



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104395462 B

(45)授权公告日 2017.09.26

(21)申请号 201380030757.9

C12N 15/867(2006.01)

(22)申请日 2013.05.02

C07K 19/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61K 35/17(2015.01)

申请公布号 CN 104395462 A

A61P 35/00(2006.01)

(43)申请公布日 2015.03.04

A61P 31/12(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 31/04(2006.01)

61/642,358 2012.05.03 US

A61P 37/02(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(56)对比文件

2014.12.11

WO 0026249 A1,2000.05.11,

(86)PCT国际申请的申请数据

WO 0026249 A1,2000.05.11,

PCT/US2013/039316 2013.05.02

WO 2009097140 A1,2009.08.06,

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/166321 EN 2013.11.07

EP 1127068 A1,2001.08.29,

(73)专利权人 弗雷德哈钦森癌症研究中心

SCHMITT, THOMAS M. 等.T cell receptor

地址 美国华盛顿州

gene therapy for cancer.《Human Gene

(72)发明人 托马斯·M·施米特

Therapy》.2009,第20卷(第11期),

菲利普·D·格林伯格

Michelle Leigh Dossett.Generation and

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

Experssion of High Affinity, Tumor

公司 11021

Antigen-Specific Mouse and Human T Cell

代理人 张国梁

Receptors to Genetically Modify CD8+ T

Cells for Adoptive Immunotherapy of

Cancer.《digital.lib.washington.edu》.2006,

(续)

审查员 刘铮

(51)Int.Cl.

C12N 5/0783(2010.01)

权利要求书3页 说明书23页

C12N 5/10(2006.01)

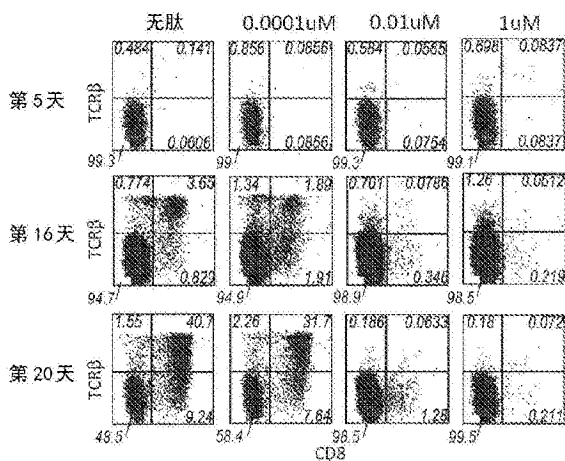
序列表32页 附图12页

(54)发明名称

增强亲和力的T细胞受体及其制备方法

(57)摘要

本公开提供通过用表达Delta-like-1或Delta-like-4的基质细胞培养的抗原特异的TCR α的造血祖细胞的激动剂选择产生增强亲和力的T细胞受体的方法,由此种方法制备的组合物,和其用途。



CN 104395462 B

[接上页]

(56)对比文件

Michelle Leigh Dossett.Generation and Experssion of High Affinity, Tumor Antigen-Specific Mouse and Human T Cell Receptors to Genetically Modify CD8+ T Cells for Adoptive Immunotherapy of Cancer.《digital.lib.washington.edu》.2006,

DOSSETT, MICHELLE L. 等.Adoptive immunotherapy of disseminated leukemia with TCR-transduced, CD8+ T cells

exppressiing a known endogenous TCR.

《Molecular Therapy》.2009,第17卷(第4期),

ALLI RAJSHEKHAR 等.Rational design of T cell receptors with enhanced sensitivity for antigen.《PLOS ONE》.2011,第6卷(第3期),

KIEBACK ELISA 等.Enhanced T cell receptor gene therapy for cancer.《Expert Opinion on Biological Therapy》.2010,第10卷(第5期),

1. 一种产生表达T细胞受体 (TCR) 的细胞的方法,所述方法包括:
 - a. 在足以诱导造血祖细胞分化为双阴性 (DN) TCR $\alpha\beta^+$ 胸腺细胞的条件下和时间下将造血祖细胞与基质细胞和肽抗原接触,
其中所述造血祖细胞包含编码来自特异于所述肽抗原的亲本TCR的TCR α 链的非内源性核酸序列,并且
其中所述基质细胞包含编码Delta-like-1或Delta-like-4的非内源性核酸序列和编码MHC分子的核酸;和
 - b. 将来自步骤 (a) 产生的所述DN TCR $\alpha\beta^+$ 胸腺细胞的编码TCR β 链的核酸引入能够在细胞表面上表达TCR和包含编码来自步骤 (a) 的TCR α 链的非内源性核酸序列的细胞;
由此产生表达TCR的细胞。
2. 权利要求1所述的方法,所述方法还包括评估步骤 (b) 的细胞表达的一个以上TCRs的结合亲和力。
3. 权利要求2所述的方法,其中一个以上TCRs中的至少一个具有比亲本TCR更强的对于所述肽抗原的结合。
4. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述造血祖细胞包括胸腺细胞祖细胞。
5. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述造血祖细胞源自造血干细胞。
6. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中编码特异于所述肽抗原的TCR α 链的非内源性核酸已经使用病毒载体引入所述造血祖细胞和/或包含在病毒载体中。
7. 权利要求6所述的方法,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。
8. 权利要求6所述的方法,其中所述病毒载体是慢病毒载体。
9. 权利要求6所述的方法,其中所述病毒载体进一步包含用于转导的基因标记。
10. 权利要求9所述的方法,其中所述用于转导的基因标记包括绿色荧光蛋白或人CD2的细胞外结构域。
11. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述基质细胞表达Delta-like-1。
12. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述基质细胞源自OP9。
13. 权利要求2或3所述的方法,其中评估TCR的结合亲和力包括使用MHC-肽四聚体染色。
14. 权利要求13所述的方法,其中MHC-肽四聚体染色包括使用多次MHC-肽四聚体染色来选择表达TCR的细胞。
15. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中使用病毒载体将编码来自步骤 (b) 的TCR β 链的核酸序列引入能够在细胞表面上表达TCR的细胞。
16. 权利要求15所述的方法,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。
17. 权利要求15所述的方法,其中所述病毒载体是慢病毒载体。
18. 权利要求15所述的方法,其中所述病毒载体进一步包含用于转导的基因标记。
19. 权利要求18所述的方法,其中所述用于转导的基因标记包含绿色荧光蛋白。
20. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中能够在细胞表面上表达TCR的细胞源自TCR α^-/β^+58T 细胞杂交瘤。
21. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中步骤 (b) 的细胞表达的TCR包括人TCR。
22. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述MHC分子包括I类MHC分子。

23. 权利要求22所述的方法,其中所述MHC分子包括HLA-A2和人 β -2-微球蛋白(β 2M)。
24. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述MHC分子包括II类MHC分子。
25. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述肽抗原选自病毒抗原,细菌抗原,癌抗原,和自身免疫抗原。
26. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述肽抗原是WT1肽抗原或间皮素肽抗原。
27. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述肽抗原是包含RMFPNAPYL (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的WT1肽抗原。
28. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述肽抗原是包含GQKMNAQAI (SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的间皮素肽抗原。
29. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中步骤(a)中的接触包括将所述肽抗原与培养中的造血祖细胞和基质细胞组合。
30. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述基质细胞还包含编码所述肽抗原的核酸序列。
31. 权利要求1-3任一项所述的方法,所述方法还包括,在步骤(b)中的引入之前,从DN TCR $\alpha\beta^+$ 胸腺细胞分离编码不同TCR β 链的核酸序列,其中所述分离包括选择编码TCR β 链并且包含与亲本TCR的 β 链相同的V β 基因的核酸序列,并且其中所述引入包括将编码所选择的一个以上TCR β 链的核酸引入到细胞中。
32. 来自权利要求1-3任一项所述的方法产生的细胞的TCR,或其结合结构域,其中所述TCR或其结合结构域具有比亲本TCR更强的对于所述肽抗原的结合亲和力。
33. 权利要求32的TCR或其结合结构域,其中所述TCR或其结合结构域包含:含有亲本TCR β 链可变区的CDR1的TCR β 链可变区,含有亲本TCR β 链可变区的CDR2的TCR β 链可变区,或含有亲本TCR β 链可变区的CDR1和CDR2的TCR β 链可变区。
34. 权利要求32的TCR或其结合结构域,其中所述TCR或其结合结构域是包含细胞毒性或可检测组分的融合蛋白的组分。
35. 权利要求32的TCR或其结合结构域,其中所述肽抗原是WT1肽抗原或间皮素肽抗原。
36. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求32的TCR或其结合结构域,和药学区接受的载体,稀释剂,或赋形剂。
37. 来自权利要求1-3任一项所述的方法产生的细胞的TCR或其结合结构域在制备用于治疗患有感染性疾病、自身免疫病或癌症的受试者的药物中的用途。
38. 权利要求37所述的用途,其中所述受试者是人。
39. 权利要求38所述的用途,其中所述TCR是人TCR。
40. 权利要求37所述的用途,其中将所述TCR是可溶的TCR。
41. 权利要求37所述的用途,其中所述TCR是在T细胞的表面上。
42. 权利要求41所述的用途,其中所述T细胞是调节性T细胞。
43. 权利要求41所述的用途,其中所述T细胞是CD8 $^+$ T细胞,CD4 $^+$ T细胞或两者。
44. 权利要求41所述的用途,其中所述T细胞对于所述受试者是自体的。
45. 权利要求37所述的用途,其中所述受试者患有癌症。
46. 权利要求45所述的用途,其中所述癌症选自乳腺癌,卵巢癌,急性白血病,血管肿瘤,黑素瘤,结肠癌,肺癌,甲状腺癌,骨和软组织肉瘤,或食管癌。

47. 权利要求45所述的用途,其中所述癌症是急性髓细胞白血病,急性淋巴细胞性白血病,或慢性粒细胞白血病。

48. 权利要求37所述的用途,其中所述受试者患有自身免疫病。

49. 权利要求48所述的用途,其中所述自身免疫病是关节炎,炎性肠病,动脉粥样硬化,银屑病,系统性红斑狼疮,或糖尿病。

50. 权利要求37所述的用途,其中所述受试者患有感染性疾病。

51. 权利要求50所述的用途,其中所述感染性疾病是细菌感染。

52. 权利要求50所述的用途,其中所述感染性疾病是病毒感染。

53. 权利要求52所述的用途,其中所述病毒感染是腺病毒,本雅病毒,疱疹病毒,乳头瘤病毒,副粘病毒,小核糖核酸病毒,棒状病毒,正粘病毒,痘病毒,呼肠孤病毒,逆转录病毒,慢病毒,或虫媒病毒感染。

54. 通过权利要求1-31任一项的方法产生的表达TCR的细胞。

55. 权利要求54的细胞,其中来自DN TCR $\alpha\beta^+$ 胸腺细胞的编码TCR β 链的核酸序列包含来自亲本TCR的V β 基因。

56. 权利要求54或55的细胞,其中表达的TCR包含含有亲本TCR β 链的CDR1的TCR β 链,表达的TCR包含含有亲本TCR TCR β 的CDR2的TCR β 链可变区,或二者。

57. 权利要求54或55的细胞,其中所述细胞是T细胞。

58. 权利要求57的细胞,其中所述细胞是调节性T细胞。

59. 权利要求57的细胞,其中所述细胞是CD8 $^+$ T细胞或CD4 $^+$ T细胞。

60. 权利要求54或55的细胞,其中编码TCR的核酸序列是为了在T细胞中表达而密码子优化的。

增强亲和力的T细胞受体及其制备方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 在35U.S.C. §119(e)下,本申请要求2012年5月3日提交的美国临时申请61/642,358的权益,所述申请以其整体通过引用并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 以文本形式替代纸件拷贝提供与本申请相关的序列表,并且通过引用在此并入本说明书。含有序列表的文本文件的名称为360056_412WO_SEQUENCE_LISTING.TXT。该文本文件为129KB,于2013年5月2日建立并且通过EFS-Web电子提交。

[0005] 政府利益的声明

[0006] 以在由美国国立卫生研究院(National Institute of Health)/美国国立癌症研究所(National Cancer Institute)授予的合同No.P01 CA 18029下的政府支持完成本发明。在本发明中,政府具有某些权利。

[0007] 背景

技术领域

[0008] 本公开涉及增强亲和力的T细胞受体(TCRs)和,更特别地,涉及使用表达抗原特异的TCR α 的造血祖细胞的激动剂选择产生增强亲和力的TCRs,和其用途。

[0009] 相关技术描述

[0010] TCR基因治疗是新兴的治疗方法,其可能克服很多与常规T细胞过继免疫治疗相关的困难,比如分离,表征,和扩展肿瘤抗原特异的T细胞克隆所需的大量的时间和劳动(Schmitt,Ragnarsson,&Greenberg,2009,Hum.Gene Ther.20:1240-1248)。基因治疗的进一步好处包括利用能够长期体内留存的明确的T细胞群体的能力(Berger等人,2008,J.Clin.Invest.118:294-305;Hinrichs等人,2009,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 106:17469-17474)。此种T细胞可以用编码良好表征的对于肿瘤抗原具有高亲和力的TCRs的基因转导,从而增加介导抗肿瘤效果的可能性。实际上,近期的以遗传修饰的表达靶向自身/肿瘤-抗原的高亲和力嵌合受体的T细胞靶向晚期B细胞白血病的治疗的报道强调使用设计的高亲和力T细胞用于治疗白血病的可能(Kalos等人,2011,Sci.Transl.Med.3:95ra73)。然而,因为由T细胞免疫治疗靶向的大多数肿瘤抗原是过表达的自身蛋白,因此特异于这些抗原的高亲和力T细胞一般在胸腺中接受负选择。因此,基于T细胞的免疫治疗的一个重要限制通常是对非突变肿瘤抗原具有足够高亲和力的表达内源性TCR的T细胞的有限的利用度。

[0011] 已经开发了一些策略以增强意在用于TCR基因治疗的TCRs的亲合力(Richman&Kranz,2007,Biomol.Eng.24:361-373;Udyavar等人,2009,J.Immunol.182:4439-4447;Zhao等人,2007,J.Immunol.179:5845-5854)。这些方法通常需要产生TCR突变体文库,其经过数轮诱变和随后筛选赋予对靶肽/MHC配体的更高亲和力的突变。突变通常在已知与肽/MHC相互作用的CDR1和CDR2区域显著地与MHC分子接触,而高变的CDR3区域主要接触肽(Wucherpfennig等人,2010,Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2:a005140-a005140)。位点定向的诱变策略通常靶向所有这三个区域的选择的部分,但仍然

不总是成功产生更高亲和力变体,并且改善被限制于仅在具体靶向的区域的改变。此外,引入MHC接触残基的突变有可能增加TCR对MHC的亲和力同时减少受体对其同源肽的总体特异性的风险。由于此原因,理想的是,引入以增强TCR的亲和力的大多数突变将被限制于CDR3区域。然而,目前的方法学限制于产生CDR3多样性的能力,因为位点定向的诱变受限于CDR3区域的原长度。

[0012] 鉴于分离识别与抗原相关的相关肿瘤的高亲和力T细胞的困难,存在对用于产生增强亲和力的TCRs的替代方法的持续需要。

[0013] 简短概述

[0014] 在一个方面,本公开提供产生增强亲和力的TCR的方法,所述方法包括:a)在足以诱导造血祖细胞分化为DN TCR $\alpha\beta^+$ 胸腺细胞条件下将造血祖细胞与基质细胞和肽抗原接触达足以诱导造血祖细胞分化为DN TCR $\alpha\beta^+$ 胸腺细胞的时间,其中所述造血祖细胞包含编码来自特异于肽抗原的亲本TCR的TCR α 链的非内源性核酸序列,并且其中所述基质细胞包含编码Delta-like-1或Delta-like-4的非内源性核酸序列和编码MHC分子的核酸序列;b)从DN TCR $\alpha\beta^+$ 胸腺细胞分离编码不同TCR β 链的核酸序列并且将编码TCR β 链的核酸序列引入能够在细胞表面上表达TCR和包含编码来自步骤a)的TCR α 链的核酸序列的细胞;并且鉴定增强亲和力的TCR(例如,通过MHC四聚体测定检测或选择高亲和力TCR $\alpha\beta$ 候选物,并随后测量与亲本TCR $\alpha\beta$ 相比的结合亲和力)。

[0015] 在进一步的方面,提供由本文公开的方法产生的增强亲和力的TCRs,所述增强亲和力的TCRs可以是结合细胞的或可溶形式,并且可以进一步被密码子优化以增强在T细胞中的表达。

[0016] 在更进一步的方面,本公开的增强亲和力的TCRs可以通过施用包含增强亲和力的TCRs的组合物用于在受试者中治疗疾病(比如癌症,感染性疾病,或自身免疫病)。在进一步实施方案中,本公开的增强亲和力的TCRs可以用于诊断方法或成像方法,包括用于本文中所鉴定的适应证或病症相关的这些方法。

[0017] 当参考以下详述和附图时,本发明的这些或其它方面将变得显而易见。本文公开的所有参考文献由此像各自分别并入一样,以其整体通过引用并入。

[0018] 附图简述

[0019] 图1A-D:如表明的,分选来自OT-1转基因小鼠的胸腺细胞的TCR β^- TCR $\gamma\delta^-$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ CD117 $^+$ CD44 $^+$ DN1和DN2祖细胞并在不同浓度的卵清蛋白SIINFEKL肽(SEQ ID NO:1)的存在下,培养在表达I类MHC H-2Kb分子的OP9-DL1细胞上达20天。(A,B,C)通过在指定时间点的流式细胞术分析培养物。(D)在培养的第20天确定各个培养物的总细胞性。

[0020] 图2:将尚未通过从B6或OT-1转基因小鼠分选的阳性选择的CD69 $^-$ DP胸腺细胞在卵清蛋白SIINFEKL肽(SEQ ID NO:1)的存在下培养在表达I类MHC H-2Kb分子OP9-DL1细胞上。

[0021] 图3A-C:分选B6胸腺细胞的CD4 $^-$ CD8 $^-$ CD117 $^+$ CD44 $^+$ DN1和DN2祖细胞并用亲和力增强的WT1特异的TCR 3D克隆的TCR α 链转导,并存在或缺少1 μ M的WT1肽RMFPNAPYL(SEQ ID NO:2)的情况下培养在表达I类MHC H-2Db分子的OP9-DL1细胞上。(A)在培养的第16天,通过流式细胞术分析转导的(hCD2 $^+$)和未转导的(hCD2 $^-$)细胞。(B)在存在1 μ M WT1肽RMFPNAPYL(SEQ ID NO:2)的情况下OP9-DL1培养的第21天,根据指定方案分选DN TCR $\alpha\beta^+$ 细胞。(C)溶解分选的细胞,分离DNA,并且使用Vb10-特异的正向引物和Cb2-特异的反向引物进行PCR。随后将

Vb10PCR产物定向TOPO-克隆在载体pENTR/D-TOPO中,使用Gateway®技术转入逆转录病毒载体MigR1-attR,并且产生逆转录病毒上清并用于转导鼠58^{-/-}细胞以用于如描述的文库筛选。

[0022] 图4A-C:所述逆转录病毒TCRβ文库用于转导CD8⁺3Dα⁺58^{-/-}细胞。(A)如表明的,初始将转导的细胞仅对GFP表达分选(结果未显示),接着两次另外的对GFP和高MHC-WT1肽四聚体表达的分选。还对分选的58^{-/-}细胞分析对于作为非特异性四聚体结合的对照的GP33非特异的,但MHC H-2Db-肽四聚体特异的染色。(B)分离的TCRβ链的序列分析。(C)通过序列分析鉴定了四条候选TCRβ链,并转入回MigR1-attR逆转录病毒载体。产生逆转录病毒上清,并用于转导CD8⁺3Dα⁺58^{-/-}细胞。

[0023] 图5A-C:(A)通过用MHC-肽四聚体染色各个转导的细胞系,然后以流式细胞术确定三种最高亲和力TCRs的相对亲和力。使用PE-缀合的四聚体的六个2-倍稀释度进行K_D测量,并且由获得半数最大结合的配体的浓度通过非线性回归从结合曲线确定了表观K_D值。(B)将最高亲和力TCRβ链(克隆#1)密码子优化,并且将四聚体结合与原增强亲和力的3Dαβ构建体相比较。(C)将各个与3Dα成对的候选TCRβ链转导的58^{-/-}细胞用MHC-WT1肽特异四聚体,以及几个非特异的MHC H-2Db-肽四聚体染色,以评估针对MHC的可能的非依赖于肽的反应。

[0024] 图6A-B:分析来自3D-PYYα-IRES-hCD2和7431α-IRES-hCD2逆基因(retrogenic)小鼠的TCRβ⁺胸腺细胞(A)和脾细胞(B)的CD4和CD8表达。来自3D-PYYα-IRES-hCD2和7431α-IRES-hCD2逆基因小鼠的TCRβ⁺胸腺细胞(A)的Vβ10和Vβ9表达。

[0025] 图7:分析来自6天的体外间皮素(mesothelin)肽刺激+IL2的WT1之后的逆基因小鼠的脾细胞。

[0026] 详细描述

[0027] 本公开提供产生增强的或高亲和力TCRs的方法和组合物,其中来自抗原-特异的TCR的TCRα链用于从头(de novo)选择在体外T细胞发育过程中产生的与抗原-特异的TCRα链配对的TCRβ链,以形成新的、增强亲和力的受体,所述增强亲和力的受体可以有利地驱使T细胞独立于负选择通过新的选择过程成熟从而靶向研究的抗原。

[0028] 在一个方面,本公开提供产生增强亲和力的T细胞受体(TCR)的方法,所述方法通过在存在肽抗原的情况下将造血祖细胞(含有编码抗原特异的TCRα链的非内源性核酸序列)与基质细胞(含有编码Delta-like-1或Delta-like-4的非内源性核酸序列和编码MHC分子的核酸序列)培养,其将诱导造血祖细胞分化为DN TCRαβ⁺胸腺细胞。随后,将编码来自DN TCRαβ⁺胸腺细胞的不同TCRβ链的核酸序列分离并引入能够在细胞表面上表达TCR并且还表达上文指出的TCRα链的细胞。最后,通过比较候选TCRαβ与亲本TCRαβ的结合亲和力鉴定增强亲和力的TCR。

[0029] 另外,本公开提供使用此方法产生的增强亲和力的TCRs,以及用于在不同治疗应用(包括治疗受试者中的疾病(例如,癌症,感染性疾病,自身免疫病))中使用本公开的增强亲和力的TCRs的组合物和方法。

[0030] 在更详细陈述本公开之前,对要在本文中使用的某些数据提供定义对于其理解可以有帮助。贯穿本公开陈述其它定义。

[0031] 在本说明书中,术语“约”和“基本上由…组成”意为指出的范围、值、或结构的±20%,除非另有指示。应该理解,本文所使用的术语“一个(a)”和“一个(an)”是指“一个以

