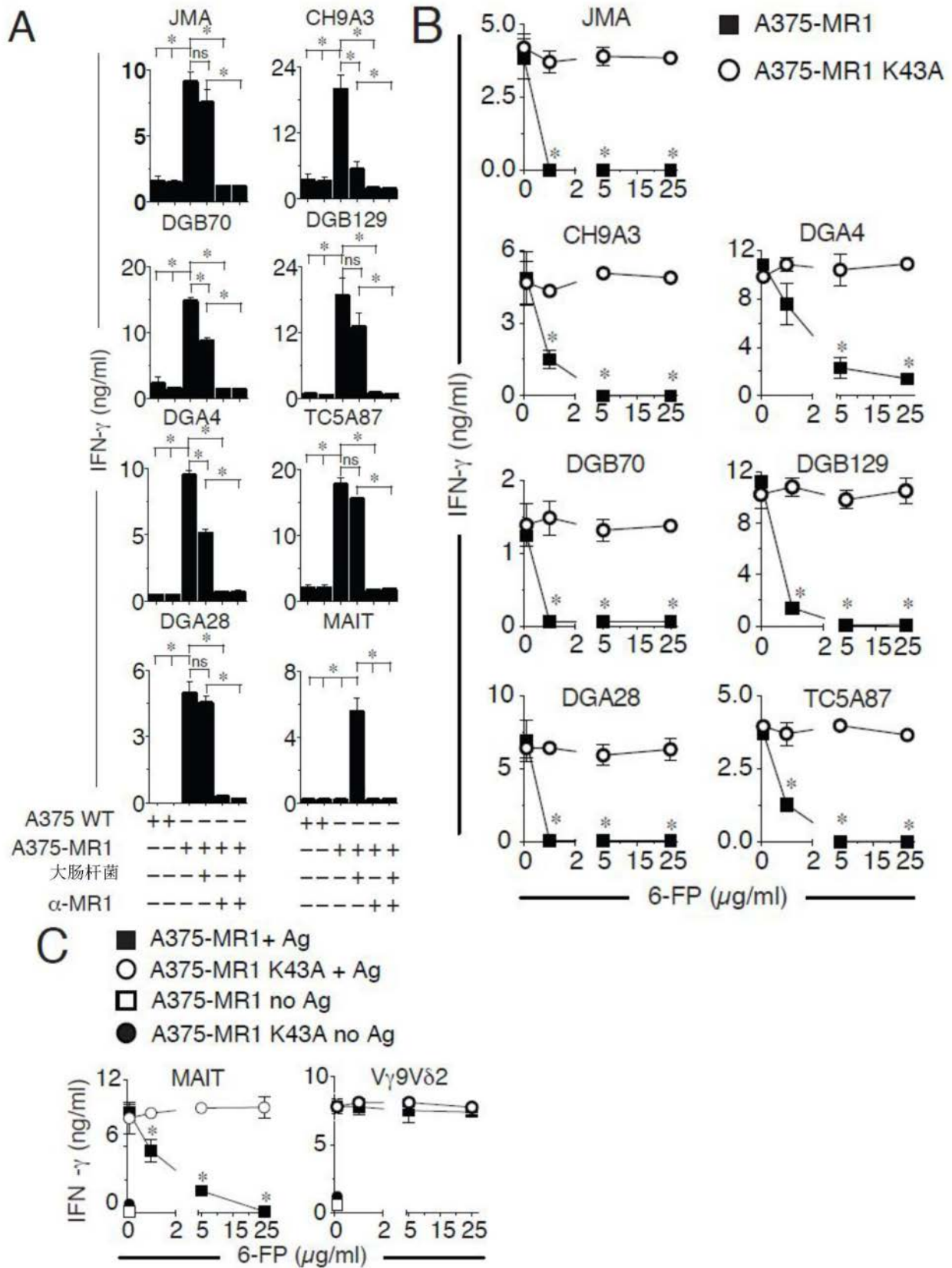


图6

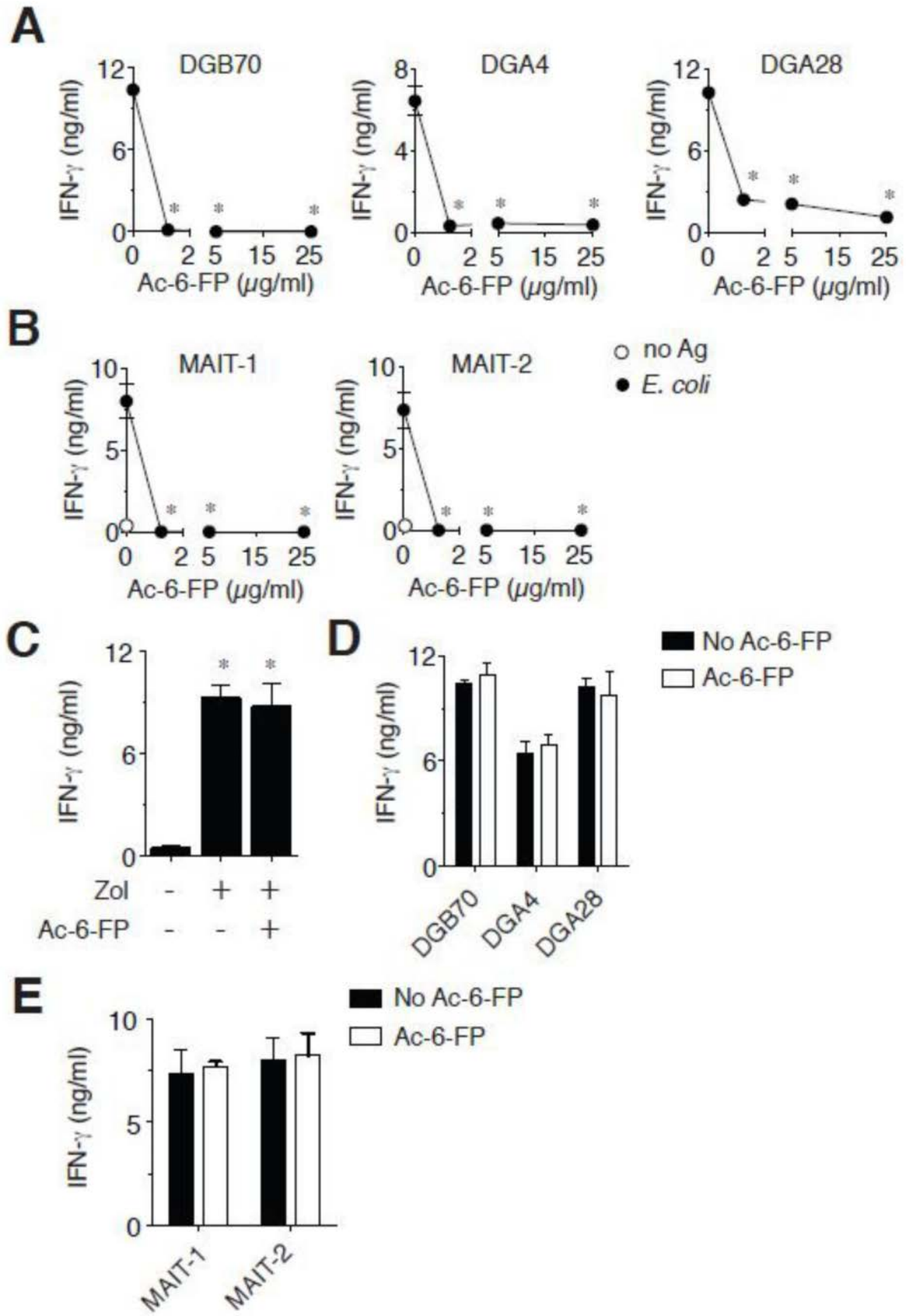