上”列举的组分。备选方案(例如,“或”)的使用应该被理解为意为备选方案中的一个、二者或其任意组合。如本文使用的,术语“包括,”“具有”和“包含”同义使用,所述术语和其变体意在被理解为不受限制的。

[0032] “T细胞受体”(TCR)是指在T细胞(或T淋巴细胞)表面发现的分子,与CD3联合,通常负责识别结合于主要组织相容性复合体(MHC)分子的抗原。在大多数T细胞中,所述TCR具有二硫键连接的高度变化的 α 和 β 链(也分别称为TCR α 和TCR β)的异源二聚体。在小的子集的T细胞中,所述TCR由可变的 γ 和 δ 链(也分别称为TCR γ 和TCR δ)的异源二聚体构成。TCR的各个链是免疫球蛋白超家族的成员并且具有一个N-末端免疫球蛋白可变结构域,一个免疫球蛋白恒定结构域,跨膜区域,和在C-末端的短胞质尾区(参见Janeway等人,Immunobiology: The Immune System in Health and Disease,第3版,Current Biology Publications, p.4:33,1997)。在本公开中所使用的TCR可以来自不同动物物种,包括人、小鼠、大鼠、或其它哺乳动物。TCR可以是结合细胞的或可溶的形式。

[0033] 如果它们以例如,大于或等于约 10^5M^{-1} , 10^6M^{-1} , 10^7M^{-1} , 10^8M^{-1} , 10^9M^{-1} , 10^{10}M^{-1} , 10^{11}M^{-1} , 10^{12}M^{-1} ,或 10^{13}M^{-1} 的亲合力或 K_a (即,单位为 $1/\text{M}$ 的特定结合相互作用的平衡缔合常数)结合靶分子,本公开的TCRs和其结合结构域可以是“免疫特异的”或能够结合到所需程度,包括“特异地或选择性地结合”靶而不显著结合存在于测试样品中的其它组分。“高亲合力”结合结构域是指具有至少 10^7M^{-1} ,至少 10^8M^{-1} ,至少 10^9M^{-1} ,至少 10^{10}M^{-1} ,至少 10^{11}M^{-1} ,至少 10^{12}M^{-1} ,至少 10^{13}M^{-1} ,或获更大的 K_a 的那些结合结构域。备选地,亲合力可以被定义为单位为 M 的特定结合相互作用的平衡解离常数(K_d)(例如, 10^{-5}M 至 10^{-13}M)。根据本公开的TCRs和结合结构域多肽的亲合力可容易使用常规技术确定(参见,例如,Scatchard等人(1949) Ann.N.Y.Acad.Sci. 51:660;和美国专利号5,283,173;5,468,614, **Biacore**®分析,或相当物)。因此,“增强亲和力的T细胞受体”(增强亲和力的TCR)是指选择的或改造的TCR,所述TCR具有比野生型(或亲本)TCR更强的对靶抗原的结合。增强的亲合力可以通过对靶抗原的 K_a (平衡缔合常数)高于野生型(也成为亲本或原)TCR对靶抗原的 K_a 的TCR,对靶抗原的 K_d (解离常数)低于野生型(也成为亲本或原)TCR对靶抗原的 K_d 的TCR,或对靶抗原的解离速率(K_{off})小于野生型(或亲本)TCR对靶抗原的解离速率的TCR表征。

[0034] “主要组织相容性复合体分子”(MHC分子)是指递送肽抗原至细胞表面的糖蛋白。I类MHC分子是异源二聚体,其由跨膜 α 链(具有三个 α 结构域)和非共价关联的 β_2 微球蛋白组成。II类MHC分子由两个跨膜糖蛋白, α 和 β 构成,二者都跨膜。各个链具有两个结构域。I类MHC分子递送源自胞质中的肽至细胞表面,在那里,肽:MHC复合体被 CD8^+ T细胞识别。II类MHC分子递送源自囊泡系统中的肽至细胞表面,在那里它们被 CD4^+ T细胞识别。MHC分子可以来自不同动物物种,包括人、小鼠、大鼠或其它哺乳动物。

[0035] “造血祖细胞”是源自造血干细胞或胎儿组织的细胞,其能够进一步分化为成熟细胞类型(例如,T细胞系的细胞),其中所述胎儿组织不是来源于人来源。在一个特定实施方案中,使用 $\text{CD24}^{\text{lo}} \text{Lin}^- \text{CD117}^+$ 造血祖细胞。如本文限定的,造血祖细胞可以包括胚胎干细胞,所述胚胎干细胞能够进一步分化为T细胞系的细胞。造血祖细胞可以来自不同动物物种,包括人、小鼠、大鼠或其它哺乳动物。

[0036] “胸腺细胞祖细胞”或“胸腺细胞”是存在于胸腺中的造血祖细胞。

[0037] “造血干细胞”是指未分化的造血细胞,其能够基本上在体内或离体无限繁殖并且

能够分化为其它细胞类型,包括T细胞系的细胞。造血干细胞可以分离自,例如,胎儿肝,骨髓,和脐带血,其中所述胎儿肝不是来源于人来源。

[0038] “T细胞系的细胞”是指显示至少一个区别于来自其它淋巴细胞,和红细胞或骨髓系细胞的细胞的T细胞或其前体或祖先表型特征的细胞。此种表型特征可以包括表达一个以上T细胞特异的(例如,CD8⁺)的蛋白,或T细胞特异的生理、形态、功能、或免疫学特征。例如,T细胞系的细胞可以是明确是T细胞系的祖先或前体细胞;CD25⁺未成熟和灭活的T细胞;经历CD4或CD8系定型(定型)的细胞;CD4⁺CD8⁺双阳性的胸腺细胞祖细胞;单阳性的CD4⁺或CD8⁺;TCR $\alpha\beta$ 或TCR $\gamma\delta$;或成熟和功能性或激活的T细胞。

[0039] “基质细胞”是任何器官的结缔组织细胞。在一个特定实施方案中,所述基质细胞是骨髓基质细胞。可以被改造以表达DLL1或DLL4的基质细胞系的实例包括小鼠基质细胞系MS5 (Itoh, 等人, Exp. Hematol. 1989, 17:145-153) 和S17, 和人基质细胞系HGS2.11, HGS2.52, HGS.18, HGS3.30, HGS3.65, HGS.3.66, HGS3.103, 和HGS3.114 (可从Human Genome Sciences Inc., MD获得, 参见美国公开申请20020001826)。在一个特定实施方案中,使用OP9细胞(Kodama等人, 1994, Exp. Hematol. 22:979-984; 可从RIKEN细胞库获得)。之前已经描述了表达DLL1和DLL4的OP9细胞(参见, 例如, Schmitt等人, 2002, Immunity:17:749-756; 美国专利号7,575,925)

[0040] “双阴性TCR $\alpha\beta$ 胸腺细胞”(DN TCR $\alpha\beta$ 胸腺细胞)是指不表达CD4和CD8共受体,但表达TCR α 和 β 链的胸腺细胞群体。

[0041] “肽抗原”是指长度在约7个氨基酸至约25个氨基酸范围内,作为抗原被TCR,或其结合结构域特异识别的氨基酸序列,并且其可以源自或基于更长的靶生物分子(例如,多肽,蛋白)或其衍生物的片段。抗原可以表达在细胞表面,细胞内,或作为完整的膜蛋白。抗原可以是源自宿主的(例如,肿瘤抗原,自身免疫抗原)或具有外部来源(例如,细菌的,病毒的)。

[0042] “核酸序列”,或多核苷酸,可以是RNA或DNA的形式,其包括cDNA,基因组DNA,和合成的DNA。核酸序列可以双链或单链的,并且如果是单链的,可以是编码链或非编码(反义链)。编码序列可以与本领域已知的编码序列相同或可以是不同的编码序列,其作为遗传密码冗余或简并的结果,或通过剪接,编码相同多肽。

[0043] “非内源性”是指不存在于向其中引入(例如,重组引入)分子的宿主细胞/样品中的分子(例如,核酸序列)。非内源性分子可以来自相同物种或不同物种。

[0044] Notch配体“Delta-like-1”(DL1或DLL1)和“Delta-like-4”(DL4或DLL4)是Notch Delta配体的同系物并且是 δ /serrate/jagged蛋白家族的成员。它们在造血作用过程中介导细胞命运抉择方面发挥作用并且可以在细胞细胞间通讯中发挥作用。示例性Delta-like-1序列包括Genbank登录号.NM_005618.3(SEQ ID NO:3)和NP_005609.3(SEQ ID NO:4)(分别是智人转录本和蛋白序列),和Genbank登录号.NM_007865.3(SEQ ID NO:5)和NP_031891.2(SEQ ID NO:6)(分别是小家鼠转录本和蛋白序列)。示例性Delta-like-4序列包括Genbank登录号.NM_019074.3(SEQ ID NO:7)和NP_061947.1(SEQ ID NO:8)(分别是智人转录本和蛋白序列)和Genbank登录号.NM_019454.3(SEQ ID NO:9)和NP_062327.2(SEQ ID NO:10)(分别是小家鼠转录本和蛋白序列)。Notch配体可市购或可以通过标准重组DNA技术生产并纯化至不同程度。

[0045] “胚胎干细胞”或“ES细胞”或“ESCs”是指未分化的胚胎干细胞,其具有整合入并变成发育中的胚胎的生殖系的部分的能力,其中所述胚胎干细胞不来源于人。胚胎干细胞能够分化为造血祖细胞。适于本文中用途的胚胎干细胞包括来自J1 ES细胞系,129J ES细胞系,鼠干细胞系D3(American Type Culture Collection目录#CRL 1934),源自129/Sv小鼠的R1或E14K细胞系,源自Balb/c和C57Bl/6小鼠的细胞系。

[0046] “WT1”是指肾母细胞瘤1(Wilm's tumor 1),一种转录因子,其含有C末端四个锌指基序和N末端的富脯氨酸/谷氨酰胺的DNA结合结构域。WT1对泌尿生殖系统的正常发育具有重要作用并且在一小群患有肾母细胞瘤(Wilm's tumor)的患者中是突变的。已经在不同癌症中观察到WT1的高表达包括,乳腺癌,卵巢癌,急性白血病,血管肿瘤,黑素瘤,结肠癌,肺癌,甲状腺癌,骨和软组织肉瘤,和食管癌。对于WT1已经指出了可变剪接。示例性WT1序列包括Genbank登录号:NM_000378.4(SEQ ID NO:11)(人转录本),NP_000369.3(SEQ ID NO:12)(人蛋白);NM_024424.3(SEQ ID NO:13)(人转录本),NP_077742.2(SEQ ID NO:14)(人蛋白);NM_024426.4(SEQ ID NO:15)(人转录本),NP_077744.3(SEQ ID NO:16);NM_001198552.1(SEQ ID NO:17),NP_001185481.1(SEQ ID NO:18)(人蛋白);NM_001198551.1(SEQ ID NO:19)(人转录本),NP_001185480.1(SEQ ID NO:20)(人蛋白);NM_144783.2(SEQ ID NO:21)(小鼠转录本),和NP_659032.3(SEQ ID NO:22)(小鼠蛋白)。

[0047] “间皮素(mesothelin)”(MSLN)是指编码前体蛋白的基因,所述前体蛋白被切割为两个产物,巨核细胞强化因子和间皮素(mesothelin)。巨核细胞强化因子作为可以刺激骨髓巨核细胞中集落形成的细胞因子行使功能。间皮素是糖基磷脂酰肌醇锚定的细胞-表面蛋白,其可以作为细胞粘附蛋白行使功能。该蛋白在上皮性间皮瘤,卵巢癌中和在特定鳞状细胞癌中过表达。选择性剪切导致产生多个转录本变体。示例性间皮素序列包括Genbank登录号:NM_001177355.1(SEQ ID NO:23),NP_001170826.1(SEQ ID NO:24)(分别是人转录本和前蛋白序列);NM_005823.5(SEQ ID NO:25),NP_005814.2(SEQ ID NO:26)(分别是人转录本和前蛋白序列);NM_013404.4(SEQ ID NO:27),NP_037536.2(SEQ ID NO:28)(分别是人转录本和前蛋白序列);NM_018857.1(SEQ ID NO:29),NP_061345.1(SEQ ID NO:30)(分别是小鼠转录本和前体蛋白序列)。

[0048] “MHC-肽四聚体染色”是指用于检测抗原-特异性T细胞的测定,其特征是MHC分子的四聚体,各包含与至少一个抗原同源(例如,相同或相关)的氨基酸序列的相同肽,其中所述复合体能够结合对同源抗原特异的T细胞。每个MHC分子可以用生物素分子标签标记。通过加入链亲和素将生物素化的MHC/肽四聚体,所述链亲和素典型地是荧光标记的。可以由流式细胞术通过荧光标记检测四聚体。在某些实施方案中,MHC-肽四聚体测定用于检测或选择本公开的高亲和力TCRs。

[0049] 产生增强亲和力的TCRs的方法

[0050] 通过背景,在胸腺中T细胞发育过程中,祖先胸腺细胞接受许多TCR-介导的检查点。这些中第一个被称为 β -选择,并且发生在鼠T细胞发育的双阴性3(DN3)阶段。在Tcrb基因座产生成功重排的DN3细胞可以在细胞表面表达与不变的前体T α 蛋白配对的TCR β 蛋白。该受体被称为前体TCR,并且其以不依赖于配体的方式发信号以促进增殖, $\alpha\beta$ 系细胞分化至CD4/CD8双阳性(DP)阶段,和Tcra基因座的重排(Boehmer等人,1999,Curr.Opin.Immunol.11:135-142)。在 β -选择之前,在TCR α 座位钝化并接近TCR基因重排的

同时,TCR γ 和 δ 座位二者在发育的DN3阶段都经历重排,并且在这两个位置的成功重排导致成熟 $\gamma\delta$ -TCR的表达,其可提供驱动向 $\gamma\delta$ T细胞系分化的信号-在发育过程中 $\gamma\delta$ T细胞不通过DP阶段分化,并且通常保持DN或CD8 $\alpha\alpha^+$ 。 $\alpha\beta/\gamma\delta$ 细胞命运抉择由在该发育阶段TCR信号的强度确定,因为发育的T细胞通过与成熟 $\gamma\delta$ TCR相关的更强信号区分前体TCR信号和 $\gamma\delta$ TCR信号 (Pennington, Silva-Santos, & Hayday, 2005, *Curr. Opin. Immunol.* 17:108-115)。有趣的是,很多 $\alpha\beta$ TCR转基因小鼠在胸腺中具有大量的成熟CD24⁻TCR $\alpha\beta$ 阳性CD4/CD8双阴性 (DN) 细胞,已经显示其代表在 β -选择检查点作为来自成熟 $\alpha\beta$ 转基因TCR的更强信号的结果发育的“ $\gamma\delta$ 效仿者(wanna-be)”细胞 (Egawa等人,2000, *PLoS One* 3:1512)。

[0051] 本文公开的是产生增强亲和力的TCRs的方法,其中在 β -选择前抗原-特异的TCR α 链的异位表达使得在体外T细胞分化过程中在存在同源抗原的情况下分化时表达对于相同抗原高亲和力TCR的T细胞发育。使用该方法,表达高亲和力受体的T细胞通过采用响应T细胞发育的DN3阶段的激动剂信号的DN TCR $\alpha\beta^+$ 系命运绕过负选择。

[0052] 在某些实施方案中,本公开提供产生增强亲和力TCR的方法,所述方法包括:a) 在足以诱导造血祖细胞分化为DN TCR $\alpha\beta^+$ 胸腺细胞的条件下,将造血祖细胞与基质细胞和肽抗原接触达足以诱导造血祖细胞分化为DN TCR $\alpha\beta^+$ 胸腺细胞的时间,其中所述造血祖细胞包含编码来自特异于所述肽抗原的亲本TCR的TCR α 链的非内源性核酸序列,并且其中所述基质细胞包含编码Delta-like-1或Delta-like-4的非内源性核酸序列和编码MHC分子的核酸序列;b) 从DN TCR $\alpha\beta^+$ 胸腺细胞分离编码不同TCR β 链的核酸序列并将编码所述TCR β 链的核酸序列引入能够在细胞表面上表达TCR的和包含编码来自步骤a)的TCR α 链的核酸序列的细胞;并且鉴定增强亲和力的TCR(例如,通过MHC四聚体测定检测或选择高亲和力TCR $\alpha\beta$ 候选物,并随后测量与亲本TCR $\alpha\beta$ 相比的结合亲和力。

[0053] 在某些实施方案中,造血祖细胞包括胸腺细胞祖细胞或胚胎干细胞。在其它实施方案中,造血祖细胞源自胎儿肝组织,其中所述胎儿肝组织不是来源于人来源。在其它实施方案中,造血祖细胞包含源自或来源于骨髓,脐带血,或外周血的造血干细胞。在进一步的其它实施方案中,造血祖细胞源自人、小鼠、大鼠、或其它哺乳动物。在一个特定实施方案中,使用CD24^{lo} Lin⁻CD117⁺胸腺细胞祖细胞。

[0054] 已经将造血祖细胞改进为包含编码来自特异于肽抗原的亲本TCR的TCR α 链的非内源性核酸序列。在一个特定实施方案中,所述TCR β 链也分离自所述亲本TCR。可以使用本领域已知的标准分子生物学技术进行TCR α 和 β 链的克隆。克隆TCR链的方法是本领域已知的(参见,例如, Walchli等人,2011, *PLoS ONE* 6:e27930; Birkholz等人,2009, *J. Immunol. Methods* 346:45-54; Kurokawa等人,2001, *Clin. Exp. Immunol.* 123:340-345)。

[0055] “基质细胞”是任何器官的结缔组织细胞。可以根据本发明使用的基质细胞包括人和小鼠基质细胞。可以被改造以表达DL1或DL4的基质细胞系的实例包括小鼠基质细胞系MS5 (Itoh, 等人, *Exp. Hematol.* 1989, 17:145-153) 和S17, 和人基质细胞系HGS2.11, HGS2.52, HGS.18, HGS3.30, HGS3.65, HGS.3.66, HGS3.103, 和HGS3.114 (可从Human Genome Sciences Inc., MD获得,参见美国公开申请20020001826)。在某些实施方案中,基质细胞是骨髓基质细胞。在进一步的实施方案中,使用OP9细胞。

[0056] 在某些实施方案中,基质细胞包括编码DL1,比如人DL1的非内源性核酸序列。示例性Delta-like-1序列包括Genbank登录号.NM_005618.3 (SEQ ID NO:3) 和NP_005609.3 (SEQ

ID NO:4) (分别是智人转录本和蛋白序列) 和Genbank登录号.NM_007865.3 (SEQ ID NO:5) 和NP_031891.2 (SEQ ID NO:6) (分别是小家鼠转录本和蛋白序列)。在某些实施方案中, 基质细胞包含编码DL4, 比如人DL4的非内源性核酸序列。示例性Delta-like-4序列包括Genbank登录号.NM_019074.3 (SEQ ID NO:7) 和NP_061947.1 (SEQ ID NO:8) (分别是智人转录本和蛋白序列) 和Genbank登录号.NM_019454.3 (SEQ ID NO:9) 和NP_062327.2 (SEQ ID NO:10) (分别是小家鼠转录本和蛋白序列)。Notch配体是可市购的或可以通过标准重组DNA技术生产并纯化到不同程度。

[0057] 在更进一步的实施方案中, 基质细胞是表达DL1, 比如人DL1的OP9细胞或其衍生物。之前已经描述了表达DL1和DL4的OP9细胞 (Schmitt等人, 2002, *Immunity* 17:749-756; 美国专利No.7,575,925)。

[0058] 在某些实施方案中, 基质细胞也包含编码MHC分子的核酸序列。在特定实施方案中, 基质细胞包含编码I类MHC分子的核酸序列, 并且可以任选地还包含编码 β 2微球蛋白的核酸序列。所述I类MHC和 β 2微球蛋白分子可以源自人, 小鼠, 大鼠, 或其它哺乳动物物种I类MHC分子, 其基因和蛋白序列为本领域已知的。在其它实施方案中, 所述基质细胞包含编码II类MHC分子的核酸序列。所述II类MHC分子可以源自人, 小鼠, 大鼠, 或其它哺乳动物物种MHC分子, 其基因和蛋白序列为本领域已知的。

[0059] 给定的T细胞仅在其结合宿主细胞的MHC分子时将识别肽抗原 (MHC-限制的抗原识别)。选择对于已知肽抗原具有特异性的亲本TCR用于使用所公开的方法增强TCR亲和力。因此, 也选择结合特定肽抗原的MHC分子并在基质细胞中表达以允许所公开的体外系统中的MHC-限制的抗原识别。鉴定结合肽抗原MHC分子的方法是本领域已知的 (参见, 例如, Akatsuka等人, 2002, *Tissue Antigens* 59:502-511)。在某些实施方案中, MHC分子包含HLA-A2和 β -2微球蛋白, 优选人来源的, 其可以结合于, 例如, WT1肽RMFPNAPYL (SEQ ID NO:2)。在其它实施方案中, MHC分子包含小鼠H-2D^b, 其可以结合, 例如, WT1肽RMFPNAPYL或Hung等人, 2007, *Gene Therapy* 14:921-929的图3A中所公开的不同间皮素肽, 或H-2K^b, 其可以结合, 例如, Hung等人的图3A中所公开的不同间皮素肽。在Hung等人中公开的可能的H-2D^b限制性间皮素表位包括: ISKANVDVL (SEQ ID NO:42), GQKMNAQAI (SEQ ID NO:43), SAFQNVSG (SEQ ID NO:44), 和LLGPNIVDL (SEQ ID NO:45)。在Hung等人中公开的可能的H-2K^b限制的间皮素表位包括: EIPFTYEQL (SEQ ID NO:46) 和GIPNGYLV (SEQ ID NO:47)。

[0060] 公开的方法中使用的肽抗原是指亲本TCR特异结合的抗原的肽序列, 或靶生物分子 (例如, 多肽, 蛋白)。肽序列可以源自在细胞表面, 细胞内表达的, 或为完整膜蛋白的抗原。所述抗原可以是源自宿主的抗原 (例如, 肿瘤/癌抗原, 和自身免疫抗原), 或外源性抗原 (例如, 病毒, 细菌, 原生动物抗原)。肿瘤或癌抗原可以源自不同癌症, 比如本文中指出的那些。在一些实施方案中, 癌抗原包括白血病抗原。在某些实施方案中, 肽抗原源自肾母细胞瘤1 (WT1), 比如包含氨基酸序列RMFPNAPYL (SEQ ID NO:2) 的WT1肽。在其它实施方案中, 肽抗原源自间皮素, 比如在Hung等人, 2007, *Gene Therapy* 14:921-929的图3A中公开的间皮素肽。在一些实施方案中, 所述间皮素肽包含氨基酸序列GQKMNAQAI (SEQ ID NO:31)。在其它实施方案中, 所述间皮素肽包含含有ISKANVDVL (SEQ ID NO:42), GQKMNAQAI (SEQ ID NO:43), SAFQNVSG (SEQ ID NO:44), 和LLGPNIVDL (SEQ ID NO:45), EIPFTYEQL (SEQ ID NO:46), 或GIPNGYLV (SEQ ID NO:47) 的氨基酸序列。自身免疫抗原是由特异于自身抗原的自

体反应性TCRs识别的抗原,其具有引起自身免疫病,使自身免疫病恶化,促进自身免疫病进展,引起或使与自身免疫病相关的症状恶化的随之而来的免疫效应功能。例如,特异于胶原蛋白肽的自体反应的TCRs可以用于类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)中Tregs的抑制性基因治疗。自身免疫抗原还可以是位于其它引起自身免疫病或介导自身免疫病症状的免疫细胞(例如,产生自身抗体的B细胞)上的抗原。例如,CD20肽抗原可以用于产生靶向参与或与类风湿性关节炎相关的B细胞的增强亲和力的TCRs。可以将肽抗原加入针对如本文描述的造血祖细胞和基质细胞的培养系统。备选地,包含编码研究的肽抗原的核酸序列的基质细胞可以用于在细胞培养中表达此种抗原。不希望受理论限制,不论是否作为外源肽抗原加入培养系统或通过基质细胞表达,肽抗原都与由基质细胞表达的MHC分子形成复合物从而形成MHC-肽抗原复合物。MHC-肽抗原复合物允许在培养系统中通过TCRs的MHC-限制性肽抗原识别。在某些实施方案中,将OP9细胞用核酸序列转导从而表达WT1抗原肽RMFPNAPYL (SEQ ID NO:2)。在其它实施方案中,将OP9细胞用核酸序列转导从而表达间皮素抗原肽GQKMNAQAI (SEQ ID NO:31)。

[0061] 结合I类MHC分子的肽通常形成约7至约10个氨基酸的长度。结合II类MHC分子的肽长度上可变,通常长约10-25个氨基酸。在某些实施方案中,亲本TCR的肽抗原特异性是已知的。在其它实施方案中,亲本TCR的肽抗原特异性需要使用本领域已知的方法来确定。(Borras等人,2002,J.Immunol.Methods 267:79-97;Hiemstra等人,2000,Cur.Opin.Immunol.12:80-4)。例如,如果亲本TCR的靶抗原已知,尽管不是特定肽序列,源自所述靶抗原多肽序列的肽文库可以用于筛选和鉴定对于亲本TCR的特定肽抗原。

[0062] “载体”是能够转运其它核酸的核酸分子。载体可以是,例如,质粒,粘粒,病毒,或噬菌体。“表达载体”是当其存在于适当的环境中时,能够引导由载体携带的一个以上基因编码的蛋白的表达的载体。

[0063] “逆转录病毒”是具有RNA基因组的病毒。“ γ 逆转录病毒”是指逆转录病毒科的一个属。示例性 γ 逆转录病毒包括但不限于,小鼠干细胞病毒,鼠白血病病毒,猫白血病病毒,猫肉瘤病毒,禽网状内皮组织增殖病毒。

[0064] “慢病毒”是指逆转录病毒的一个属,其能够感染分裂细胞和非分裂细胞。慢病毒的一些实例包括HIV(人免疫缺陷病毒:包括1型HIV,和2型HIV);马感染性贫血病毒;猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);和猴免疫缺陷病毒(SIV)。

[0065] 编码核心病毒的载体也称为“病毒载体”。存在大量的适于用于本发明的可用病毒载体,包括鉴定用于人基因治疗应用的那些,比如由Pfeifer和Verma描述的那些(Pfeifer,A.和I.M.Verma.2001.Ann.Rev.Genomics Hum.Genet.2:177-211)。合适的病毒载体包括基于RNA病毒的载体,比如源自逆转录病毒的载体,例如,源自莫洛尼鼠白血病病毒(MLV)的载体,并且包括更复杂的源自逆转录病毒的载体,例如,源自慢病毒的载体。源自HIV-1的载体属于该类型。其它实例包括源自HIV-2,FIV,马感染性贫血病毒,SIV,和梅迪/维斯那病毒的慢病毒载体。使用逆转录病毒和慢病毒病毒载体和用含有TCRs转基因的病毒粒子包装细胞用于转导哺乳动物靶细胞的方法是本领域公知的并且之前例如,在美国专利8,119,772;Walchli等人,2011,PLoS One 6:327930;Zhao等人,J.Immunol.,2005,174:4415-4423;Engels等人,2003,Hum.Gene Ther.14:1155-68;Frecha等人,2010,Mol.Ther.18:1748-57;Verhoeyen等人,2009,Methods Mol.Biol.506:97-114中描述。逆转录病毒和慢病毒载体构

建体和表达系统也可以市购。

[0066] 在一个特定实施方案中,使用病毒载体将编码特异于肽抗原的TCR α 链的非内源性核酸序列引入造血祖细胞中。在另一个实施方案中,病毒载体用于将编码DL1或DL4的非内源性核酸序列和编码MHC分子的核酸序列引入基质细胞中。所述病毒载体可以是逆转录病毒载体或慢病毒载体。所述病毒载体还可以包括编码用于转导的标记的核酸序列。用于病毒载体的转导标记是本领域已知的并且包括选择标记,所述选择标记可以赋予药物抗性,或可检测标记,比如荧光标记或细胞表面蛋白,所述可检测标记可以通过比如流式细胞术的方法被检测。在一个特定实施方案中,所述病毒载体进一步包含用于转导的基因标记,所述基因标记包括绿色荧光蛋白或人CD2的细胞外结构域。然而病毒载体基因组包含多于一在宿主细胞中表达的核酸序列作为分离的转录本,所述病毒载体还可以在两个(或更多)转录本之间包含另外的序列以允许双顺反子或多顺反子的表达。用于病毒载体的此种序列的实例包括内部核糖体进入位点(IRES),弗林蛋白酶切割位点,病毒2A肽。

[0067] 其它载体也可以用于多核苷酸递送,所述载体包括DNA病毒载体,所述DNA病毒载体包括,例如基于腺病毒的载体和基于腺病毒伴随病毒(AAV)的载体;源自单纯疱疹病毒的载体(HSVs),所述源自单纯疱疹病毒的载体包括扩增子载体,复制缺陷HSV和减毒HSV(Krisky等人,1998, Gene Ther. 5:1517-30)。

[0068] 近期开发用于基因治疗用途的其它载体也可以用于本公开的方法。此种载体包括源自杆状病毒和 α -病毒的那些。(Jolly D J.1999. Emerging viral vectors. pp 209-40在Friedmann T.编辑1999. The development of human gene therapy. New York: Cold Spring Harbor Lab中)。

[0069] 在足以诱导造血祖细胞分化为DN TCR $\alpha\beta^+$ 胸腺细胞条件下,将造血祖细胞与包含编码非内源性DL1或DL4的核酸序列和编码MHC分子的核酸序列的基质细胞培养足以诱导造血祖细胞分化为DN TCR $\alpha\beta^+$ 胸腺细胞的时间。在某些实施方案中,将造血祖细胞培养在6cm或10cm组织培养-处理的盘中。培养物中的造血祖细胞浓度可以在 $1-10^9$,或 1×10^2 至 1×10^6 ,或 1×10^3 至 1×10^4 之间。在一些实施方案中,将造血祖细胞(约 $1-5 \times 10^4$ 细胞)培养在表达DL1的单层OP9细胞上。

[0070] 可以向培养中添加一种以上促进造血祖细胞定型和分化的细胞因子。所述细胞因子可以源自人或其它物种。培养中的细胞因子浓度可以从约1ng/ml至约50ng/ml。可以使用的细胞因子的代表性实例包括:FGF家族的所有成员,包括FGF-4和FGF-2;Flt-3-配体,干细胞因子(SCF),血小板生成素(TPO),和IL-7。细胞因子可以与黏多糖,比如硫酸肝素联合使用。细胞因子可市购或可以通过重组DNA技术生产并纯化至不同程度。一些细胞因子可以通过标准生化技术从细胞培养基纯化。

[0071] 可以将造血祖细胞培养在培养基中,所述培养基包括条件培养基,非条件培养基,或胚胎干细胞培养基。合适的条件培养基的实例包括IMDM,DMEM,或 α MEM,用胚胎成纤维细胞(例如,人胚胎成纤维细胞)为条件的,或相当培养基。合适的非条件培养基的实例包括Iscove's改良的Delbuccho's培养基(IDMD),DMEM,或 α MEM,或相当的培养基。培养基可以包含血清(例如,牛血清,胎牛血清,小牛血清,马血清,人血清,或人工血清替代物)或其可以无血清。

[0072] 培养条件需要将造血祖细胞培养足够时间以诱导造血祖细胞分化为DN TCR $\alpha\beta^+$ 胸

腺细胞。通常将细胞维持培养达约4-5天,优选约5至20天。将理解细胞可以被维持达获得所要结果(即,所要的细胞组合物)所需要的适当的时间量。例如,为了产生主要包含不成熟的钝化的T细胞的细胞组合物,可以将所述细胞维持培养达约5至20天。可以将细胞维持培养达20至30天以产生主要包含成熟T细胞的细胞组合物。还可以在不同时间点,比如从约几天至约25天从培养物收集非黏附细胞。之前已经描述了用于造血干细胞在基质细胞系上的培养方法(美国专利#7,575,925;Schmitt等人,2004,Nat. Immunol.5:410-417;Schmitt等人,2002,Immunity 17:749-756)。

[0073] 造血祖细胞向DN TCR $\alpha\beta$ +胸腺细胞的分化可以被检测并且使用标准流式细胞术方法分离这些细胞。可以使用一种以上细胞分选以分离DN TCR $\alpha\beta$ +胸腺细胞。例如,第一细胞分选可以鉴定表达转导标记(即,用于TCR α 表达的标记)的造血祖细胞。在某些实施方案中,转导标记是人CD2的细胞外结构域。在进一步的实施方案中,转导标记阳性细胞可以接受第二细胞分选以筛选CD4⁻和CD8⁻的细胞。对DN细胞的第三细胞分选可以筛选表达TCR β 的细胞。可以使用细胞表面或转导标记的不同组合设计这些分选的部分,或单种或多种细胞分选,从而鉴定所需的DN TCR $\alpha\beta$ +胸腺细胞亚群,这对于本领域技术人员而言将是显而易见的。分选DN TCR $\alpha\beta$ +细胞的方法是本领域已知的(U.S.7,575,925和Schmitt等人,2002,Immunity:17:749-756)。

[0074] 分离编码来自DN TCR $\alpha\beta$ +胸腺细胞的不同TCR β 链的核酸序列并引入包含编码来自亲本TCR的TCR α 链的核酸序列的T细胞。如本文讨论的,从细胞克隆TCR β 链的方法是本领域公知的并已经在之前描述。在某些实施方案中,一旦将编码候选TCR β 链的核酸序列从DN TCR $\alpha\beta$ +胸腺细胞分离,则所述核酸序列可以接受进一步选择过程,借此选择具有由亲本TCR β 链使用的相同V β 基因的TCR β 链用于引入T细胞。可以使用用于PCR的V β 基因特异引物在分选的细胞群体内鉴定含有TCR β 链的亲本V β 基因。与增强抗原-特异的TCRs体外亲和力相关的一个问题是,一些改进可能仅增加受体对MHC的亲合力,而不是肽/MHC,从而增加TCR将自体反应的可能性。将候选TCR β 链限制于含有亲本V β 基因的那些增加保留接触MHC的TCR CDR1和CDR2结构域,和限制CDR3可变性的可能性。如之前讨论的,病毒载体,比如逆转录病毒载体和慢病毒载体,适于将编码不同TCR β 链和/或亲本TCR α 的核酸序列引入T细胞。在一些实施方案中,所述病毒载体进一步包含用于转导的基因标记(例如绿色荧光蛋白)。

[0075] 能够在细胞表面表达TCR的细胞用于用编码来自DN TCR $\alpha\beta$ +胸腺细胞的不同TCR β 链的核酸序列转化或转导。能够在细胞表面表达TCR的细胞表达CD3分子。“CD3”六条链的多蛋白复合体,其稳定地与细胞表面上的TCR相关。在哺乳动物中,所述复合体包含CD3 γ 链,CD δ 链,两条CD3 ϵ ,CD3 ζ 链的同源二聚体。所述CD3 γ ,CD3 δ ,和CD3 ϵ 是含有单个免疫球蛋白结构域的免疫球蛋白超家族的高度相关的细胞表面蛋白。CD3 γ ,CD3 δ ,和CD3 ϵ 的跨膜区域带负电,其是允许该链与带正电的TCR链关联的特征。CD3 γ ,CD3 δ ,和CD3 ϵ 链的胞质结构域含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAMs),其使得它们在受体刺激之后与胞质蛋白酪氨酸激酶关联并且从而发信号至细胞内部。TCR的细胞-表面表达需要CD3蛋白(参见Janeway等人,Immunobiology:The Immune System in Health and Disease,第3版,Current Biology Publications,p.4:39,1997)。

[0076] 在一些实施方案中,能够在细胞表面上表达TCR的细胞是T细胞,包括源自人,小鼠,大鼠,或其它哺乳动物的原代细胞或细胞系。如果获自哺乳动物,T细胞可以从很多来源

获得,包括血液,骨髓,淋巴结,胸腺,或其它组织或液体。T细胞可以富集的或纯化的。T细胞系是本领域公知的,其中一些描述于Sandberg等人,2000,Leukemia 21:230-237。在某些实施方案中,使用缺少TCR α 和 β 链的内源性表达的T细胞。此种T细胞可以天然缺少TCR α 和 β 链的内源性表达或可以被修饰以阻断表达(例如,来自不表达TCR α 和 β 链的转基因小鼠或操作以抑制TCR α 和 β 链的表达的细胞系的T细胞)。在某些实施方案中,使用58 $\alpha^{-}\beta^{-}$ 细胞,一种缺少内源性TCR α 和TCR β 链的鼠T细胞系(Letourneur和Malissen,1989,Eur.J.Immunol.19:2269-74)。在其它实施方案中,使用H9T细胞系(目录#HTB-176,ATCC,Manassas,VA)。在某些实施方案中,能够在细胞表面表达TCR的细胞不是T细胞或T细胞系的细胞,除了已被修饰以表达CD3,使TCR能够在细胞表面表达的细胞(例如,293细胞或3T3细胞)。之前已经描述了不是T细胞系的TCRs在细胞上的细胞表面表达(Szymczak等人,2004,Nat.Biotechnol.22:589-594)。

[0077] 为了鉴定可能增强亲和力的TCR,一旦将能够在还表达亲本TCR α 链的细胞表面表达TCR的细胞用候选TCR β 链文库转化或转导,使用MHC-肽四聚体染色分选或鉴定抗原-特异的细胞。MHC-肽四聚体染色特征是MHC分子的四聚体,各自包含具有与至少一种抗原同源(例如,相同或相关)的氨基酸序列的相同肽,其中所述复合体能够结合对同源抗原特异的T细胞。各个MHC分子可以用生物素分子标签标记。通过加入链亲和素将生物素化的MHC/肽四聚体化,所述链亲和素典型地是荧光标记的。可以由流式细胞术通过荧光标记检测四聚体。检测抗原特异的T细胞的MHC-肽四聚体染色方法是本领域公知的(例如,Altman等人,1996,Science 274:94-96;Kalergis等人,2000,J.Immunol.Methods 234:61-70;Xu和Screaton,2002,J.Immunol.Methods 268:21-8;James等人,J.Vis.Exp.25:1167)。在某些实施方案中,所述MHC-肽四聚体包含I类MHC分子。在其它实施方案中,所述MHC-肽四聚体包含II类MHC分子。在进一步实施方案中,用于公开的方法中培养步骤的相同肽抗原与整合入MHC-肽四聚体的肽相同。在其它实施方案中,公开的方法的培养步骤中由基质细胞表达的MHC分子与MHC-肽四聚体中的MHC分子相同。可以通过流式细胞术分选MHC-肽四聚体染色的细胞一次以上。第一分选可以选择表达可检测转导标记(例如,绿色荧光蛋白)的转导的细胞。还可以分选转导阳性细胞一次以上,以获得表达与亲本TCR相同的 β 链的细胞。可以使用细胞表面或转导标记的不同组合设计这些分选的部分,或单种或多种细胞分选,从而鉴定所需的细胞亚群,这对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0078] 通过比较候选TCR $\alpha\beta$ 与亲本TCR $\alpha\beta$ 的结合亲和力鉴定增强亲和力的TCR。随后可以使用标准分子生物学技术将抗原-特异的T细胞克隆和测序。候选TCR β 克隆随后可以用于转导包含亲本TCR α 链的T细胞并且MHC-肽四聚体染色可以用于比较与亲本TCR $\alpha\beta$ 的染色水平,如之前描述的。以候选TCR β 观察到的增加的染色可以表征与亲本TCR $\alpha\beta$ 相比增强亲和力。然而,如果亲本TCR $\alpha\beta$ 被密码子优化以增加在T细胞中的表达,直接比较以候选TCR β 的四聚体染色水平可能是不可能的。候选TCR β 链也可以被密码子优化,以直接与亲本TCR β 比较。

[0079] 如果其具有比亲本TCR $\alpha\beta$ 对肽抗原更强的结合,则候选TCR $\alpha\beta$ 与亲本TCR $\alpha\beta$ 相比具有增强的亲和力。增强的亲和力可以由具有对于靶抗原的 K_a (平衡缔合常数)比亲本TCR对于靶抗原的 K_a 高的TCR,对于靶抗原的 K_d (解离常数)比亲本TCR对于靶抗原的 K_d 小的TCR,或对于靶抗原的解离速率(K_{off})比野生型(或亲本)TCR对于靶抗原的解离速率小的TCR表示。测量TCR结合亲和力的方法已经在之前描述(例如,Laugel等人,2007,J.Biol.Chem.282:

23799-23810;Garcia等人,2001,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98:6818-6823)。

[0080] 增强亲和力TCRs和组合物

[0081] 在另一个方面,提供由本文公开的方法产生的增强亲和力的TCRs。增强亲和力的TCR可以是结合细胞的(例如,表达在成熟T细胞的表面)或可溶的形式。在某些实施方案中,增强亲和力的TCRs可以被密码子优化以增强在T细胞中的表达(Scholten等人,2006,Clin.Immunol.119:135-145)。

[0082] 在其它实施方案中,增强亲和力的TCRs还可以是融合蛋白的组分,所述融合蛋白可以进一步包含细胞毒性组分(例如,化疗药物比如长春地辛(vindesine),抗叶酸剂(antifolates);细菌毒素,蓖麻毒素,抗病毒剂),所述细胞毒性组分用于特异的杀死癌症细胞或感染的细胞或使癌症细胞或感染的细胞无效,或可检测组分(例如,生物素,荧光部分,放射性核素),所述可检测部分用于成像癌症细胞,感染的细胞,或自身免疫攻击下的组织。

[0083] 本公开还提供药物组合物,所述药物组合物包含由本文公开的方法产生的增强亲和力的TCR和药学可接受的载体,稀释剂,或赋形剂。合适的赋形剂包括水、盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等和其组合。

[0084] 应用

[0085] 由本公开的方法产生的增强亲和力的TCRs可以用于通过施用包含增强亲和力的TCRs组合物治疗受试者中疾病(比如癌症,感染疾病,或自身免疫病)。

[0086] 可以用增强亲和力TCR治疗治疗的疾病包括癌症,感染性疾病(病毒,细菌,原生动物感染),和自身免疫病。TCR基因治疗是对于不同类型癌症(Morgan等人,2006,Science 314:126-129;在Schmitt等人,2009,Human Gene Therapy中综述的;在2007年6月,J.Clin.Invest.117:1466-1476中综述的)和感染疾病(Kitchen等人,2009,PLoS One 4:38208;Rossi等人,2007,Nat.Biotechnol.25:1444-54;Zhang等人,PLoS Pathog.6:e1001018;Luo等人,2011,J.Mol.Med.89:903-913)的有希望的治疗手段。使用包含自体反应性TCRs的调节性T细胞用于自身免疫病的免疫抑制基因治疗也是新兴的治疗手段(Fujio等人,2006,J.Immunol.177:8140-8147;Brusko等人,2008,Immunol.Rev.223:371-390)。

[0087] 多种癌症,包括实体肿瘤和白血病可用本文公开的组合物和方法处理。可以被治疗的癌症类型包括:乳腺癌、前列腺癌、和结肠腺癌;所有形式的肺支气管癌;髓细胞瘤;黑色素瘤;肝细胞瘤(hepatoma);成神经细胞瘤(neuroblastoma);乳头状瘤(papilloma);apud瘤(apudoma);迷芽瘤(choristoma);鳃原瘤(branchioma);恶性类癌综合征(malignant carcinoid syndrome);类癌心脏病(carcinoid heart disease);和癌(例如,沃克癌(Walker),基底细胞癌(basal cell),基底鳞状癌(basosquamous),布-皮癌(Brown-Pearce),导管癌(ductal),埃利希癌(Ehrlich tumor),Krebs 2,merkel细胞癌,粘蛋白癌(mucinous),非小细胞肺癌,燕麦细胞癌(oat cell),乳头状癌(papillary),硬癌(scirrhou),细支气管癌(bronchiolar),支气管原癌(bronchogenic),鳞状细胞癌(squamous cell),和移行细胞癌(transitional cell)。可以被治疗的另外的癌症类型包括:组织细胞疾病(histiocytic disorders);白血病;恶性组织细胞增多病(histiocytosis malignant);霍奇金病(Hodgkin's disease);免疫增生小(immunoproliferative small);非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma);浆细胞瘤