图7

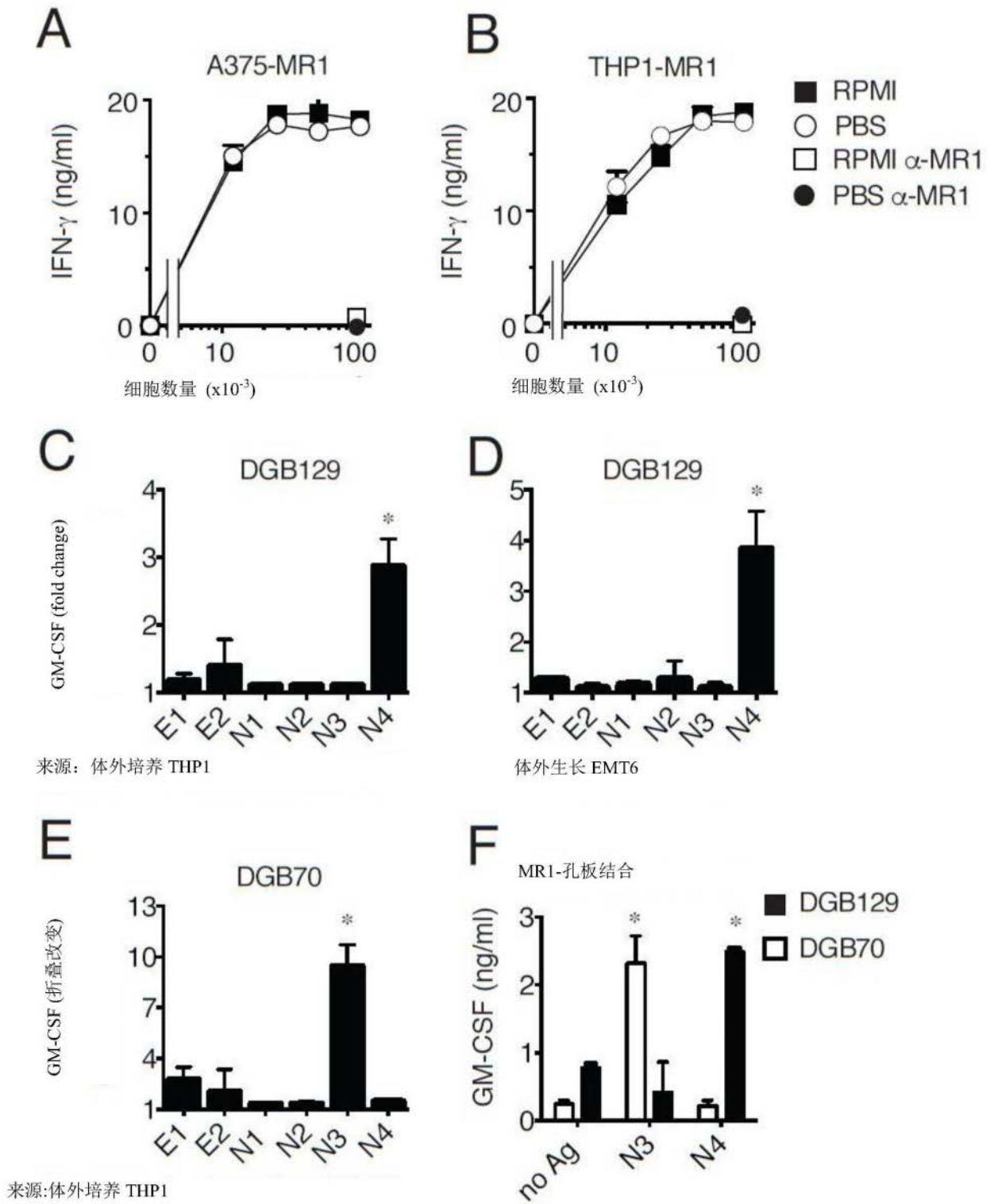