(plasmacytoma);网状内皮组织增殖(reticuloendotheliosis);黑素瘤;软骨母细胞瘤(chondroblastoma);软骨瘤(chondroma);软骨肉瘤(chondrosarcoma);纤维瘤(fibroma);纤维肉瘤(fibrosarcoma);巨细胞瘤(giant cell tumors);组织细胞瘤(histiocytoma);脂肪瘤(lipoma);脂肪肉瘤(liposarcoma);间皮瘤(mesothelioma);粘液瘤(myxoma);粘液肉瘤(myxosarcoma);骨瘤(osteoma);骨肉瘤(osteosarcoma);脊索瘤(chordoma);颅咽管瘤(craniopharyngioma);无性细胞瘤(dysgerminoma);错构瘤(hamartoma);间质瘤(mesenchymoma);中肾瘤(mesonephroma);肌肉瘤(myosarcoma);成釉细胞瘤(ameloblastoma);牙骨质瘤(cementoma);牙瘤(odontoma);畸胎瘤(teratoma);胸腺瘤(thymoma);滋养细胞瘤(trophoblastic tumor)。进一步地,以下类型的癌症也被认为是可由治疗处理的:腺瘤(adenoma);胆管瘤(cholangioma);胆脂瘤(cholesteatoma);圆柱瘤(cylindroma);囊腺癌(cystadenocarcinoma);囊腺瘤(cystadenoma);颗粒细胞瘤(granulosa cell tumor);两性胚细胞瘤(gynandroblastoma);肝细胞瘤(hepatoma);汗腺腺瘤(hidradenoma);胰岛细胞瘤(islet cell tumor);睾丸间质细胞瘤(Leydig cell tumor);乳头状瘤(papilloma);支持细胞瘤(sertoli cell tumor);卵泡膜细胞瘤(theca cell tumor);平滑肌瘤(leiomyoma);平滑肌肉瘤(leiomyosarcoma);成肌细胞瘤(myoblastoma);肌瘤(myoma);肌肉瘤(myosarcoma);横纹肌瘤(rhabdomyoma);横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma);室管膜细胞瘤(ependymoma);神经节细胞瘤(ganglioneuroma);神经胶质瘤(glioma);成神经管细胞瘤(medulloblastoma);脑脊膜瘤(meningioma);神经鞘瘤(neurilemmoma);成神经细胞瘤(neuroblastoma);神经上皮瘤(neuroepithelioma);纤维神经瘤(neurofibroma);神经瘤(neuroma);副神经节瘤(paraganglioma);非嗜铬副神经节瘤(paraganglioma nonchromaffin)。可以被治疗的癌症类型还包括:血管角质瘤(angiokeratoma);血管淋巴样增生伴嗜酸细胞增多(angiolymploid hyperplasia with eosinophilia);血管瘤硬化(angioma sclerosing);多发性血管瘤(angiomatosis);血管球瘤(glomangioma);血管内皮瘤(hemangiendothelioma);血管瘤(hemangioma);血管外皮细胞瘤(hemangiopericytoma);血管肉瘤(hemangiosarcoma);淋巴管瘤(lymphangioma);淋巴管肌瘤(lymphangiomyoma);淋巴管肉瘤(lymphangiosarcoma);松果体瘤(pinealoma);癌肉瘤(carinosarcoma);软骨肉瘤(chondrosarcoma);叶状囊肉瘤(cystosarcoma phyllodes);纤维肉瘤(fibrosarcoma);血管肉瘤(hemangiosarcoma);平滑肌肉瘤(leiomyosarcoma);白色肉瘤(leukosarcoma);脂肪肉瘤(liposarcoma);淋巴管肉瘤(lymphangiosarcoma);肌肉瘤(myosarcoma);粘液肉瘤(myxosarcoma);卵巢癌;横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma);肉瘤(sarcoma);肿瘤(neoplasms);多发性神经纤维瘤(nerofibromatosis);和宫颈非典型增生(cervical dysplasia)。

[0088] 需要增强的TCR治疗的过度增殖性疾病的多样性的示例是B-细胞癌症,包括B-细胞淋巴瘤(比如不同形式的霍奇金病,非霍奇金淋巴瘤(NHL)或中枢神经系统淋巴瘤),白血病(比如急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia)(ALL),慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia)(CLL),多毛细胞白血病(Hairy cell leukemia)和慢性肌细胞白血病(chronic myoblastic leukemia))和骨髓瘤(myelomas)(比如多发性骨髓瘤(multiple myeloma))。其它B细胞癌症包括小淋巴细胞性淋巴瘤(small lymphocytic lymphoma),B细胞幼淋巴细胞白血病(B-cell prolymphocytic leukemia),淋巴浆细胞性

淋巴瘤 (lymphoplasmacytic lymphoma), splenic脾边缘区淋巴瘤 (marginal zone lymphoma), 浆细胞骨髓瘤 (plasma cell myeloma), 孤立性骨浆细胞瘤 (solitary plasmacytoma of bone), 骨外浆细胞瘤 (extraosseous plasmacytoma), 黏膜相关淋巴组织结外边缘区B细胞淋巴瘤 (extra-nodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated) (MALT) 淋巴组织), 结边缘区B细胞淋巴瘤 (nodal marginal zone B-cell lymphoma), 滤泡性淋巴瘤 (follicular lymphoma), 套细胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma), 弥漫性大B细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma), 纵隔 (胸腺) 大B细胞淋巴瘤 (mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma), 血管内大B细胞淋巴瘤 (intravascular large B-cell lymphoma), 原发性渗出性淋巴瘤 (primary effusion lymphoma), 伯基特氏淋巴瘤/白血病 (Burkitt's lymphoma/leukemia), 不确定恶性潜能的B细胞增殖 (B-cell proliferations of uncertain malignant potential), 淋巴瘤样肉芽肿病 (lymphomatoid granulomatosis), 和移植后淋巴组织增生性疾病 (post-transplant lymphoproliferative disorder)。

[0089] 自身免疫病包括: 关节炎, 类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis), 幼年型类风湿性关节炎 (juvenile rheumatoid arthritis), 骨关节炎 (osteoarthritis), 多软骨炎 (polychondritis), 银屑病关节炎 (psoriatic arthritis), 银屑病 (psoriasis), 皮炎 (dermatitis), 多肌炎 (polymyositis) / 皮肌炎 (dermatomyositis), 包涵体肌炎 (inclusion body myositis), 炎症性肌炎 (inflammatory myositis), 毒性表皮坏死 (toxic epidermal necrolysis), 系统性硬皮病和硬化 (systemic scleroderma and sclerosis), CREST综合征, 炎性肠病相关的反应 (responses associated with inflammatory bowel disease), 克罗恩病 (Crohn's disease), 溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis), 呼吸窘迫综合征 (respiratory distress syndrome), 急性呼吸窘迫综合征 (adult respiratory distress syndrome) (ARDS), 脑膜炎 (meningitis), 脑炎 (encephalitis), 葡萄膜炎 (uveitis), 结肠炎 (colitis), 血管球性肾炎 (glomerulonephritis), 过敏性疾病, 湿疹 (eczema), 哮喘 (asthma), 包括T细胞浸润和慢性炎症反应的病症, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis), 自身免疫性心肌炎 (autoimmune myocarditis), 白细胞粘附缺陷 (leukocyte adhesion deficiency), 系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus) (SLE), 亚急性皮肤红斑狼疮 (subacute cutaneous lupus erythematosus), 盘状狼疮 (discoid lupus), 狼疮性脊髓炎 (lupus myelitis), 狼疮性脑炎 (lupus cerebritis), 青少年型糖尿病 (juvenile onset diabetes), 多发性硬化 (multiple sclerosis), 过敏性脑脊髓炎 (allergic encephalomyelitis), 视神经脊髓炎 (neuromyelitis optica), 风湿热 (rheumatic fever), 西登哈姆氏舞蹈病 (Sydenham's chorea), 细胞因子和T-淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应性相关免疫反应, 结核病 (tuberculosis), 结节病 (sarcoidosis), 肉芽肿病 (granulomatosis) (包括韦格纳肉芽肿 (Wegener's granulomatosis) 和丘-施综合征 (Churg-Strauss disease)), 粒细胞缺乏症 (agranulocytosis), 脉管炎 (vasculitis) (包括超敏性血管炎/脉管炎 (hypersensitivity vasculitis/angiitis), ANCA和类风湿性脉管炎 (rheumatoid vasculitis)), 再生障碍性贫血 (aplastic anemia), 戴-布贫血 (Diamond Blackfan anemia), 免疫性溶血性贫血 (immune hemolytic anemia) (包括自身免疫溶血性贫血 (autoimmune hemolytic anemia))

(AIHA), 恶性贫血 (pernicious anemia), 纯红细胞再生障碍 (pure red cell aplasia) (PRCA), 因子VIII缺乏 (Factor VIII deficiency), 血友病A (hemophilia A), 自身免疫性嗜中性白血球减少症 (autoimmune neutropenia), 全血细胞减少症 (pancytopenia), 白细胞减少症 (leukopenia), 包括血细胞渗出 (leukocyte diapedesis) 的疾病, 中枢神经系统 (CNS) 炎性疾病, 多器官损伤综合征 (multiple organ injury syndrome), 重症肌无力 (myasthenia gravis), 抗原-抗体复合体介导的疾病, 抗肾小球基底膜疾病 (anti-glomerular basement membrane disease), 抗磷脂抗体综合征 (anti-phospholipid antibody syndrome), 过敏性神经炎 (allergic neuritis), 眼-口-生殖器三联综合征 (Behcet disease), 卡斯尔曼病 (Castleman's syndrome), 古德帕斯丘综合征 (Goodpasture's syndrome), 兰伯特-伊顿综合征 (Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome), 雷诺综合征 (Reynaud's syndrome), 舍格仑综合征 (Sjorgen's syndrome), 斯蒂文森-约翰逊综合征 (Stevens-Johnson syndrome), 实体器官移植排斥, 移植物抗宿主病 (graft versus host disease) (GVHD), 大疱性类天疱疮 (bullous pemphigoid), 天疱疮 (pemphigus), 自身免疫性多内分泌腺病 (autoimmune polyendocrinopathies), 血清阴性脊柱关节病 (seronegative spondyloarthropathies), 莱特尔病 (Reiter's disease), 僵人综合征 (stiff-man syndrome), 巨细胞性动脉炎 (giant cell arteritis), 免疫复合物性肾炎 (immune complex nephritis), IgA肾病, IgM多发性神经病或IgM介导的神经病, 特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura) (ITP), 血栓性血小板减少性紫癜 (thrombotic thrombocytopenic purpura) (TTP), 过敏性紫癜 (Henoch-Schonlein purpura), 自身免疫性血小板减少症 (autoimmune thrombocytopenia), 睾丸和卵巢的自身免疫病 (包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎 (autoimmune orchitis and oophoritis), 原发性甲状腺机能减退 (primary hypothyroidism); 自身免疫内分泌疾病, 包括自身免疫甲状腺炎 (autoimmune thyroiditis), 慢性甲状腺炎 (chronic thyroiditis) (桥本甲状腺炎 (Hashimoto's Thyroiditis)), 亚急性甲状腺炎 (subacute thyroiditis), 特发性甲状腺机能减退 (idiopathic hypothyroidism), 艾迪生病 (Addison's disease), 格雷夫斯病 (Grave's disease), 自身免疫多腺体综合征 (autoimmune polyglandular syndromes) (或多腺体内分泌综合征 (polyglandular endocrinopathy syndromes)), I型糖尿病, 也称为胰岛素依赖型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus) (IDDM) 和席汉综合征 (Sheehan's syndrome); 自身免疫肝炎 (autoimmune hepatitis), 淋巴样间质性肺炎 (lymphoid interstitial pneumonitis) (HIV), 闭塞性细支气管炎 (bronchiolitis obliterans) (非移植性) 相对NSIP, 吉兰-巴雷综合征 (Guillain-Barré Syndrome), 大血管血管炎 (large vessel vasculitis) (包括风湿性多肌痛 (polymyalgia rheumatica) 和巨细胞性 (高安) 动脉炎 (giant cell (Takayasu's) arteritis), 中等血管的血管炎 (medium vessel vasculitis) (包括川崎病 (Kawasaki's disease) 和结节性多动脉炎 (polyarteritis nodosa)), 结节性多动脉炎 (polyarteritis nodosa) (PAN) 强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis), 贝惹病 (Berger's disease) (IgA肾病 (IgA nephropathy)), 急进性肾小球肾炎 (rapidly progressive glomerulonephritis), 原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis), 乳糜泻 (Celiac sprue) (麸质肠病 (gluten enteropathy)), 冷球蛋白血症 (cryoglobulinemia), 肝炎相关冷球蛋白血症

(cryoglobulinemia associated with hepatitis), 肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis) (ALS), 冠心病 (coronary artery disease), 家族性地中海热 (familial Mediterranean fever), 显微镜下多血管炎 (microscopic polyangiitis), 科根综合征 (Cogan's syndrome), 维-奥二氏综合征 (Whiskott-Aldrich syndrome) 和血栓闭塞性脉管炎 (thromboangiitis obliterans)。

[0090] 在一个特定实施方案中,用通过本文公开的方法产生的增强亲和力的TCRs治疗受试者的方法包括患有急性髓细胞白血病 (acute myelocytic leukemia), 急性淋巴细胞性白血病 (acute lymphocytic leukemia), 或慢性粒细胞白血病 (chronic myelocytic leukemia) 的受试者。

[0091] 感染性疾病包括与感染剂相关的那些,并且包括多种细菌中的任一种 (例如,致病性大肠杆菌 (*E.coli*), 鼠伤寒沙门氏菌 (*S.typhimurium*), 铜绿假单胞菌 (*P.aeruginosa*), 炭疽芽胞杆菌 (*B.anthraxis*), 肉毒杆菌 (*C.botulinum*), 艰难梭菌 (*C.difficile*), 产气荚膜梭菌 (*C.perfringens*), *H.pylori*, 霍乱弧菌 (*V.cholerae*), 李斯特菌属 (*Listeria spp.*), 立克次氏体属 (*Rickettsia spp.*), 衣原体属 (*Chlamydia spp.*), 等等), 分枝杆菌 (*mycobacteria*), 和寄生虫 (包括任何已知的原生动物寄生成员)。感染性病毒包括真核病毒 (例如, 腺病毒, 本雅病毒, 疱疹病毒, 乳头瘤病毒, 副粘病毒, 小核糖核酸病毒 (picornavirus), 棒状病毒 (例如, 狂犬病 (Rabies)), 正粘病毒 (orthomyxovirus) (例如, 流感), 痘病毒 (例如, 牛痘 (*Vaccinia*)), 呼肠孤病毒 (reovirus), 逆转录病毒, 慢病毒 (例如, HIV), 虫媒病毒 (例如, HCV 等)。在某些实施方案中,用本发明的增强亲和力的TCRs治疗以胞质病原 (其抗原被I类MHC分子加工和展示) 的感染。

[0092] 可以以结合细胞的形式向受试者施用增强亲和力的TCRs (即, 靶细胞群体 (成熟T细胞 (例如, CD8⁺T细胞) 或T细胞系的其它细胞) 的基因治疗)。在一个特定实施方案中,向受试者施用的包含增强亲和力的TCRs的T细胞系细胞是自体细胞。在另一个实施方案中,增强亲和力的TCRs可以以可溶的形式施用于受试者。可溶的TCRs是本领域已知的 (参见, 例如, Molloy等人, 2005, *Curr.Opin.Pharmacol.* 5:438-443; 美国专利#6,759,243)。

[0093] “治疗 (treat)” 和 “治疗 (treatment)” 是指受试者 (即, 可以是人或非人哺乳动物 (例如, 灵长类, 小鼠, 大鼠) 的个体) 的疾病, 病症, 或病状的医疗管理。通常, 合适的剂量和治疗方案以足以提供治疗或预防利益的量提供本文描述的增强亲和力的TCRs, 和任选地佐剂。治疗盒预防利益包括改善的临床结果; 与疾病相关症状的减少或缓解; 减少的症状出现; 改善的生活质量; 更长的无病状态; 疾病程度的减少, 疾病状态的稳定; 疾病进程的延迟; 缓和; 存活; 或延长的存活。

[0094] 可以由医学领域的技术人员所确定的适于要治疗的 (或预防的) 疾病或病状的方式施用包括增强亲和力的受体的药物组合物。施用组合物的适当的剂量, 合适的持续时间, 和频率将由以下因素确定, 如患者状况, 疾病的尺寸、类型和严重度, 活性成分的特定形式, 和施用方法。

[0095] 在进一步的实施方案中,本公开的增强亲和力的TCRs可以用于诊断方法或成像方法,包括于本文鉴定的适应症或病症施用的这些方法。

实施例

[0096] 以下实施例表明,在OP9-DL1培养中,当暴露于其同源抗原时,由本公开所提供的,例如,TCR转基因胸腺细胞有效分化为“ $\gamma\delta$ 样” $CD4^-CD8^-CD24^-TCR\beta^+$ 系。此外,仅表达来自特异于肿瘤抗原WT1的T细胞克隆的TCR α 链的祖先胸腺细胞在OP9-DL1培养中也可以分化为该成熟TCR $\alpha\beta^+$ 系。从分选自这些培养物中的DN $TCR\alpha\beta^+$ 细胞群体产生TCR β 链文库,并当与抗原-特异的TCR α 链配对时筛选WT1MHC四聚体反应。使用该方法,鉴定了一些TCR β 链,所述TCR β 链能够与抗原-特异的TCR α 链配对以产生具有对WT1肽比原TCR至多高10-倍的亲和力的TCRs。

[0097] 实施例1:在OP9-DL1细胞上的分化过程中肽激动剂的参与可以驱使成熟TCR $\alpha\beta$ +DN细胞从纯化自TCR转基因小鼠的T细胞祖先的分化。

[0098] 在 β -选择之前通过 $\alpha\beta$ TCR的激动剂信号导致体内T细胞发育过程中“ $\gamma\delta$ 样”双阴性(DN)TCR $\alpha\beta^+$ 细胞的分化,并且DN3阶段的TCR交联导致在OP9-DL1细胞上的体外T细胞分化过程中相似系的分化。为了确定来自TCR转基因小鼠的祖先T细胞也能够DN3阶段响应同源肽抗原分化为DN $TCR\alpha\beta^+$,从转基因OT-1小鼠(表达对呈递到I类MHC H-2K^b上的卵清蛋白肽序列SIINFEKL (SEQ ID NO:1)特异的TCR; Stock#003831, Jackson Laboratory, ME; 还参见Hogquist等人,1994,细胞76:17-27)分选TCR $\alpha\beta$ -CD4-CD8-CD117⁺CD44⁺DN1和DN2祖先胸腺细胞并在缺少肽的情况下,或以增加的卵清蛋白-特异肽(SEQ ID NO:1)浓度,与转导以表达小鼠I类MHC分子H-2K^b的OP9-DL1细胞(Schmitt等人,2002,Immunity 17:749-756; 美国专利号7,575,925)培养20天并在不同时间点通过流式细胞术分析。在缺少肽的情况下,双阳性(DP)T细胞可以在第16天被检测到,并且在第20天构成培养物的主要部分(图1A)。然而,由甚至非常低的肽浓度(0.0001 μ M)减少了DP T细胞的发育或存活,并且来自含有0.01 μ M或更多肽的培养物中DP是完全缺失的(图1A),表明DP细胞由OP9-DL1培养中的强烈的激动剂信号转导负性选择。

[0099] 为了确定是否增加的强烈激动剂信号驱使TCR $\alpha\beta^+$ DN细胞发育,分析DN群体CD24和TCR β 的表达,所述CD24是在所有未成熟祖先T细胞群体上以高水平表达的成熟标记。发现大多数细胞在第5天表达高水平的CD24并且缺少TCR β 表达(图1B),但在第16天,来自所有培养条件的大多数DN细胞表达TCR β ,尽管从含有0.01 μ M或更多肽的培养物中观察到基本上更大量的CD24-细胞(与无肽培养物中6.9%TCR⁺CD24⁻相比,在含有0.01和1.0 μ M的肽的培养物中分别有38.2%和31.4%TCR⁺CD24⁻细胞)(图1B)。第20天,在含有0.01 μ M或1.0 μ M肽的培养物中,所有DN细胞中~60%为TCR β^+ CD24⁻形式,而在未接受或接受低浓度(0.0001 μ M)肽的培养中,DNs中仅~20%为TCR β^+ CD24⁻,并且接近50%为TCR β^- (图1B,1C)。此外,当在不同培养条件之间比较TCR表面表达水平时,响应高水平肽发育的TCR β^+ 细胞在细胞表面表达更高水平的TCR β (图1C)。不希望受理论限制,可能一些TCR $\alpha\beta^+$ DN细胞在无添加肽情况下在培养中的发育是由于与OP9-DL1培养系统中的其它肽-MHC配体交叉反应。为了证实在这些培养物中观察到的TCR $\alpha\beta^+$ DN细胞不通过DP阶段发育,从B6或OT-1胸腺分选尚未阳性选择的CD69⁻DP细胞并且在存在或缺少卵清蛋白SIINFEKL肽(SEQ ID NO:1)的情况下培养。B6DP细胞不受SIINFEKL肽(SEQ ID NO:1)的存在影响,但当存在SIINFEKL(SEQ ID NO:1)的情况下,将OT-1DP胸腺细胞培养在OP9-DL1细胞上时,观察到所有负选择的特征,包括细胞性的大量损失和共受体下调(图2)。重要的是,在这些培养物中观察到的DN细胞相同地都是TCR阴性的(图2)。

[0100] 这些数据表明,在OP9-DL1细胞上分化的过程中肽激动剂的参与可以驱动成熟TCR $\alpha\beta$ ⁺DN细胞从纯化自TCR转基因小鼠的T细胞祖先的分化。

[0101] 实施例2:转基因TCR α 链与内源性TCR β 链配对以驱动OP9-DL1培养系统中DN CD24⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺“ $\gamma\delta$ 效仿者”细胞的发育

[0102] 为了确定在 β -选择前仅TCR α 链表达是否也应该导致表达与引入能够以超过某亲和力和阈值参与OP9-DL1培养系统中的肽-MHC配体的TCR α 链配对的内源性TCR β 链的DN3T细胞祖先系转向,从B6小鼠分选CD4⁻CD8⁻CD117⁺CD44⁺DN1和DN2祖先胸腺细胞并用来自肾母细胞瘤抗原(WT1)特异的T细胞克隆3D的TCR α 链转导,所述T细胞克隆3D之前被鉴定为亲和力增强的变体,分离自3D α 的CDR3区域的饱和诱变文库。所述3D α 表达构建体含有内部核糖体进入序列基序,其后是人CD2的细胞外结构域(Genbank登录号.NM_001767.3(SEQ ID NO:48)和NP_001758.2(SEQ ID NO:49)(分别是全长CD2的转录本和蛋白序列))(IRES-hCD2)作为标记转导。在存在或缺少1.0 μ M的I类MHC H-2D^b限制的WT1肽RMFPNAPYL(SEQ ID NO:2)的情况下,将转导的祖先胸腺细胞培养达14天,并随后通过流式细胞术分析。不论在培养条件是否存在肽,hCD2阴性级分内的DN细胞几乎不含的TCR $\alpha\beta$ ⁺细胞。相反,来自未接受肽的培养物的hCD2阳性级分(其表达3D α 基因)含有6.8%TCR β ⁺细胞,并且当添加1.0 μ M WT1肽时,TCR $\alpha\beta$ ⁺细胞的数量增加至16.6%(图3A)。这些数据表明在 β -选择之前,显著的TCR $\alpha\beta$ ⁺DN细胞群体可以从异位表达TCR α 链的早期祖先胸腺细胞发育。此外,当同源肽(对于引入的TCR α 链)存在时该TCR $\alpha\beta$ ⁺DN细胞群体增加的事实提示这些细胞的大量级分响应WT1抗原-特异的信号发育。

[0103] 一并考虑,这些数据表明,TCR $\alpha\beta$ ⁺DN群体可能含有表达可能与引入的3D α 配对以形成对MHC-WT1肽四聚体的亲和力比原增强亲和力的受体更高,并且比可以从普通T细胞组库(repertoire)分离显著更高的TCR的TCR β 链的细胞。

[0104] 因此,3D α -转导的CD4⁻CD8⁻CD117⁺CD44⁺DN1和DN2祖先胸腺细胞在表达小鼠I类MHC H-2D^b的OP9-DL1细胞上分化并且还转导以表达WT1。在几天直到第21天收集非黏附细胞并分选hCD2⁺CD4⁻CD8⁻TCR β ⁺细胞于TRIzol试剂中(Invitrogen)(图3B)。汇集来自个别天的细胞分选物;纯化RNA,并产生cDNA。亲本3D TCR使用Vb10可变区。为了保留接触MHC的TCR CDR1和CDR2结构域,将候选TCR β 链限制于含有该可变区的那些。因此,通过使用Vb10特异的正向引物,和Cb2特异的反向引物的PCR分离分选的细胞群体内含有Vb10的TCR β 链(图3C)。设计Vb10-特异的正向引物含有CACCC序列,以允许定向TOPO-克隆入pENTRTM/D-TOPO[®]载体(Invitrogen),接着使用Gateway[®]技术转移以重组(Invitrogen)入逆转录病毒载体MigR1-attR(MigR1载体的版本(Pear等人,1998,Blood 92:3780-3792),其被修饰含有attR位点和ccdB基因以用于Gateway[®]克隆)。MigR1-TCR β 文库用于转导PlatE逆转录病毒包装细胞(Morita等人,2000,Gene Therapy 7:1063-1066; Cell Biolabs, Inc.),从而产生逆转录病毒上清,所述逆转录病毒上清随后用于通过逆转录病毒转导58 α ⁻ β ⁻细胞,所述58 α ⁻ β ⁻细胞为缺少内源性TCR α 和TCR β 链,(58^{-/-})的鼠T细胞系(Letourneur和Malissen,1989,Eur.J.Immunol.19:2269-74)。

[0105] 滴定逆转录病毒TCR β 文库上清,并且使用转导后导致少于20%转导的细胞的稀释度以保证大多数细胞仅含有一个逆转录病毒整合。首先分选转导的细胞的GFP阳性细胞,并且随后再在也具有高MHC-WT1肽四聚体染色水平的Vb10⁺细胞上分选两次(图4A)。第二次分

选之后,分析细胞的具有不相关的,但对GP33是MHC H-2D^b-肽四聚体特异的染色,从而评估MHC-WT1肽四聚体阳性细胞是否以不依赖于肽的方式结合MHC残基(图4A)。

[0106] 在对MHC-WT1肽四聚体高的,文库-转导的58^{-/-}细胞的第三分选之后,将分选的细胞扩增,溶解,并分离DNA。通过使用MigR1-attR载体特异引物的PCR回收逆转录病毒插入物,所述引物被设计包括来自载体的AttB Gateway®克隆位点。使用两步法,首先使用Gateway®重组克隆技术将插入物克隆入pDONR™载体(Invitrogen)并随后回到MigR1-attR。从重组克隆反应中挑取个体细菌克隆并测序。序列分析>30个克隆之后,鉴定了四个最普遍的TCRβ链用于进一步分析。有趣的是,几个克隆具有与原3Dβ链共有多个保守残基的CDR3β序列(图4B)。发现所述克隆中的一个(克隆#1)与原3Dβ几乎相同,除了P108Q置换和G112S置换(图4B)。将四个候选TCRβ链通过逆转录病毒转导入3Dα⁺58^{-/-}细胞并通过流式细胞术分析(图4C)。当转导入3Dα⁺58^{-/-}细胞时,所有四个候选克隆结合MHC-WT1肽四聚体,尽管克隆#4以比其它的显著低的水平结合MHC-WT1肽四聚体并不再进一步分析。亲本3Dβ链之前被密码子优化,并且因此在细胞表面表达更高水平的TCR,妨碍3Dβ和分离的克隆之间四聚体染色水平的直接比较。

[0107] 为了更直接地评估各个TCRβ链对MHC-WT1肽四聚体的相对亲和力,3Dα⁺58^{-/-}细胞转导以3Dα,并且将各个候选TCRβ链用MHC-WT1肽四聚体的六个2倍系列稀释度染色并由产生半数最大结合的配体浓度通过非线性回归将MFI值与饱和结合曲线匹配(图5A)。发现全部三个候选TCRβ链当与3Dα配对时的表观亲和力高于亲本3Dβ,并且克隆#1具有高~10倍的亲和力(图5A)。因此,为了直接比较与克隆#1配对的3Dα相对3Dβ的四聚体染色,将克隆#1密码子优化以致原3Dβ和克隆#1之间仅有的序列差异在CDR3区域中。将两种构建体转导入58^{-/-}细胞并且通过流式细胞术评估MHC-WT1肽四聚体染色。当克隆#1被密码子优化时,发现其如预期比原3Dβ更高的水平结合四聚体(图5B)。

[0108] 与增强抗原-特异的TCRs体外亲和力相关的一个问题是一些修饰可能仅增加受体对MHC的亲和力,而不是肽/MHC,从而增加TCR将自体反应的可能性。通过将TCRβ文库限制于共有相同的可变结构域(Vb10)的TCRβ链从而限制CDR3的可变性来降低该风险。为了确定所述候选TCRβ链中任一个赋予增加的以不依赖于肽的方式结合MHC H-2D^b分子倾向,将转导的58^{-/-}细胞用一系列MHC H-2D^b四聚体(肽:WT1,GP33,E4,MESN,SQV)染色。与3Dα相比,所有三种候选TCRβ链都被MHC-WT1肽四聚体以高水平染色,类似于原3Dβ(图5C)。当用其它MHC H-2D^b-肽四聚体染色时,全部三种TCRβ链对于四聚体染色均为阴性,提示对于这些受体所观察到的亲和力的增加不仅是增加的对MHC的亲和力的结果(图5C)。

[0109] 实施例3:通过在早期体外T细胞发育过程中抗原-特异的TCRα链的异位表达产生高亲和力WT1-特异的T细胞。

[0110] 在白血病细胞的表面肾母细胞瘤(WT1)抗原以异常高水平表达。筛选HLA A2/WT1-特异的T细胞克隆,获得具有高特异活性的克隆。从C4克隆分离TCRα和TCRβ链,所述C4克隆被确定具有对WT1的最高亲和力。将包含C4TCR并赋予高水平表达的慢病毒载体进行2012年计划的TCR基因治疗临床试验。为了进一步增强C4TCR对WT1抗原的亲和力,与具有表达C4TCRα链的人脐带血祖细胞一起使用在之前的实施例中描述的体外分化系统。

[0111] WT1-特异的T细胞的产生:

[0112] 产生在实施例1中描述的OP9-DL1细胞系的变体,所述变体表达人I类MHC分子HLA-

A2 (Genbank 登录号 .U18930.1 (SEQ ID NO:50) 和 AAA87076.1 (SEQ ID NO:51), 分别为转录本和蛋白序列,) 和人 I 类 MHC B2 微球蛋白 ($\beta 2M$) 分子 (Genbank 登录号 .NM_004048.2 (SEQ ID NO:52) 和 NP_004039.1 (SEQ ID NO:53), 分别为转录本和蛋白序列)。使用还编码作为转导标记的绿色荧光蛋白 (GFP) 的逆转录病毒载体, 通过逆转录病毒转导将 C4TCR 克隆的 TCR α 链稳定转导入源自脐带血的造血祖细胞。通过流式细胞术分选表达 GFP 的祖细胞并且在存在或缺少 WT1 肽 RMFPNAPYL (SEQ ID NO:2) 的情况下培养在 OP9-DL1-A2/ $\beta 2M$ 基质细胞上。在 OP9-DL1 培养中人造造血祖细胞容易增殖和分化至由表型 CD34⁺CD1a⁺CD4⁺ 表征的人 T 细胞发育阶段 (La Motte-Mohs 等人, 2005, Blood 105:1431-1439), 此时它们经历在 β , γ , 和 δ 位置处的 TCR 基因重排 (Spits, 2002, Nat. Rev. Immunol. 2:760-772)。假设, 与其它鼠对应物一样, 在 TCR β 位置产生框内重排的表达 TCR α 的人 T 细胞祖先将改变两个细胞中一个的命运: 表达不与转基因 TCR α 良好配对的, 或与转基因 TCR α 配对, 但不通过该 $\alpha\beta$ TCR 接受强信号的 TCR β 链的那些, 将响应通过前体 TCR 的信号转导分化至 DP 阶段; 另一方面, 产生能够与转基因 TCR α 配对并通过该成熟 $\alpha\beta$ TCR 接受足够强信号的 TCR β 链的那些将接收信号以向 DN TCR $\alpha\beta + \gamma \delta$ -样系分化。因为 DP 细胞在无阳性选择信号的情况下仅存活 $\sim 3-4$ 天, 并且因为有效阳性选择不存在于 OP9-DL1 培养物中, 绝大多数不通过 $\alpha\beta$ TCR 接受激动剂信号的细胞将从培养物中排除, 使由于早期 $\alpha\beta$ TCR 信号转导而发育的 $\gamma \delta$ -样细胞积累。

[0113] 分离候选 TCR β 链:

[0114] 在培养的不同点, 通过细胞分选收集具有 DN TCR $\alpha\beta + \gamma \delta$ -样表型的并且是 WT1 肽/A2MHC-四聚体阳性的非黏附细胞。因为培养物中抗原的持续存在可以导致 TCR 下调, 其可能降低四聚体染色至低于检测值, 因此检测 WT1 四聚体阳性细胞可是不可能的。此外, 因为这些细胞可能不表达 CD8 $\alpha\beta$, 不是非 CD8 依赖性的高亲和力受体不可通过四聚体染色检测。因此, 可能需从培养物中出现的所有 DN TCR $\alpha\beta$ + 细胞筛选 TCR β 链 (参见下文)。可能还需要限制候选 T 细胞至与由原 C4TCR β 链使用的相同 VB 片段 (VB17) 的那些, 从而保留亲本 C4TCR 的 CDR1 和 CDR2MHC 接触。

[0115] 细胞分选之后, 通过纯化总 RNA, 用 C- $\beta 1$ 或 C- $\beta 2$ 引物进行全长 RACE RT-PCR, 并将 PCR 产物克隆入 pENTRTM/D-TOPO[®] 载体 (Invitrogen) 克隆内源性 TCR β 链, 其允许定向 TOPO-克隆并整合允许快速和有效地使用 Invitrogen's Gateway[®] 技术重组系统转移至逆转录病毒载体 Mig-attR (MigR1 的变体 (Pear 等人, 1998, Blood 92:3780-3792), 其含有用于插入目的基因的 attR 位点) 的 attL 位点。将重组反应的产物电穿孔入高效大肠杆菌, 并将克隆刮在一起并大量提取 (maxiprep) 以产生可能 WT1-反应性 TCR β 链的逆转录病毒文库。

[0116] 筛选高亲和力 WT1-特异的 TCRs:

[0117] 通过将 TCR β 文库转导入已转导表达 C4TCR α 链的人 T 细胞系 H9 (目录 #HTB-176, ATCC, Manassas, VA) (H9-C4 α) 鉴定能够与 C4TCR α 链配对以形成高亲和力 WT1-特异的 TCR 的 TCR β 链。将转导的细胞通过流式细胞术分选高水平的 MHC-WT1 肽四聚体染色并且将通过 PCR 从分选的群体扩增逆转录病毒插入物。通过 TOPO-克隆 PCR 产物接着序列分析鉴定候选 TCR β 链。将选择的 TCR β 链和亲本 C4 α 转导入 H9-C4 α 细胞并且将通过将转导的细胞用 2 倍系列稀释的 PE-缀合的四聚体染色计算对 MHC-WT1 肽四聚体的相对亲和力 (如在实施例 2 中描述的)。通过将各个稀释度的 MFI 与通过非线性回归的结合曲线和限定为获得半数最大结合的四聚

体浓度的KD匹配确定亲和力值。进一步表征可以与C4TCR α 配对以产生通过MHC-肽四聚体染色比野生型C4受体更高亲和力的TCR的TCR β 链的安全性和有效性。

[0118] 实施例4:使用靶向WT1的TCR基因治疗的体内小鼠模型表征候选高亲和力TCRs的疗效和安全性。

[0119] 在靶向WT1的基因治疗的HLA-A2转基因小鼠模型中测试在实施例3中所鉴定的增强亲和力的人WT1-特异的TCRs的安全性和疗效。

[0120] 评估增强的TCRs的脱靶(off-target)活性:

[0121] 通过测量由在WT1肽存在或缺少的情况下TCR-转导的T细胞响应一系列表达A2的靶细胞导致的细胞因子产生评估高亲和力TCRs的混杂的活化。与亲本C4TCR相比,展现出对WT1阴性靶细胞的脱靶识别的TCRs不进入进一步研究。

[0122] 体内对正常组织的增强亲和力的TCRs活性:

[0123] 正常组织中的WT1表达在小鼠和人二者中类似,并且由C4TCR识别的WT1肽在小鼠中相同并且已知被小鼠细胞加工和呈递(Gaiger等人,2000,Blood 96:1480-9)。已经使用HLA-A2转基因小鼠测试正常组织被表达人高亲和力WT1-特异的TCRs的T细胞的识别(Kuball等人,2009,J.Exp.Med.206:463-475)。

[0124] 为了评价在之前实施例中公开的体外产生的增强亲和力的TCRs的安全性,将来自B6.A2/D^b小鼠的CD8⁺T细胞(表达编码融合于D^b的 α 3(用于结合小鼠CD8)的A2的 α 1和 α 2结构域的转基因)(Newberg等人,1996,J.Immunol.156:2473-2480),转导以表达候选增强亲和力的TCRs。在转导至含有小鼠而不是人C α 和C β 结构域之前修饰TCRs,其增加小鼠T细胞中的表达(Pouw等人,2007,J.Gene Med.9:561-570)。将TCR-转导的T细胞转移至小鼠之后约4-6周,通过组织学分析已知天然表达WT1的组织(例如,肺和肾)中T细胞浸润和组织损伤的证据,并且通过流式细胞术评估骨髓中表达WT1的造血祖细胞的大量减少。

[0125] 增强的亲和力与改善的靶点识别和功能的关联:

[0126] 存在对于TCRs的亲和力阈值可以存在的证据,超过所述阈值进一步增强将不增加T细胞功能并且可能实际上降低抗原灵敏性(Schmid等人,2010,J.Immunol.184:4936-46)。因此,将高亲和力TCR-转导的CD8⁺T细胞对用有限肽浓度脉冲的靶细胞的反应与表达亲本C4TCR的T细胞相比较。分析细胞因子产生(IFN γ /IL-2)和增殖,以及细胞溶解活性。呈现增加的亲和力和增强的功能的TCRs进入进一步研究和可能在TCR基因治疗试验中使用。

[0127] 实施例5:体内产生高亲和力WT1-特异的T细胞。

[0128] 使用体内小鼠模型(TCR α 逆基因小鼠)以确定TCR β ⁺双阴性(DN)细胞是否可以在胸腺中发育。与转基因方法相比,逆基因(通过逆病毒转导的)小鼠允许快速产生表达特异的TCR转基因的小鼠。制备逆基因小鼠的方法是本领域已知的(参见,例如,Holst等人,2006,Nat.Protoc.1:406-417;Holst等人,2006,Nat.Methods 3:191-197;Bettini等人,2012,Immunology 136:265-272)。简而言之,从B6小鼠骨髓纯化造血祖先/干细胞并转导以表达来自高亲和力WT1特异的3D-PYY TCR或低亲和力间皮素特异的TCR 7431之一的TCR α 链。3D-PYY TCR是从3D TCR改造的更高亲和力TCR,其使用T细胞展示系统和用WT1/D^b Ig DimerX(BD Biosciences)的选择来鉴定(Stone等人,2011,J.Immunol.186:5193-5200;Chervin等人,2008,J.Immunol.Methods 339:175-184)。包含3D-PYY TCR α 或7431 α 转基因的逆转录病毒构建体还包括作为转导标记的人CD2细胞外结构域,并在两个转基因之间具有IRES。将转

导的源自骨髓的祖先转移入致死剂量照射的B6宿主小鼠以产生表达引入的TCR α 链的骨髓嵌合体。体内转移TCR α -转导的骨髓细胞之后六周,牺牲小鼠。通过流式细胞术分析来自胸腺和脾的细胞的CD4和CD8表达(图6A,6B)。通过胸腺中的TCR β^+ 细胞分析CD4和CD8表达(图6A)显示可以在发育早期异位表达TCR α 链的转导的胸腺细胞中体内检测到大量的双阴性TCR β^+ 细胞,并且该群体在表达来自高亲和力TCR的TCR α (例如,3D-PYY α)的小鼠中更明显。还分别分析来自3D-PYY α 和7431 α 逆基因小鼠的DN TCR β^+ 胸腺细胞中V β 10和V β 9的表达(图6A)。这些数据显示对于使用相同V β 基因片段作为原抗原特异的TCR的细胞,富集DN TCR β^+ 群体。结合在一起,这些数据支持这样的假想:DN TCR β^+ 细胞响应由与在胸腺中表达的靶抗原(即,WT1或间皮素)的同源相互作用导致的相对强的TCR信号而发育。TCR β^+ 逆基因脾细胞的CD4和CD8表达分析显示,这些DN TCR β^+ 细胞也存在于逆基因小鼠的外周(图6B)。

[0129] 将来自3D-PYY α 和7431 α 逆基因小鼠的脾细胞分别用WT1肽和间皮素肽刺激,并在IL-2的存在下体外培养6天。将IL-2添加至培养中以可能扩增抗原特异的细胞,从而它们可以通过四聚体染色被检测。通过流式细胞术,在TCR β^+ 门内分析培养物中CD4和CD8表达,以及亲本TCR V β 基因的表达(图7)。同样,观察亲本V β 基因家族的富集,尤其是对于高亲和力3D-PYY。还通过用WT1或间皮素肽/MHC四聚体染色分析培养的T细胞中抗原-特异的T细胞的存在(图7)。这些数据显示,尤其对于高亲和力3D-PYY α 逆基因小鼠,大量的抗原特异的T细胞存在于这些培养物中。在TCR α -转导的(hCD2 $^+$)群体内发现了四聚体阳性细胞的事实表明,这些细胞作为早期表达TCR α 链的结果而发育。这表明在这些小鼠中发育的DN TCR β^+ 细胞实际上含有高亲和力抗原特异的T细胞。因为这些是DN细胞,它们不具有CD8的贡献以帮助四聚体结合-则这些TCRs是“CD8 $^-$ 不依赖的”-CD8-不依赖的四聚体结合需要高亲和力TCR。

[0130] 可以将上文描述的不同实施方案组合以提供进一步实施方案。将本说明书中提及的和/或申请材料表中列出的所有美国专利,美国专利申请公开,美国专利申请,外国专利,外国专利申请和非专利出版物以其整体通过引用并入本文。如果需要,使用不同专利、申请和公开的观点,实施方案的方面可以被改进以提供更进一步实施方案。

[0131] 根据上文详述的说明,可以对所述实施方案进行这些和其它改变。通常,在以下权利要求中,使用的术语应该不被认为将权利限制于说明书和权利要求中公开的特定实施方案,而应该被认为包括和此权利要求被赋予的相应物的全部范围一起的所有可能的实施方案。因此,权利要求不受公开所限制。

序列表

<110> 弗雷德哈钦森癌症研究中心
托马斯·M·施米特
菲利普·D·格林伯格

<120> 增强亲和力的T细胞受体及其制备方法

<130> 360056.412W0

<140> US

<141>

<150> US 61/642,358

<151> 2012-05-03

<160> 53

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的卵清蛋白肽

<400> 1

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001]