图8

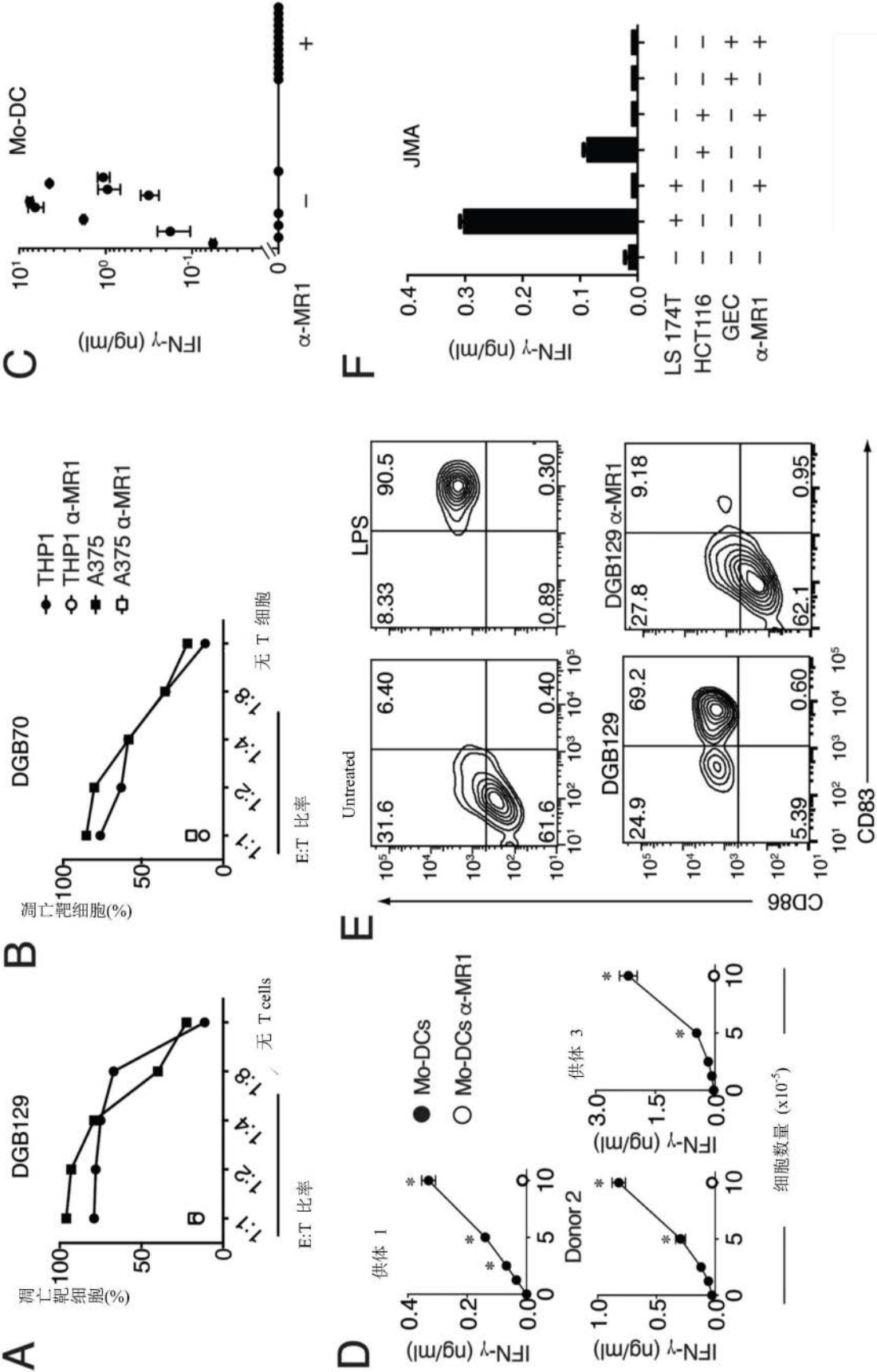


图9