<220>

<223> 合成的WT1 肽

<400> 2

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1

5

<210> 3

<211> 3366

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

cgtagggattt	ccagaccgcg	gctttetaat	cggtcggga	ggaagctctg	cagctctctt	60
gggaattaag	ctcaatctct	ggactctctc	tctttctctt	tctccccctc	ctctctctgc	120
gaagaagctc	aagacaaaac	caggaagccg	gcgacctca	ctctctcggg	ggctgggagg	180
aaggaggaaa	acgaaagctg	ccgcccgcgc	gctgtccccc	gagagctgce	tttctctggg	240
catccctggg	gctgcgcggg	gacctcgcag	ggcggatata	aagaaccgcg	gccttgggaa	300
gagggcgaga	ccgcttttla	aagaaagaag	tccgggtec	tgcgctctgg	ggcggaggcaa	360
gggcctttt	ctgcaccgce	tcccctgggc	ccatcgatcc	cccgcgcglt	cggcctgttt	420
ctaaggagag	aagtgggggc	ccccaggct	cgcgcgtgga	gcgaagcagc	atgggcagtc	480
ggtagcgcct	ggccctggcg	gtgctctcgg	ccttgcctgtg	tcaggtctgg	agctctgggg	540
tgttcgaact	gaagctgcag	gagttcgtca	acaagaaggg	gctgctgggg	aaccgcaact	600
gctgcgcggg	gggcgcgggg	ccaccgcctg	gcgectgcgc	gacctctctc	cgcgtgtgcc	660
taagcacta	ccaggccagc	gtgtcccccg	agccgccctg	cacctacggc	agcgcctgca	720
ccccctgct	gggcgtcgac	tcttcagtc	tgcgccagcg	cgggggcgcc	gactcccgct	780
tcagcaacc	catccgcttc	cccttcggct	tcacctggcc	gggcaccttc	tctctgatta	840
ttgaagctct	ccacacagat	tctctgatg	acctgcgaac	agaaaaccca	gaaagactca	900
tcagccgect	ggccacccag	agccacctga	cgttgggcga	ggagtggtcc	caggacctgc	960
acagcagcgg	ccgcaccgac	ctcaagtact	cttaaccgctt	cgtgtgtgac	gaacactact	1020
accgagaggg	ctgctccggt	tcttgcctgc	ccccggagca	tgccttcggc	cacttcacct	1080
gtggggagcg	tggggagaaa	gtgtgcaacc	ctggctggaa	agggccctac	tgcaagagac	1140
cgatctgect	gcctggatgt	gatgagcagc	atggatcttg	tgacaaacca	ggggaatgca	1200
agtgacagat	ggcctggcag	ggccggtact	gtgacgagtg	tatccgetat	ccaggetgct	1260
tccatggcac	ctgcaccgag	ccctggcagt	gcaactgcca	ggaaggctgg	ggggcccttt	1320
tctgcaacca	ggacctgaac	tactgcacac	accataagcc	ctgcaagaat	ggagccacct	1380

```

gcaccaaac gggccaggg agctacactt gctcttgcg gectgggtac acaggtgcca 1440
cctggagact ggggattgac gagtgtgacc ccagcccttg taagaacgga gggagctgca 1500
cggatctcga gaacagetac tccctgtacct gccacccegg cttctacggc aaaatctgtg 1560
aattgagatg catgacctgt ggggaoggee cttgctttaa cgggggtogg tgcicagaca 1620
gccccgatgg aggggtacagc tgcctgtgcc ccgtgggcta ctcggcttc aactgtgaga 1680
agaaaattga ctactgcage tcttcacctt gttctaatgg tgcctaatgt gtggaccteg 1740
gtgatgecta cctgtgccc tgcacggccc gcttctcggg gaggcactgt gacgacaacg 1800
tggacgaactg cgcctcctcc ccgtgcgcca acgggggcac ctgcgggat ggcgtgaacg 1860
acttctcttg caactgccc cctggctaca cgggcaggaa ctgcagtgcc cccgtcagca 1920
ggtgcgagca cgcaccctgc cacaatgggg ccacctgcca cggaggggce caaccctatg 1980
tgtgcgagtg tgcctgagge tacgggggtc ccaactgcca gttctctctc cccgagctgc 2040
cccgggccc agcgtgtgtg gacctcactg agaagctaga gggccaggge gggcattcc 2100
cctgggtggc cgtgtgcgcc ggggtcatcc ttgtctctat gctgctgctg ggtgtgccc 2160
ctgtgggtgt ctgctgccc ctgaggctgc agaagcaccg gcccacagcc gaccctctgc 2220
ggggggagac ggagacctg aacaacctgg ccaactgcca gctgagaag gacatctcag 2280
tcagcatcat cggggcccag cagatcaaga acaccaaca gaaggcggac ttccacgggg 2340
accacagcgc cgacaagaat ggcttcaagg cccctaccc agcgggtggc tataacctcg 2400
tgcaggacct caagggtgac gacaccgcc tcaggagcgc gcacagcaag cgtgacacca 2460
agtgcagccc ccagggtctc tcaggggagg agaaggggac cccgaccaca ctcagggggtg 2520
gagaagcaic tgaagaanaa aggcctgact cggcctgttc aacttcaaaa gacaccaagt 2580
accagtcggt gtactgcata tccgaggaga aggatgagtg cgtctatagca actgagggtg 2640
aaaaatggaag tgagatggca agactcctct tctctttaa ataagtaaaa tttcaaggat 2700
atatgcccca acgaatgctg ctgaagagga gggagcctc gtggactgct gctgagaac 2760
cgagtccaga ccgagcaggt tctctctctg aggtctctga cgcctgcgca cagcctgtcg 2820
cggcccggcc gccctggcca ctgccttccg tgactgtgcc gttgcactat ggacagttgc 2880
tcttaagaga atafatattt aantgggtga actgaattac geatangaag catgcactgc 2940
ctgagtgat attttggatt cttatgacc agtctttct tgaattgaa acacaaacac 3000
tgcctttatt gtcctttttg ataccagat gtgcttttc tagatggaaa agatgtgtgt 3060
tattttttgg atttgtaaaa atatttttca tgatatctgt aaagcttgag tattttgtga 3120
tgtctgtttt ttataatitaa aattttggta aatatgtaca aaggcacttc ggtctctatg 3180
gaetataitt tttgtatat aaaigtattt atggaatait gtgcaaatgi tatttgagtt 3240
ttttactgtt ttgttaalga agaaatctct ttttaaaata tttttccaaa ataaatttta 3300
tgaatgacaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3360
aaaaaa

```

[0002] <210> 4
 <211> 723
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 4
Met Gly Ser Arg Cys Ala Leu Ala Leu Ala Val Leu Ser Ala Leu Leu
1 5 10 15
Cys Gln Val Trp Ser Ser Gly Val Phe Glu Leu Lys Leu Gln Glu Phe
20 25 30
Val Asn Lys Lys Gly Leu Leu Gly Asn Arg Asn Cys Cys Arg Gly Gly
35 40 45
Ala Gly Pro Pro Pro Cys Ala Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu
50 55 60
Lys His Tyr Gln Ala Ser Val Ser Pro Glu Pro Pro Cys Thr Tyr Gly
65 70 75 80
Ser Ala Val Thr Pro Val Leu Gly Val Asp Ser Phe Ser Leu Pro Asp
85 90 95
Gly Gly Gly Ala Asp Ser Ala Phe Ser Asn Pro Ile Arg Phe Pro Phe
100 105 110
Gly Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Leu His
115 120 125
Thr Asp Ser Pro Asp Asp Leu Ala Thr Glu Asn Pro Glu Arg Leu Ile
130 135 140
Ser Arg Leu Ala Thr Gln Arg His Leu Thr Val Gly Glu Glu Trp Ser
145 150 155 160
Gln Asp Leu His Ser Ser Gly Arg Thr Asp Leu Lys Tyr Ser Tyr Arg
165 170 175
Phe Val Cys Asp Glu His Tyr Tyr Gly Glu Gly Cys Ser Val Phe Cys
180 185 190
Arg Pro Arg Asp Asp Ala Phe Gly His Phe Thr Cys Gly Glu Arg Gly
195 200 205
Glu Lys Val Cys Asn Pro Gly Trp Lys Gly Pro Tyr Cys Thr Glu Pro
210 215 220
Ile Cys Leu Pro Gly Cys Asp Gln Gln His Gly Phe Cys Asp Lys Pro
225 230 235 240
Gly Glu Cys Lys Cys Arg Val Gly Trp Gln Gly Arg Tyr Cys Asp Glu
245 250 255
Cys Ile Arg Tyr Pro Gly Cys Leu His Gly Thr Cys Gln Gln Pro Trp
260 265 270

```

Gln Cys Asn Cys Gln Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asn Gln Asp
 275 280 285
 Leu Asn Tyr Cys Thr His His Lys Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys
 290 295 300
 Thr Asn Thr Gly Gln Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys Arg Pro Gly Tyr
 305 310 315
 Thr Gly Ala Thr Cys Glu Leu Gly Ile Asp Glu Cys Asp Pro Ser Pro
 325 330 335
 Cys Lys Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Ser Cys
 340 345 350
 Thr Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Lys Ile Cys Glu Leu Ser Ala Met
 355 360 365
 Thr Cys Ala Asp Gly Pro Cys Phe Asn Gly Gly Arg Cys Ser Asp Ser
 370 375 380
 Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Cys Arg Cys Pro Val Gly Tyr Ser Gly Phe
 385 390 395 400
 Asn Cys Glu Lys Lys Ile Asp Tyr Cys Ser Ser Ser Pro Cys Ser Asn
 405 410 415
 Gly Ala Lys Cys Val Asp Leu Gly Asp Ala Tyr Leu Cys Arg Cys Glu
 420 425 430
 Ala Gly Phe Ser Gly Arg His Cys Asp Asp Asn Val Asp Asp Cys Ala
 435 440 445
 Ser Ser Pro Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Arg Asp Gly Val Asn Asp
 450 455 460
 Phe Ser Cys Thr Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Arg Asn Cys Ser Ala
 465 470 475 480
 Pro Val Ser Arg Cys Glu His Ala Pro Cys His Asn Gly Ala Thr Cys
 485 490 495
 His Glu Arg Gly His Arg Tyr Val Cys Glu Cys Ala Arg Gly Tyr Gly
 500 505 510
 Gly Pro Asn Cys Gln Phe Leu Leu Pro Glu Leu Pro Pro Gly Pro Ala
 515 520 525
 Val Val Asp Leu Thr Glu Lys Leu Glu Gly Gln Gly Gly Pro Phe Pro
 530 535 540
 Trp Val Ala Val Cys Ala Gly Val Ile Leu Val Leu Met Leu Leu Leu
 545 550 555 560
 Gly Cys Ala Ala Val Val Cys Val Arg Leu Arg Leu Glu Lys His
 565 570 575
 Arg Pro Pro Ala Asp Pro Cys Arg Gly Glu Thr Glu Thr Met Asn Asn
 580 585 590
 Leu Ala Asn Cys Gln Arg Glu Lys Asp Ile Ser Val Ser Ile Ile Gly
 595 600 605
 Ala Thr Gln Ile Lys Asn Thr Asn Lys Lys Ala Asp Phe His Gly Asp
 610 615 620
 His Ser Ala Asp Lys Asn Gly Phe Lys Ala Arg Tyr Pro Ala Val Asp
 625 630 635 640
 Tyr Asn Leu Val Gln Asp Leu Lys Gly Asp Asp Thr Ala Val Arg Asp
 645 650 655
 Ala His Ser Lys Arg Asp Thr Lys Cys Gln Pro Gln Gly Ser Ser Gly
 660 665 670
 Glu Glu Lys Gly Thr Pro Thr Thr Leu Arg Gly Gly Glu Ala Ser Glu
 675 680 685
 Arg Lys Arg Pro Asp Ser Gly Cys Ser Thr Ser Lys Asp Thr Lys Tyr
 690 695 700
 Gln Ser Val Tyr Val Ile Ser Glu Glu Lys Asp Glu Cys Val Ile Ala
 705 710 715 720
 Thr Glu Val

[0003]

<210> 5
 <211> 3444
 <212> DNA
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 5
 ettggcgata gtgcaagaga taccggctca gaacactctg ggagcggcag eggctgccga 60
 gtgacgcegg gccgggaac cagggegcgc gcgcagtec ttgccaccac cgttcccacc 120
 gcgcccctcg gggcccggga ttatcgcctc accgggtggga ttccagacc gcccttctct 180
 aataggeectg cgaaggaage cactgcaage tetcttggga attaagctga acatctggge 240
 tcttctect ctgtgtctta tctctttct cctcttccc tccgcaaga agcttaagac 300
 aaaaccagaa agcagagac actcaactct cegtggactg aaagccagac gaagagaaa 360
 cegaaagttg tcttttctca gtgcctcgta gagctcttgc cggggacctc gctgaaggca 420
 ccgaccctc ctgaagcgac ctggcctga tagcacctt ggagccgaga gaagccttcc 480
 cgccagtact cctcgggtea tatagacttt cctggcatcc ctgggtcttt gaagaagaaa 540
 gaaaagagga tactctagga gagcaagggc gtccagcggg accatgggcc gtccgagcgc 600

```

gctagccctt gccgtggtct ctgcccctgt gtgccaggtc tggagctcog gcgtatttga 660
getgaagetg caggagttcg tcaacaagaa gggcctgctg gggaaaccga actgetgecg 720
egggggctct ggeccgcctt gcgcctgcag gaecttcttt cggctatgcc tcaagcacta 780
ccaggcccagc gtgtcaccgg agccaccctg caectacggc agtgetgtca cggcagtgei 840
gggtgtcagc tecttcagcc tgcctgatgg cgcaggcatc gaccccgcct tcagcaacc 900
eatecgaitc ceettogget teacctggee aggtaccttc tctetgatea ttgaagccct 960
ccatacacag tcteccgatg aectegcaae agaaaaacca gaaagactca tcagecgect 1020
gaccacacag aggeacctca ctgtgggaga agaattggtct caggaccttc acagtagcgg 1080
ccgcacacag cctcggtaet cttaecggtt tgtgtgtgac gagcactact acggagaagg 1140
ttgctctgtg ttctgccgac ctggggatga cgccttttggc caectcacet ggggggacag 1200
agggggagaag atgtgcgacc ctggctggaa aggccagtae tgcactgacc caaletgtct 1260
gccaggggtg gatgaccaac atggatactg tgacaaacca ggggagtgea agtgcagagt 1320
tggctggcag ggccgctact gogatgagt catccgatac ccaggtttgt tccatggcac 1380
ctgcagcaaa ccttggcagt gtaactgcca ggaaggttgg gggggccttt tctgcaacca 1440
agacctgaac tactgiactc accataagcc gtgcaggaat ggagccacct gcaccaaac 1500
ggccaggggg agctacacat gtctcgcgg acttgggtat acaggtgcca actgtgagct 1560
ggaagtagat gagtgtgctc ctagcccctg caagaacgga cgcagctgca cggaccttga 1620
ggcagcttc tcttgcacct gccctcccg cttctatgge aaggtctgtg agctgagcgc 1680
cagcaactgt ccagatggcc ctgtctcaa tggaggacga tgttcagata accctgacgg 1740
aggetaaccc tgcctatgce ccttgggctt ctctggcttc aactgtgaga agaagatgga 1800
tctctggcgc tcttcccctt gttctaagg tgcctaatgt gtggacctcg gcaactctta 1860
cctgtgcagg tgcaggetg gettctccgg gaggtactge gaggacaatg tggatgactg 1920
tgcctccctc cctgttgeaa atgggggcac ctgcccggac agtgtgaacg acttctcccg 1980
tacctgcccc cctgtctaca cggcaagaa ctgcagcgc cctgtcagca ggtgtgagca 2040
tgcacctgce cataatgggg ccacctgcca ccagaggggc cagcctaca tgtgtgagtg 2100
cgccagggcc tatggcgccc ccaactgcca gttctgtct cctgagccac caccaggggc 2160
catggtgtgt gacctcagtg agagccatct ggagagccag ggcgggccc tccccgggt 2220
ggcctgtgtt gccggggigg tctttgctct cctgctctcg ctgggctgtg ctgctgtgtt 2280
ggctctgctc cgctgaagc tacagaaaaa ccagcctcca cctgaacctt gtgggggaga 2340
gacagaaaac atgaacaacc tagccaattg ccagcgcgag aaggacgttt ctgttagcat 2400
cattgggget acccagatca agaacacca caagaaggcg gacttcaag gggaccatgg 2460
agccgagaag agcagcttla aggtccgata ccccactgtg gactataacc tcttccgaga 2520
ctcraaggga gatgaagcca cgtcaggga tacacacagc aaactgaca ccaagtgcca 2580
gtccagagc tctgcaggag aagagaagat cgccecaaca cttaggggtg gggagattcc 2640
tgacagaaaa agccagagt ctgtctactc tacttcaag gacaccaagt accagtgggt 2700
gtatgttctc tctgcagaaa aggatgagt tgttatagcg actgaggtgt aaga tggaaag 2760
cgalgtggca aaattcccct ttctcttaaa taaattcca aggatatagc cccgatgaal 2820
gctgtctaga gaggaaggga gaggaacccc agggactgct getgagaacc aggttcagge 2880
gaagctgggt ctctcagagt tagcagagge gcccgacact gccagcctag gctttggctg 2940
ccgtggact gectgtggt tgttcccatt gcaetatgga cagttgcttt gaagagtata 3000
talltaaatg gacagtgac ttgattcata taggaagcac gcactgcccc cactctatc 3060
ttggattact atgagccagt ctctccctga actagaaaaa caactgcect tattgtcctt 3120
tttgatactg agatgtgitt tttttitcc tagacgggaa aaagaaaaac tgtgttatti 3180
ttttgggat ttgtaaaaaa tttttcatga taetgtaaa gettgagtat ttttgacgt 3240
tcattttttt ataatttaaa tttttgtaaa tatgtacaaa ggcacttggg gtctatgtga 3300
ctatattttt ttgatataaa atgtatttat ggaatatgtt gcaaatgtta tttgatttt 3360
ttactgtttt gttaatgaag aaattcattt taaaaatatt ttccaaaat aaatataatg 3420
aactacaaaa aaaaaaaaaa aaaa 3444

```

[0004]

```

<210> 6
<211> 722
<212> PRT
<213> 小家鼠

```

```

<400> 6
Met Gly Arg Arg Ser Ala Leu Ala Leu Ala Val Val Ser Ala Leu Leu
1 5 10 15
Cys Gln Val Trp Ser Ser Gly Val Phe Gln Leu Lys Leu Gln Glu Phe
20 25 30
Val Asn Lys Lys Gly Leu Leu Gly Asn Arg Asn Cys Cys Arg Gly Gly
35 40 45
Ser Gly Pro Pro Cys Ala Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys
50 55 60
His Tyr Gln Ala Ser Val Ser Pro Glu Pro Pro Cys Thr Tyr Gly Ser
65 70 75 80
Ala Val Thr Pro Val Leu Gly Val Asp Ser Phe Ser Leu Pro Asp Gly
85 90 95
Ala Gly Ile Asp Pro Ala Phe Ser Asn Pro Ile Arg Phe Pro Phe Gly
100 105 110
Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Leu His Thr
115 120 125
Asp Ser Pro Asp Asp Leu Ala Thr Glu Asn Pro Glu Arg Leu Ile Ser
130 135 140
Arg Leu Thr Thr Gln Arg His Leu Thr Val Gly Glu Glu Trp Ser Gln
145 150 155 160

```


Asp Leu His Ser Ser Gly Arg Thr Asp Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Phe
 165 170 175
 Val Cys Asp Glu His Tyr Tyr Gly Glu Gly Cys Ser Val Phe Cys Arg
 180 185 190
 Pro Arg Asp Asp Ala Phe Gly His Phe Thr Cys Gly Asp Arg Gly Glu
 195 200 205
 Lys Met Cys Asp Pro Gly Trp Lys Gly Gln Tyr Cys Thr Asp Pro Ile
 210 215 220
 Cys Leu Pro Gly Cys Asp Asp Gln His Gly Tyr Cys Asp Lys Pro Gly
 225 230 235 240
 Glu Cys Lys Cys Arg Val Gly Trp Gln Gly Arg Tyr Cys Asp Glu Cys
 245 250 255
 Ile Arg Tyr Pro Gly Cys Leu His Gly Thr Cys Gln Gln Pro Trp Gln
 260 265 270
 Cys Asn Cys Gln Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asn Gln Asp Leu
 275 280 285
 Asn Tyr Cys Thr His His Lys Pro Cys Arg Asn Gly Ala Thr Cys Thr
 290 295 300
 Asn Thr Gly Gln Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys Arg Pro Gly Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gly Ala Asn Cys Glu Leu Glu Val Asp Glu Cys Ala Pro Ser Pro Cys
 325 330 335
 Lys Asn Gly Ala Ser Cys Thr Asp Leu Glu Asp Ser Phe Ser Cys Thr
 340 345 350
 Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Lys Val Cys Glu Leu Ser Ala Met Thr
 355 360 365
 Cys Ala Asp Gly Pro Cys Phe Asn Gly Gly Arg Cys Ser Asp Asn Pro
 370 375 380
 Asp Gly Gly Tyr Thr Cys His Cys Pro Leu Gly Phe Ser Gly Phe Asn
 385 390 395 400
 Cys Glu Lys Lys Met Asp Leu Cys Gly Ser Ser Pro Cys Ser Asn Gly
 405 410 415
 Ala Lys Cys Val Asp Leu Gly Asn Ser Tyr Leu Cys Arg Cys Gln Ala
 420 425 430
 Gly Phe Ser Gly Arg Tyr Cys Glu Asp Asn Val Asp Asp Cys Ala Ser
 435 440 445
 Ser Pro Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Arg Asp Ser Val Asn Asp Phe
 450 455 460
 Ser Cys Thr Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Lys Asn Cys Ser Ala Pro
 465 470 475 480
 Val Ser Arg Cys Glu His Ala Pro Cys His Asn Gly Ala Thr Cys His
 485 490 495
 Gln Arg Gly Gln Arg Tyr Met Cys Gln Cys Ala Gln Gly Tyr Gly Gly
 500 505 510
 Pro Asn Cys Gln Phe Leu Leu Pro Glu Pro Pro Pro Gly Pro Met Val
 515 520 525
 Val Asp Leu Ser Glu Arg His Met Glu Ser Gln Gly Gly Pro Phe Pro
 530 535 540
 Trp Val Ala Val Cys Ala Gly Val Val Leu Val Leu Leu Leu Leu
 545 550 555 560
 Gly Cys Ala Ala Val Val Cys Val Arg Leu Lys Leu Gln Lys His
 565 570 575
 Gln Pro Pro Pro Glu Pro Cys Gly Gly Glu Thr Glu Thr Met Asn Asn
 580 585 590
 Leu Ala Asn Cys Gln Arg Glu Lys Asp Val Ser Val Ser Ile Ile Gly
 595 600 605
 Ala Thr Gln Ile Lys Asn Thr Asn Lys Lys Ala Asp Phe His Gly Asp
 610 615 620
 His Gly Ala Glu Lys Ser Ser Phe Lys Val Arg Tyr Pro Thr Val Asp
 625 630 635 640
 Tyr Asn Leu Val Arg Asp Leu Lys Gly Asp Glu Ala Thr Val Arg Asp
 645 650 655
 Thr His Ser Lys Arg Asp Thr Lys Cys Gln Ser Gln Ser Ser Ala Gly
 660 665 670
 Glu Glu Lys Ile Ala Pro Thr Leu Arg Gly Gly Glu Ile Pro Asp Arg
 675 680 685
 Lys Arg Pro Glu Ser Val Tyr Ser Thr Ser Lys Asp Thr Lys Tyr Gln
 690 695 700
 Ser Val Tyr Val Leu Ser Ala Glu Lys Asp Glu Cys Val Ile Ala Thr
 705 710 715 720
 Glu Val

[0005]

<210> 7
 <211> 3420

<212> DNA
<213> 智人

<400> 7

aggtttcagt	agcggcgetg	cgcgcaggec	gggaacacga	ggccaagagc	cgcagcccca	60
gecgccittg	tgeagcgtac	accggcaacta	gcccgccttgc	agccccagga	ttagacagaa	120
gaecgcgtct	cggcggcgtc	gccgccccage	cgtagtcacc	tggattacct	acagcggcag	180
ctgcagcggg	gccagcgaga	aggccaagg	ggagcagcgt	cccagagagga	ggcctcttt	240
tcagggacce	cgcggcctgg	cggacgcgcg	ggaaaagcggc	gtcgcgaaca	gagccagatt	300
gagggcccgc	gggtggagag	agcgcgcgcc	gaggggatgg	cggcagcgtc	ccggagcgc	360
tcctggctggg	cgtactcgt	gctggtggca	ctttggcagc	agcgcgcggc	eggctccggc	420
gtcttccage	tgcagctgca	ggagttcact	aacgagcgcg	gcgtactggc	cagtgggcgg	480
ccittgcagc	ccgctgcgc	gactttcttc	cgcgtctgcc	ttaagcactt	ccagcggctc	540
gtctcgcgcc	gacctcgcac	cttcggggacc	gtctccacgc	cggtaftggg	caccaactcc	600
ttcgtctgct	gggaagacag	tagcggcggg	gggcgaacc	ctctccaaat	gcccctcaat	660
ttcaactggc	egggtacctt	ctcctcact	atcgaagctt	ggcaecgcgc	aggagaccac	720
ctgagggccag	aggcctttgc	accagatgca	ctcactcagca	agatcgcct	ccagggctcc	780
ctagctgtgg	gtcagaactg	gttattggat	gagcaaacca	gcacctcac	aagctcgc	840
tactcttacc	gggtcactct	cagtgaaca	tactatggag	acaactgctc	cgcctgtgc	900
aagaagcgea	atgaccactt	eggccactat	gtgtgccagc	cagatggcaa	cttgcctcgc	960
ctgcccgggtt	ggactgggga	afattgccaa	cagcctatct	gtctttcggg	ctgtcatgaa	1020
cagaatggct	actgcagcaa	gccagcagag	tgctctgcc	gcccaggctg	gcaggggcgg	1080
ctgtgtaacg	aatgcctacc	ccacaatgga	tgtegcacg	gcacctgcag	cactccctgg	1140
caatgtactt	gtgatgaggg	ctggggagge	ctgttttgg	accaagatct	caactactgc	1200
accacccact	ccccatgcaa	gnaatgggga	actgtctcca	acagtgggca	gcgaagctac	1260
acctgcaact	gtgcccagg	ctacactgg	gtggactgtg	aggctggact	cagcaggtgt	1320
gacagcaacc	ccctgtgcac	tggaggcagc	tgtaaggacc	aggaggatgg	ctaccactgc	1380
ctgtgtctct	egggtactta	tggcctgcct	tgtaaacaca	gcaccttgag	ctgcccgcac	1440
ttcccctgct	tcaatggggg	ctctctgcgg	gagcgcgaacc	agggggccaa	ctatgcttgt	1500
gaattgcccc	ccaacttca	eggctccaac	tgcgagaaga	aagttggacag	gtgcaccagc	1560
aaacctctgt	ccaacggggg	acagtgcctg	aaccgaggtc	caagccgcct	gtgcctctgc	1620
cgctctggat	tcaagggcac	ctactgtgaa	ctccacgctc	gcgactgtgc	ccgtaacctt	1680
tgcgcccacg	gtggcaactg	ccatgacctg	gagaatgggc	tcaatgtcac	ctgcccctgc	1740
ggctctctct	ggcagcctg	tgaggctggc	acatccatcg	atcctctgtc	ctcgagctcc	1800
tgcctcaaca	gggcaccctg	ctacaccgac	ctctccacag	acacctttgt	gtgcaactgc	1860
cccttatgct	ttgtgggcag	ccctgctgag	ttcccctgtg	gcttgcgcgc	cagcttcccc	1920
tggttggccc	ctctcctggg	tggtggcctg	gcagtctctc	tggtaactgt	gggcatgggt	1980
gcagtggctg	tggcgcactg	gcggcttcca	cggccggacg	acggcagcag	ggaaagccatg	2040
aaacaacttgt	eggacttcca	gaaggacaac	ctgattctctg	cccgccagct	taaaaacaca	2100
aaecagaaga	aggagctgga	agtggactgt	ggcctggaca	agtcacaactg	tggcaaacag	2160
caaaaccaca	catlggacta	taactctggc	ccagggcccc	tggggcgggg	gaccatgcca	2220
ggaaagttc	cccacaglga	caagagctta	ggagagaagg	cgcacttgcg	gttacacagt	2280
gaaaagccag	agttgtggat	atcagcgata	tgctcccaca	gggactccat	gtaccagtct	2340
gtgtgtttga	tatcagagga	gaggaaigaa	tggtctattg	ccacggaggt	ataagccagg	2400
agcttaactg	gaactcctg	ctcagccccg	eggctggacc	ttccttctgc	atgttttaca	2460
ttgcactcct	gatgggacgt	tttcaatatg	caactgtctg	ctctcaggag	gaggagggaa	2520
tggcaggaac	cggcacagct	gtgaacttgc	caagagatgc	aatacccttc	cacacctttg	2580
gggtctctgt	tggcatcaga	ltggcagctg	cacaaccagc	aggaaacagaa	gagaagagag	2640
atgccactgg	gcaetgccc	gccagtagtg	gcttccaggg	ggctccttcc	gggctccgg	2700
ccgtttttcc	agagagagtg	gcagtagccc	catggggccc	ggagctgtctg	tggctccac	2760
tggcatccgt	gtttccaaaa	gtgctttgg	cccagctcc	acggcgacag	ttggcccaca	2820
atcagaagag	agagagggg	ccaatgagg	cagggcctcc	tgtagggctg	aaaaccactg	2880
ggctgcctct	ttgcctgggt	ttgcccctga	ggtagggta	gtgctcagag	gaggggagtg	2940
ctttctgccc	catgcttcca	actactglat	gcaggcctgg	ctctctggct	taggcccctt	3000
ggcacaagaat	gtcctgtlac	ccggcttcca	ccacctctg	gcccctggct	ctgtgaagca	3060
gacaggcaga	gggcttgc	ctcccaccag	ccaagggtgc	cagggctaac	tggggcactc	3120
agggcagtg	gttggaaatt	ccactgaggg	ggaaatcagg	tgcctggccc	gcttgggccc	3180
tttctcctct	caagcccact	ctccacaact	cgagccctgg	ctctgttcca	ctactgcccc	3240
agaccacctt	caagctgg	cttcagaaat	caataatag	agtttttatt	ttgtttttt	3300
ttttttttt	gtagtttatt	tiggagteta	gtatttcaat	aatttaagaa	tcagaagcac	3360
tgaectttct	acattttata	acattatttt	gtatataatg	tgtatttata	atataaaca	3420

[0006]

<210> 8
<211> 685
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Met	Ala	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Ala	Ser	Gly	Trp	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Val	Ala	Leu	Trp	Gln	Gln	Arg	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Val	Phe	Gln	Leu
				20					25					30	
Gln	Leu	Gln	Glu	Phe	Ile	Asn	Glu	Arg	Gly	Val	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg
				35				40					45		
Pro	Cys	Glu	Pro	Gly	Cys	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Val	Cys	Leu	Lys	His

50 Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser
 65 Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser
 85 Gly Gly Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp Pro
 100 Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Trp His Ala Pro Gly Asp Asp
 115 Leu Arg Pro Glu Ala Leu Pro Pro Asp Ala Leu Ile Ser Lys Ile Ala
 130 Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Glu Asn Trp Leu Leu Asp Glu Gln
 145 Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys Ser
 165 Asp Asn Tyr Tyr Gly Asp Asn Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg Asn
 180 Asp His Phe Gly His Tyr Val Cys Gln Pro Asp Gly Asn Leu Ser Cys
 195 Leu Pro Gly Trp Thr Gly Glu Tyr Cys Gln Gln Pro Ile Cys Leu Ser
 210 Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Ala Glu Cys Leu
 225 Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro His
 245 Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Thr Pro Trp Gln Cys Thr Cys
 260 Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr Cys
 275 Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ala Thr Cys Ser Asn Ser Gly
 290 Gln Arg Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Arg Pro Gly Tyr Thr Gly Val Asp
 305 Cys Glu Leu Glu Leu Ser Glu Cys Asp Ser Asn Pro Cys Arg Asn Gly
 325 Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asp Gly Tyr His Cys Leu Cys Pro Pro
 340 Gly Tyr Tyr Gly Leu His Cys Glu His Ser Thr Leu Ser Cys Ala Asp
 355 Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly Ala
 370 Asn Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe Thr Gly Ser Asn Cys Glu
 385 Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln
 405 Cys Leu Asn Arg Gly Pro Ser Arg Met Cys Arg Cys Arg Pro Gly Phe
 420 Thr Gly Thr Tyr Cys Glu Leu His Val Ser Asp Cys Ala Arg Asn Pro
 435 Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Leu Met Cys
 450 Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Thr Ser
 465 Ile Asp Ala Cys Ala Ser Ser Pro Cys Phe Asn Arg Ala Thr Cys Tyr
 485 Thr Asp Leu Ser Thr Asp Thr Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly Phe
 500 Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe Pro
 515 Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Ala Val Leu Leu Val Leu
 530 Leu Gly Met Val Ala Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg Pro
 545 Asp Asp Gly Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln Lys
 565 Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys Lys
 580 Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys Gln
 595 Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Pro Leu Gly Arg
 610 Gly Thr Met Pro Gly Lys Phe Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly Glu
 625 Lys Ala Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile Ser
 645 655

[0007]

Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Gln Ser Val Cys Leu Ile
 660 665 670
 Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
 675 680 685

<210> 9
 <211> 3451
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 9

atataagaaa	ggctctggag	caagcagggtt	tcagtagegg	cgeitgeicg	aggctaggaa	60
cccaggagcca	agagctgcag	ccaaagtcaac	ttgggtgcag	tgtactccct	cactageccg	120
ctcagagacc	taggatttgc	iccaggacac	gtacttagag	cagccaccgc	ccagtcgcc	180
tcacctggat	tacctacega	ggcctcagc	agcggagt	ttgagaagc	gacaaggagg	240
cagctgccg	aggggaatca	gcttttcagg	aacteggtc	gcagacggga	cttgcgggag	300
agcgacatcc	ctaacaagca	gattcggagt	cccggagtgg	agaggacacc	ccaagggatg	360
acgectgcgt	cccgagagcc	ctgctcctgg	gcctctctgc	tgtctggcgt	actgtggccg	420
cagcagcgcg	ctgcgggctc	cggcactctc	cagctcggc	tgcaggagt	cttcaaccag	480
cgcggtagc	tggccaatgg	gcagctcctc	gaaccgggct	gcccggact	cttccgcate	540
tgcctiaagc	acttccagge	aaectctctc	gagggacct	gcaectttgg	caatgtctcc	600
acgcccggat	tgggaccaca	ctcctctctc	gtcagggaca	agaatagcgg	cagtgtctgc	660
aaectctctc	agttgccctt	caatttcaac	tggccgggaa	cttctcaact	caacatccaa	720
gcttggcaca	caaccgggaga	cgacctcggg	ccagagactt	cgccaggaaa	ctctctctate	780
agccaaatca	tcactcaagg	ctctctctct	gtgggtaaga	tttggcgaac	agacagcaca	840
aatgacaccc	tcaccagact	gagctactct	taccgggtca	ctctcagtg	caactactat	900
ggagagagct	gttctctctc	atgcaagaag	cgcgatgacc	acttccggca	ttatgagtgc	960
cagccagatg	gcagctctct	ctgctctctc	ggctggactg	ggaagtactg	tgaccagcct	1020
atatgtctct	ctggctctca	tgagcagaat	ggttacttca	gcaagccaga	tgagtgcate	1080
tgcctctcag	gttggcaggg	tcgctctctc	aatgaatgta	ccccccaca	tgctctctct	1140
catggcacc	gcagctctct	ctggcagttg	gctctcagtg	agggatgggg	aggtctctct	1200
tgtgaccag	atctcaacta	ctgtactcaac	cactctctct	gcaagaatgg	atcaactgtg	1260
tccaacagtg	ggcccaaggg	ttatacctgc	acctgtctcc	caggtctcac	tggtgagcac	1320
tgtgagctgg	gactcagcaa	gtgtgcagc	aaacctctct	gaaatgggtg	cagctgtaag	1380
cagcagagaga	atagctacca	ctgctctctc	ccccaggct	actatggcca	gcactgtgag	1440
catagtacct	tgacctgcgc	ggactcaacc	tgtctcaatg	gggctctctg	ccgggagcgc	1500
aaaccagggt	ccagttatgc	ctgcgaatgc	cccccaact	ttaccggctc	taactgtgag	1560
aagaagatag	acaggtgtac	cagcaaccgg	tgtgccaatg	gagggcagtg	ccagaacaga	1620
ggtcacaagc	gaacctcccg	ctgcccctct	ggattcacag	gcaeccactg	tgaactgcac	1680
atcagcgatt	gtgcccgaag	tcctctctct	cacggggcca	cttgcacaga	tcgggagaat	1740
gggctctctg	gcacctgcgc	cgtctgctct	cttggaaagc	gctctcaggt	gggataaacc	1800
cacgatgcct	gtgctccgg	acctgctctc	aatggggcca	ctctctcaac	tgccctctcc	1860
ccaaacaact	tcgtctgcaa	ctgtctctct	ggcttctctg	gcagccctct	cgagttctcc	1920
gtggctctct	caccagctct	ccccctctct	gctctctctc	tgggctctctg	gctagtggtc	1980
ctgctggtgc	tcctgtgcat	ggtggttagt	gctgtctctc	agctcggct	tcggaggccc	2040
gatgacgaga	gcagcgaagc	catgaacaat	ctgtcagact	tcagagaagga	caacctaatc	2100
cttgcgcgcc	agctcaaaaa	caaaaccag	aagaaggagc	tggaaagtga	ctgtggtctg	2160
gacaaagcca	attgtgcaaa	actgcagaac	cacacattgg	actacaactc	agccccggga	2220
ctcttaggac	ggggcggcat	gcttgggaag	tatctcaaca	gtgacaagag	cttaggagag	2280
aaagtgcacc	tctggttaca	cagtgagaag	ccagagtctc	gaatctcagc	caattgtctc	2340
cccaggagct	ctatgtacca	atcagtgtgt	ttgatctcag	aagagaggaa	cgagtgtgtg	2400
attgccacag	aggtataagg	caggagctca	ctcagacacc	cagctccggc	ccagcagctg	2460
ggcctctctt	ctgcaattgt	tacattgcat	ctgtatggg	acatctttag	tatgcacagt	2520
gctgctctgc	ggaggaggag	gaaatggcat	gaactgaaca	gactgtgaac	ccgccaagag	2580
tcgcaaccgc	ctctcaccac	tcaggagctc	tgcctggctt	cagatgggca	gccccccaa	2640
gggaacagag	ttgaggagtt	agaggagcat	cagttgagct	gatatctaa	gtgctctctg	2700
aaectggact	tgccttgcga	acagtggctc	tcattggact	cttgactgtt	ctccagagag	2760
tggcagctgc	ctagtggtg	cttggcctct	ctgtagctcc	tgtggcctc	tgtatttcca	2820
aagtgccttt	gcccagactc	catctcaca	gctgggcca	aatgagaag	cagagaggag	2880
gcttgcgaag	gataggcctc	ccgcagcag	aacagctctg	gagtttggca	ttaaagcaga	2940
gtactctctc	aggtgaggaa	agcccagga	ggggacactg	gtgactctct	cttccaacce	3000
cagtaggtgg	agtgccacct	gtagctctca	ggaagagtt	ggctctctcc	ctggctctgg	3060
tgcctctctg	ctcatgtgaa	cagatggctt	tagggcagcc	cccttttgc	agccagggtg	3120
acaggcctca	ctggggagct	cagggcctct	atgctaaact	ccccaaagg	gagatggggg	3180
gaagggggct	tggccttagg	ccctctctct	ctctcaacc	attcttgggc	ctttagcct	3240
gggctccacc	agtgccacct	gctgcccaga	gaccaacctt	gaagccgact	ttcaaaaate	3300
aataaatatga	ggttttgttt	tgtagtttat	tttggactct	agtattttga	taatttaaga	3360
atcagaagca	ctggccttct	tacattttat	aacattttat	tgtatataat	gtgtatttat	3420
aataatgaac	agatgtgtac	aggaatttat	t			3451

[0008]

<210> 10
 <211> 686
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 10
 Met Thr Pro Ala Ser Arg Ser Ala Cys Arg Trp Ala Leu Leu Leu Leu
 I 5 10 15
 Ala Val Leu Trp Pro Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Ile Phe Gln
 20 25 30
 Leu Arg Leu Gln Glu Phe Val Asn Gln Arg Gly Met Leu Ala Asn Gly
 35 40 45
 Glu Ser Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Ile Cys Leu Lys
 50 55 60
 His Phe Gln Ala Thr Phe Ser Glu Gly Pro Cys Thr Phe Gly Asn Val
 65 70 75 80
 Ser Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Val Val Arg Asp Lys Asn
 85 90 95
 Ser Gly Ser Gly Arg Asn Pro Leu Gln Leu Pro Phe Asn Phe Thr Trp
 100 105 110
 Pro Gly Thr Phe Ser Leu Asn Ile Gln Ala Trp His Thr Pro Gly Asp
 115 120 125
 Asp Leu Arg Pro Glu Thr Ser Pro Gly Asn Ser Leu Ile Ser Gln Ile
 130 135 140
 Ile Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Lys Ile Trp Arg Thr Asp Glu
 145 150 155 160
 Gln Asn Asp Thr Leu Thr Arg Leu Ser Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys
 165 170 175
 Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Glu Ser Cys Ser Arg Leu Cys Lys Lys Arg
 180 185 190
 Asp Asp His Phe Gly His Tyr Glu Cys Gln Pro Asp Gly Ser Leu Ser
 195 200 205
 Cys Leu Pro Gly Trp Thr Gly Lys Tyr Cys Asp Gln Pro Ile Cys Leu
 210 215 220
 Ser Gly Cys His Glu Gln Asn Gly Tyr Cys Ser Lys Pro Asp Glu Cys
 225 230 235 240
 Ile Cys Arg Pro Gly Trp Gln Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ile Pro
 245 250 255
 His Asn Gly Cys Arg His Gly Thr Cys Ser Ile Pro Trp Gln Cys Ala
 260 265 270
 Cys Asp Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asp Gln Asp Leu Asn Tyr
 275 280 285
 [0009] Cys Thr His His Ser Pro Cys Lys Asn Gly Ser Thr Cys Ser Asn Ser
 290 295 300
 Gly Pro Lys Gly Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Pro Gly Tyr Thr Gly Glu
 305 310 315 320
 His Cys Glu Leu Gly Leu Ser Lys Cys Ala Ser Asn Pro Cys Arg Asn
 325 330 335
 Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Glu Asn Ser Tyr His Cys Leu Cys Pro
 340 345 350
 Pro Gly Tyr Tyr Gly Gln His Cys Glu His Ser Thr Leu Thr Cys Ala
 355 360 365
 Asp Ser Pro Cys Phe Asn Gly Gly Ser Cys Arg Glu Arg Asn Gln Gly
 370 375 380
 Ser Ser Tyr Ala Cys Glu Cys Pro Pro Asn Phe Thr Gly Ser Asn Cys
 385 390 395 400
 Glu Lys Lys Val Asp Arg Cys Thr Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly
 405 410 415
 Gln Cys Gln Asn Arg Gly Pro Ser Arg Thr Cys Arg Cys Arg Pro Gly
 420 425 430
 Phe Thr Gly Thr His Cys Glu Leu His Ile Ser Asp Cys Ala Arg Ser
 435 440 445
 Pro Cys Ala His Gly Gly Thr Cys His Asp Leu Glu Asn Gly Pro Val
 450 455 460
 Cys Thr Cys Pro Ala Gly Phe Ser Gly Arg Arg Cys Glu Val Arg Ile
 465 470 475 480
 Thr His Asp Ala Cys Ala Ser Gly Pro Cys Phe Asn Gly Ala Thr Cys
 485 490 495
 Tyr Thr Gly Leu Ser Pro Asn Asn Phe Val Cys Asn Cys Pro Tyr Gly
 500 505 510
 Phe Val Gly Ser Arg Cys Glu Phe Pro Val Gly Leu Pro Pro Ser Phe
 515 520 525
 Pro Trp Val Ala Val Ser Leu Gly Val Gly Leu Val Val Leu Leu Val
 530 535 540
 Leu Leu Val Met Val Val Ala Val Arg Gln Leu Arg Leu Arg Arg
 545 550 555 560
 Pro Asp Asp Glu Ser Arg Glu Ala Met Asn Asn Leu Ser Asp Phe Gln
 565 570 575
 Lys Asp Asn Leu Ile Pro Ala Ala Gln Leu Lys Asn Thr Asn Gln Lys
 580 585 590

Lys Glu Leu Glu Val Asp Cys Gly Leu Asp Lys Ser Asn Cys Gly Lys
 595 600 605
 Leu Gln Asn His Thr Leu Asp Tyr Asn Leu Ala Pro Gly Leu Leu Gly
 610 615 620
 Arg Gly Gly Met Pro Gly Lys Tyr Pro His Ser Asp Lys Ser Leu Gly
 625 630 635 640
 Glu Lys Val Pro Leu Arg Leu His Ser Glu Lys Pro Glu Cys Arg Ile
 645 650 655
 Ser Ala Ile Cys Ser Pro Arg Asp Ser Met Tyr Glu Ser Val Cys Leu
 660 665 670
 Ile Ser Glu Glu Arg Asn Glu Cys Val Ile Ala Thr Glu Val
 675 680 685

<210> 11
 <211> 2977
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 11