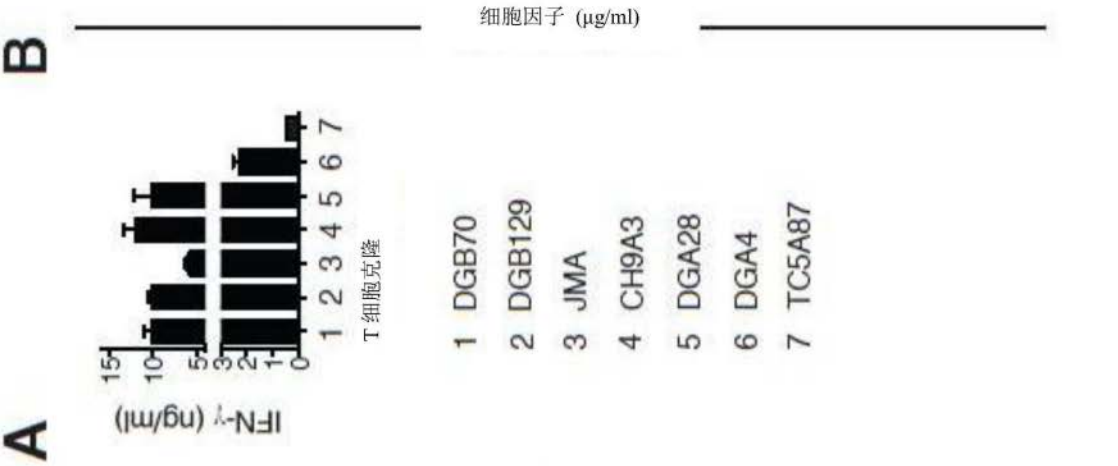


图10

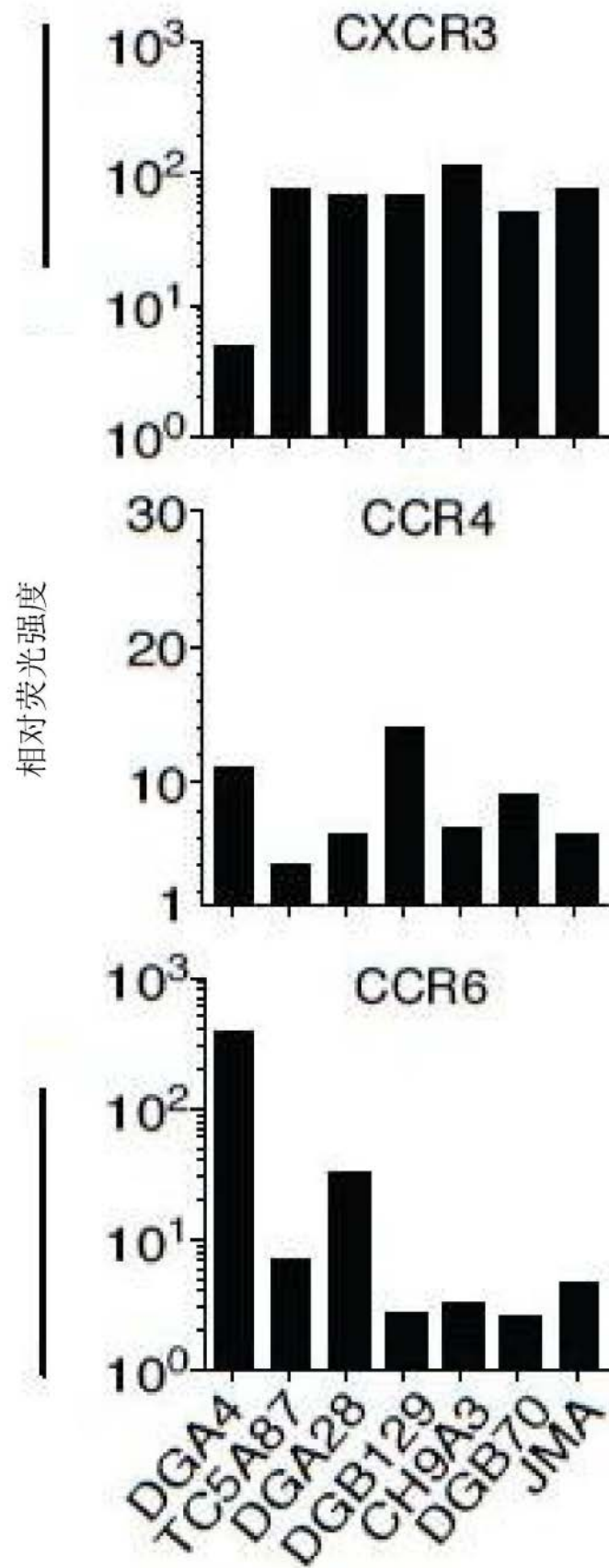


图11

肿瘤细胞注射后第 14 天

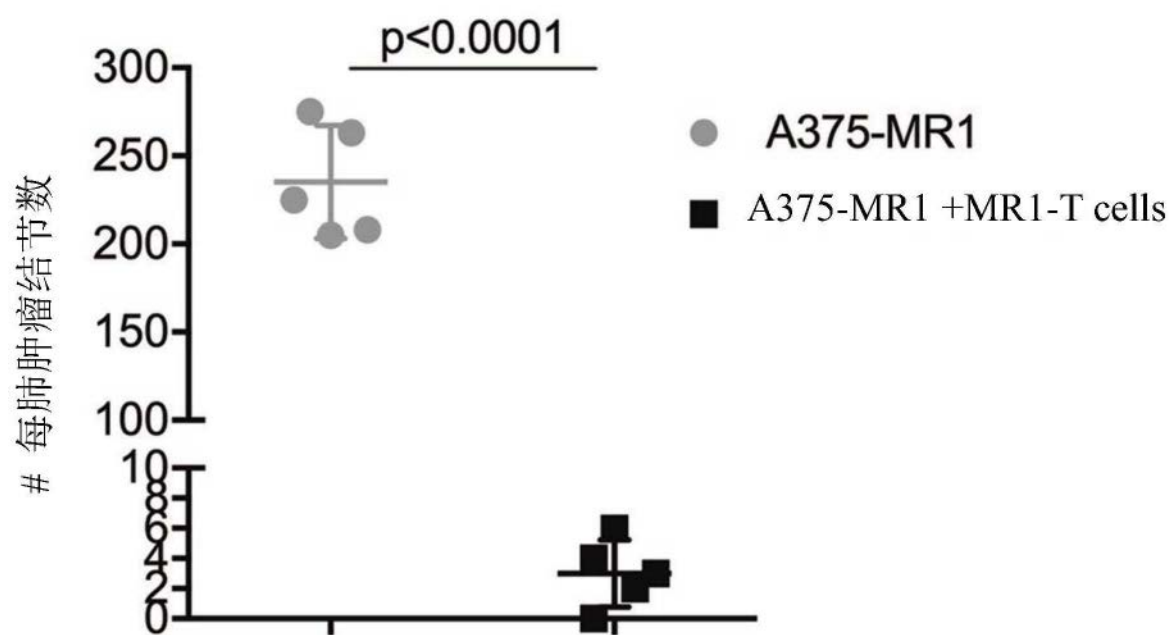


图12