```

agctggggata agggattcaa ggcagcgccc acacccgggg gctctccgca acccgaccgc 60
ctgtccgctc ccccacttcc cgcctccctt cccaactact caticacca ccccccacc 120
cagagccggg acggcagccc aggcgcggcg gccccgcctt ctctctccgc cgaaccctgga 180
cttctcttgg ctgcaggacc cggcttccac gtgtgtcccg gagecggcgt ctcaaacac 240
gtcccgctcc gggectgggt gctacagca gccagagcag cagggagtcc gggaccgggg 300
cggcattctg gccaaattag gcgcgcgcca ggcagcgcct gaacgctcc agggccggag 360
gagcgcgggg gcgtccgggt ctgagcgcga gcaaatgggc tccgacgtgc gggaccctgaa 420
cgcctctgtc ccccgctcc cctccctggg tggcggcggc ggcctgtgccc tgcctgtgag 480
cggcgcggcg cagltgggcg cggltctgga ctttgcgccc cggggcgtt cggcttacgg 540
gtcgttgggg ggcgccgcgc cgcacccggc tccgcgcgca cccccgcgc cgcgcctca 600
ctctcttacc aaacaggagg cagcttgggg cggcggcgag ccgcacgagg agcagtgctt 660
gagcgccttc acgttccact ttccggcca gttcactggc acagcgggag cctgtccta 720
cgggcccctc ggctctctc cgcacgcca ggcgtcacc ggcaggcca ggtgttctc 780
taacgcgccc taccctgcca gctgctcga gagccagccc gctattcga atcagggtta 840
cagcagcttc accttcgac ggaagcccag ctacggctac agccctctc accatgcgga 900
gcagcttccc aacctctat tcaagctga ggttccatg ggcagcagg gctcgtggg 960
tgagcagcag tactcgggtc cgcctccggg ctatggctc cacacccca ccgacagctg 1020
caccgcgagc caggttttgc tctgtaggag gccctacagc agtgacaatt tataccaat 1080
gacatccagc ctggaatgca tgacctggaa tcatatgaa ttaggagca ccttaaaggg 1140
ccacagcaca gsgtacgaga gcaaaccca cacaacgcc atctctctg gagcccaata 1200
cagaatacac acgcacgggt tcttcagagg caticaggat gtgcagctg tgcctggagt 1260
agccccact ctgttaccgt cggcatttga gaccagtgag aaacgccct tcatgtgtgc 1320
ttaccagcgc tgcataaaga gatattitaa gctgtcccac ttacagatgc acagcaggaa 1380
gcacactggt gagaaacct accagltgta cttaaggac tgtgaacgaa ggtttctcg 1440
ttcagaccag ctcaaaagac accaaaggag acatacaggt gtgaaacct tccagtgtaa 1500
aacctgtcag cgaagtctt cccggtccga ccacctgaag acccaacca ggactatac 1560
aggtgaaaag ccttcagct gtcgggtgccc aagttgtcag aaaaagttt cccggtcaga 1620
tgaattagtc cgcctacaca acatgcatca gagaacatg accaaactc agctggcgt 1680
ttgagggtgc tccctgggg accgttcagt gtcccaggca gcacagtggt tgaactgctt 1740
tcaagtctga ctctccact clectcaeta aaaaggaac ttcagttgat ctcttctc 1800
caacttccaa gacaagatac cgttgcctt ggaactacc aggtgtgctt ggaagattg 1860
gtctctgccc tgcctacttt tagttgact acagggcctg gagaagcagc taacaatgtc 1920
tggttagtta aaagcccatt gccatttggg gtggatttcc tactgtaaga agagccatag 1980
ctgatcatgt cccccgacc ctcccttct tttttatgc tctgttctgc tgggatgga 2040
attatgttac cttttctat catggaatat ttataggcca gggeatgtgt atgtgtctgc 2100
taatgtaac ttgtcatgg ttccattta ctaacagcaa cagcaagaaa taatcagag 2160
agcaaggeat cgggggtgaa tctgtctaa catcccgag gtcagccagg ctgctaacct 2220
ggaaagcagg atgtagttc gccagccaac ttttaaagct catgcatttc aagcagctga 2280
agaaaaaatc agaactaac agtacctctg tatagaaatc faaaagaatt ttaccattca 2340
gttaaitcaa tgtgaacct ggcacactgc tcttaagaaa ctatgaagat ctgagatctt 2400
tttgtgtatg tttttgactc ttttgagtgg taatcatatg tgtcttata gatgtacata 2460
cctccttgca caaatggagg ggaattcatt ttcactctg ggagtgctct tagtgtataa 2520
aaacctgct ggtatatggt tcaagtgtt aaaaatgaaa gtagctttaa aagaaaatag 2580
gggatggctc aggatctcca ctgataagac tgtttttaag taacttaagg accttgggt 2640
ctacaagtat atgtgaaaaa aatgagacti actgggtgag gaaatccatt gtttaaagat 2700
ggctgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt tgtgtgttt tgttttttaa 2760
gggagggaaat ttattattta cgttgcctg aaattactgt gtaaatatata gctctgataat 2820
gatttgcctt ttgacaacta aaattaggac tgtataagta ctagatgeat cactgggtgt 2880
tgaatttaca agatattgat gatacaactt aaaaatgtaa cctgcatttt tcaacttgc 2940
ctcaaittaa gctatttcaa aaggaaaaaa aaaaaaa 2977

```

[0010]

<210> 12
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 12
 Met Gln Asp Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu Pro Ala Ser Gln His
 1 5 10 15
 Thr Leu Arg Ser Gly Pro Gly Cys Leu Gln Gln Pro Glu Gln Gly
 20 25 30
 Val Arg Asp Pro Gly Gly Ile Trp Ala Lys Leu Gly Ala Ala Glu Ala
 35 40 45
 Ser Ala Gln Arg Leu Gln Gly Arg Arg Ser Arg Gly Ala Ser Gly Ser
 50 55 60
 Glu Pro Gln Gln Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu
 65 70 75 80
 Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val
 85 90 95
 Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly
 100 105 110
 Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro
 115 120 125
 Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro
 130 135 140
 Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe
 145 150 155 160
 Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg
 165 170 175
 Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln
 180 185 190
 Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser
 195 200 205
 Glu Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly
 210 215 220
 Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Glu Phe Pro
 225 230 235 240
 Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu
 245 250 255
 Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr
 260 265 270
 Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro
 275 280 285
 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met
 290 295 300
 Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly His Ser Thr
 305 310 315 320
 Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln
 325 330 335
 Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg
 340 345 350
 Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr
 355 360 365
 Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg
 370 375 380
 Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly
 385 390 395 400
 Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser
 405 410 415
 Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys
 420 425 430
 Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His
 435 440 445
 Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 450 455 460
 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 465 470 475 480
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
 485 490 495
 Leu

[0011]

<210> 13
 <211> 3028
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 13
 agctggggta aggagttaa ggcagcgcgc acacccegggg gctctccgca acccgaccgc 60
 ctgtccgcct ccccacttcc cgccttccct cccacctact cattcaacca cccaaccacc 120
 cagagccggg accgcagccc aggcgccegg gcccccgcgt ctctctcccg egatcctgga 180

```

ettectettg ctgcaggacc eggttccac gtgtgtcccg gagccggcgt ctacgacac 240
getecgtcc gggcctgggt gccacagca gccagagcag cagggagtc gggaccggg 300
cggcctctgg gccaaagttag gcgccccga gccagcgcct gaacgtctcc agggccggag 360
gagcccgagg gcgtccgggt ctgagccga gcaaatgggc tccgacgtgc gggacctgaa 420
cggcctctgt cccgcctgcc cctcccggg tggcggcggc ggcigtgccc tgcctgtgag 480
cggcggcgcg cagtggggcg cgggtctgga ctttgcgcc cggggcgtt cggcttacgg 540
gtcgttgggc ggccccgcgc cggcaccggc tcgccgccca cccccgcgc cgcgccctca 600
ctccttcaic aaacaggagc cgagctgggg cggcggagg ccgcaagagg agcagtgccf 660
gagcgccttc actgtccact ttcccggca gttcactggc acagccggag cctgtcgtca 720
cgggccccct ggctctctct cggccagcca ggcgtcctcc ggccaggcca ggatgtttcc 780
taacggcgccc taccctgccc gcctgcctga gagccagccc gctatttcca atcagggtta 840
cagcacggtc acctctgacg ggaecgccag ctacggtcac accccctcgc accatggcgc 900
gcagttcccc aaccactcat tcaagcatga ggatcccctg ggccagcagg gctcgtctggg 960
tgagcagcag factcgggtgc cggccccggc ctatggctgc cacaccceca ccgacagctg 1020
caccggcagc caggttttgc tctgaggac gccctacagc agtgacaatt tataccaaat 1080
gacctccrag ctgtaatgca tgcctggaa tcaagatgaa ttaggagcca cctaaaggag 1140
agtgtctgct gggagctcca gctcagtgaa atggacagaa gggcagagca accacagcac 1200
agggtacgag agcgataacc acacaacgcc cactctctgc ggagcccaat acagaataca 1260
cacgcacggc gcttccagag gcattccagg tgtgcgaagt tgtccggag tgcctggag 1320
cttctgtacc tggcctctgc agaccagtga gaaaagcccc tctatgtgtg cttaccaggg 1380
ctgcaataag agatatttta agctgtccca cttacagatg cacagcagga agcacactgg 1440
tgagaaacca taccagtgct acttcaagga ctgtgaacga aggttttctc gttcagacca 1500
ctcacaanaa caccaaagga gacatcacgg tgtgaaacca ttccagtgta aaacttctca 1560
gcgaaagctc tcccgctccg accacctgaa gaccacaccc aggcactata caggtgaaaa 1620
gcccttcagc tgcctggggc caagtgtgca gaaaaagttt gcccggtcag atgaattagt 1680
cgcctcagcc aacatgcatc agagaaacat gaccaaactc cagctggcgc tttgaggggt 1740
ctcccctggg gaccttccag tctcccagge agcacagttg gtgaaactgc itcaagctg 1800
actctccact cctctcactc aaaaaggaaa cttcagttga tcttctctca ccaacttcca 1860
agaaagata cegggtcttc tggaaactac caggtgtgccc tggaaagatt ggctctctgc 1920
ctgctactct ttagtgtact cacaggccct ggagaagcag ctaacaatgt ctggttagtt 1980
aaaagcccct tgcatttggg tgtggatttt ctactgtaag aagagccata gctgatcatg 2040
tcccctgac ccttcccttc ttttttatg ctcgttttcc ctggggatgg aattattgta 2100
cctttticta tcatggaata tttatagccc agggcatgtg tatgtgtctg ctaatgtaaa 2160
ctttgctatg gtttccattt actaacagca acagcaagaa ataaatcaga gagcaaggca 2220
tcgggggtga atcttctcta acattcccga ggtaagccag gctctaaccc tggaaagcag 2280
galgtagtct tgcaggcaca ctttlaaagg tcatgcattt caagcagctg aagaaaaaat 2340
cagaaactaac cagtacctct gtatagaaat ctaaaagaat tttacccttc agttaattca 2400
atgtgaacac tggcaccctg ccttlaagaa actatgaaga tctgagattt ttttgtgat 2460
gtttttgact cttttgagtg gtaatcatal gtgtctttat agatgtacat acctccttgc 2520
acaaatggag gggaattcat tttcatcact gggagtgctc ttagtgtata aaaaccatgc 2580
tggatatagg cttcaagttg taaaaatgaa agtgacttta aaagaaaaata ggggatggtc 2640
caggatctcc actgataaga ctgtttttaa gtaacttaag gacctttggg tctacaagta 2700
tatgtgaaaa aatgagactc tactgggtga ggaatccat tgtttaaaga tggctcgtgtg 2760
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg gtgtgtgtgt ttttttttia agggagggaa 2820
tttattattt accgttgcct gaaattactg tgtaaatata tgtctgataa tgatttgcct 2880
tttgacaact aaaaatagga ctgtataagt actagatgca tcactgggtg ttgatcttac 2940
aagatattga tgataacact taaaatigta acctgcattt ttcactttgc tctcaattaa 3000
agtctattca aaaggaaaaa aaaaaaaa

```

[0012]

```

<210> 14
<211> 514
<212> PRT
<213> 智人

```

```

<400> 14
Met Gln Asp Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu Pro Ala Ser Gln His
1 5 10 15
Thr Leu Arg Ser Gly Pro Gly Cys Leu Gln Gln Pro Glu Gln Gln Gly
20 25 30
Val Arg Asp Pro Gly Gly Ile Trp Ala Lys Leu Gly Ala Ala Glu Ala
35 40 45
Ser Ala Glu Arg Leu Gln Gly Arg Arg Ser Arg Gly Ala Ser Gly Ser
50 55 60
Glu Pro Gln Gln Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu
65 70 75 80
Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val
85 90 95
Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly
100 105 110
Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro
115 120 125
Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro
130 135 140
Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe
145 150 155 160

```


Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg
 165 170 175
 Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln
 180 185 190
 Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser
 195 200 205
 Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly
 210 215 220
 Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro
 225 230 235 240
 Asn His Ser Phe Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu
 245 250 255
 Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr
 260 265 270
 Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro
 275 280 285
 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met
 290 295 300
 Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala
 305 310 315 320
 Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser
 325 330 335
 Thr Gly Tyr Glu Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala
 340 345 350
 Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val
 355 360 365
 Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Gln
 370 375 380
 Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys
 385 390 395 400
 Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr
 405 410 415
 Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe
 420 425 430
 Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val
 435 440 445
 Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp
 450 455 460
 His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser
 465 470 475 480
 Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu
 485 490 495
 Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu
 500 505 510
 Ala Leu

[0013]

<210> 15
 <211> 3037
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 15
 agctggggta aggagttaa ggcagcgcgc acaccggggc gctctccgca acccgaccgc 60
 ctgtccgctc ccccacttcc cgcctccctt cccacctact caticaccca cccaccacc 120
 cagagccggg acggcagccc aggcgcccgg gcccccgcgt ctctctcgcg cgatcctgga 180
 ctctctcttg ctgcaggacc cggcttcac gtgtgtcccg gaccggcgt ctacagcaac 240
 gctccgctcc ggccctgggt goctacagea gccagagcag cagggagtcg gggaccggg 300
 cggcatctgg gccaaagttag gcgccccga ggccagcgt gaacgtctcc agggccggag 360
 gaccgcgggg ggcctccgggt ctgagccgca gcaaatgggc tccagcgtgc gggacctgaa 420
 cgcgctgtct cccgcgctcc ctctccctgg tggcggcggc ggtgtgtccc tgcctgtgag 480
 cgccgcccgg cagtgggcgc cgggtctgga ctctgcgcc cgggcgctt cggtctagg 540
 gtcgttgggc ggccccgcgc cggcaccggc tccgcgcgca cccccgcgc cggccctca 600
 ctctcttcac aaacaggagc cgagctgggg cggcgcggag ccgcacgagg agcagtgctt 660
 gagegccttc actgtccact ttccggcca gttcacggc acagccggag cctgtcgeta 720
 cggcccttc ggctctctc cggccageca ggcgtcctc ggccaggcca gcatgtttcc 780
 taacgcgccc tacctgccc getgctega gaccagccc gctatctgca atcagggtta 840
 cagcacggtc accttcgac ggacgccag ctacggtcac acgcccctgc acctgcccg 900
 cgaattcccc aaccactcat tcaageatga ggatcccatg ggccagcagg gctcgtggg 960
 tgagcagcag factcgggtc cggcccgggt ctatggctgc cacaccccca ccgacagctg 1020
 caccggcagc caggctttgc tgetgaggac gccctacagc agtgacaatt tataccaaat 1080
 gacatcccag cttagaatga tgacctgga tcagatgaac ttaggagcca ccttaaaggg 1140
 agttgctgct gggagctca gctcagtgaa atggacagaa ggccagagca accacagcac 1200
 agggtaegag agcgataacc acacaacgc cctctctgca ggagcccaat acagaataca 1260
 caccacaggt gtcttcagag geattcagga tgtgcagct gtgcttgag tagccccgac 1320

```

icttgtacgg tcggcactcg agaccagtga gaaacgcccc ttcattgtgtg cttaccacagg 1380
ctgcaataag agatatttta agctgtccca cttacagatg cacagcagga agcacactgg 1440
tgagaanacca taccagtgtg acttcaagga ctgtgaacga aggtttttctc gttcagacca 1500
gcctaaaaga caccaaaagga gacatacagg tgtgaancca ttcacagtga aaactgtgca 1560
gcgaaaagttc tcccgggtccg accacctgaa gacccacacc aggaactata caggtaaaac 1620
aagtgaanaag cccttcagct gtcgggtgccc aagttgtcag aaaaagtftg cccggtcaga 1680
tgaattagtc cggcaccaca acatgeatca gagaacaatg accaaaactcc agctggcgct 1740
ttgagggggtc tcccctggggg accgttcagt gtcccaggca gcacagtgtg tgaactgctt 1800
tcaagtcctga ctctccactc ctctcacta aaaaggaaac ttcagtigtat cttcttctac 1860
caacttccaa gacaagatcc cgggtctctc ggaactacc aggtgtgctt ggaagagttg 1920
gtctctgccc tgcctacttt tagttgactc acaggcccc gagaagcagc taacaatgtc 1980
tggttagtta aaagcccatt gccatttggg gggattttc tactgtaaga agagccatag 2040
ctgcatctgt ccccctgacc ctctccctct ttttttatgc tctgtttcgc tggggatgga 2100
attattgtac cattttctat catggaatat ttataggcca gggcatgtgt atgtgtctgc 2160
taatgtaaac ttgtcactgg ttccatttta ctaacagcaa cagcaangaaa taaatcagag 2220
agcaaggcat cgggggtgaa tcttgtctaa catcccgag gtcagccagg ctgctaaccf 2280
ggaagcagg atgtagttct gccaggcaac ttttaagct catgcattc aagcagctga 2340
agaaaaate agaactaac agtacctctg tatagaaatc taaaagaatt ttaccattca 2400
gttaattcaa tgtgaacct gcacactgc tcttaagaaa ctatgaagat ctgagatttt 2460
tttgtgtatg tttttgactc ttttgagtgg taatecataig tctctttata gatgtacata 2520
ctctcttcca caaatggagg ggaattcatt ttcactactg ggagtgtcct tagtgtataa 2580
aaaccatget ggtatatgce ttcnagttgt aaaaatgaaa gtgactttaa aagaaaatag 2640
gggatggctc aggatctcca ctgataagac tgtttttaag taacttaagg accttgggt 2700
ctacaaglat atgtgaaaaa aatgagactt actgggtgag gaaatccatt gtttaagat 2760
ggctgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt tgttgtgttt tgttttttaa 2820
gggagggaaat ttattattta ccgttgcctg aaattactgt gtaaatatai gctgataat 2880
gatttgccti ttgacaacta aaattaggca tgtataagta ctgagtcat cactgggtgt 2940
tgatcttaca agatattgat gataacactt aaaatigtaa cctgcatttt tcactttgct 3000
ctcaattaaa gtctattcaa aaggaaaaaa aaaaaaa 3037

```

```

<210> 16
<211> 517
<212> PRT
<213> 智人

```

<400> 16

[0014]

```

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

```

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

<210> 17
 <211> 2438
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 17

[0015]

```

aggegettcc accaactgecc cteccggggg gacctgaagg agagggtttg aggeegglet      60
ttceccgecc aggtctgctg gtceggctcg ggaggaggec taggagggct cgegggcccac      120
gggatccctt gggeccagat tctggggtgc ggaaggacgt ctcgagagtg ggtgcccgca      180
ctcgggaccc accgcccctg cegggcacgg acagttgegg agcagggtct tgaggattgt      240
gcagtgccct gggtccctgc ctactcctgg gctcaggaat ggagaagggt tacagcacgg      300
tcaccttoga cgggacgecc agctacggtc acacgcctc gcaccatgcg ggcagttcc      360
ccaccactc attcaagcat gaggatccca tgggccagca ggcctcgtg ggtgagcagc      420
agtaacteggt gcgcccccg gctctatggt gccacacccc caccgacage tgcaccggca      480
gcaggecttt gctgctgagg acgcctaca gcagtgacaa ttatatacaa atgacatecc      540
agcttgaatg catgaactgg aatcagatga acttaggagc cacttaaaag ggccacagca      600
caggctacga gagcgataac cacacaacgc ccatectcig cggagcccaa tacagaatac      660
acacgcacgg tgccttcaga ggcattcagg atgtcgcagc tgtgcctgga gtagecccca      720
ctcttgttac gtcggcatct gagaccagtg agaaacgccc ctteatgtgt gcttaccacg      780
getgcaataa gagatatttt aagctgtccc acttacagat gcacagcagg aagcacactg      840
gtgagaaaac ataccagttg gacttcaagg actgtgaacg aaggttttct cgttcagacc      900
agctcaaaaag acaccaaaag agacatacag gltgtaaacc attccagttg aaaactttgc      960
agcgaagttt cteccggctc gaccacctga agaccacac caggactcat acaggtaaaa      1020
caagtgaaaa gcccttcage tgtcgggtgc caagttgtca gaanaagttt gcccggtcag      1080
atgaattagt ccgccatcac aacatgcate agagaaacat gaccaaaafc cagctggegc      1140
tttgagggtt cteccctggg gaccgttcag tgtcccaggc agcacagttg gtgaactgct      1200
ttcaagtctg actctccact cctctcact aaaaaggaaa cttcagttga tcttcttcat      1260
ccacttcca agacaagata ceggctcttc tggaaactac caggtgtgcc tggaaagatt      1320
ggctctgccc ctgectactt ttagttagct cacaggccct ggagaagcag ctaacnatgt      1380
ctggttagtt aaaaagccat tgcattttg tgtggatttt ctactgtaag aagagccata      1440
ctgatcatg tcccctgac ccttcccttc ttttttatg ctcgttttcg ctggggatgg      1500
aattattgta ccattttcta teatggaata tttatagccc agggcatgtg tatgtgtctg      1560
ctaattgtaa ctttgtcatg gtttccattt actaacagca acagcaagaa ataaatcaga      1620
gagcaagcca tgggggtgta atcttgtcta acattcccga ggteagccag gctgctaac      1680
tggaaagcag gatgtagttc tgcaggecaa cttttaaage tcatgcattt caagecagtg      1740
aagaaaaaat cagaactaac cagtacctct gtatagaaat ctaaaagaat tttaccattc      1800
agttaatca atgtgaacac tggcacactg ctcttaagaa actatgaaga tctgagaitt      1860
ttttgtgat gtttttgact cttttgagtg gtaatcatat gttcttttat agatgtacat      1920
acctccttgc acaaatggag gggaaattcat tttcactact gggagtgctc ttagtgtata      1980
aaaaccatgc tggatatagg ctccaagttg taaaaatgaa agtgacttta aaagaaaaata      2040
ggggatggtc caggatctcc actgataaga ctgtttttaa gtaacttaag gacctttggg      2100
ctacaagta fatgtgaaaa aaatgagact tac tgggtga ggaatccat tgtttaaaga      2160
tggctgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtt gttgtgtgtt tigtttttta      2220
agggagggaa tttattattt accgttgcct gaaattactg tgtaaatata tgtctgataa      2280
tgatttctct tttgacaact aaaattagga ctgtataagt actagatgca tcactgggtg      2340
ttgatcttac aagatattga tgataacact taaaattgta acctgcattt ttcactttgc      2400
tctcaattaa agtctattca aaaggaaaa aaaaaaaa      2438

```

<210> 18
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 18
 Met Glu Lys Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 1 5 10 15
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 20 25 30
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln
 35 40 45
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 50 55 60
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 65 70 75 80
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 85 90 95
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly His Ser Thr Gly Tyr Glu Ser
 100 105 110
 Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile His
 115 120 125
 Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro Gly
 130 135 140
 Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg
 145 150 155 160
 Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu
 165 170 175
 Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr
 180 185 190
 Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp Gln
 195 200 205
 Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys
 210 215 220
 Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr His
 225 230 235 240
 Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg
 245 250 255
 Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg
 260 265 270
 His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu
 275 280 285

[0016]

<210> 19
 <211> 2480
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 19
 aggcgcttcc accactgccc ctcccggggg gacctgaagg agagggtttg aggcgggtct 60
 ttgccgcgag aggtctgctg gtcgggtctg ggaggaggcc taggagggct cgcgggcccac 120
 gggcactcctt gggcccagat tctggggctg ggaecggact ctcgagagtg ggtgcccgca 180
 ctcgggaccc accggccctg cggggcaagg acagttgctg agcagggtct tgaggattgt 240
 cagtgccctt gggctccctg ctactctctg gctcaggaat ggagaagggt tacagcacgg 300
 tcaccttctg cgggaagccc agctacggtc acacgccctc gcaccatgag ggcagttcc 360
 ccaaccactc attcaagcat gaggatccca tgggccagca gggctctctg ggtgagcagc 420
 agtactcggg gccgcctccg gctctatggct gccacacccc caccgacagc tgcaccggca 480
 gccaggtttt gctgctgagg acgccctaca gcagtgacaa tttataccaa atgacatccc 540
 agcttgaatg catgaactgg aatcagatga acttaggagc cactttaaag ggagttgctg 600
 ctgggagetc cagctcagtg aaatggacag aagggcagag caaccacagc acagggtacg 660
 agagcgataa ccacacaac ccctactctt cgggagccca atacagaata cacacgcacg 720
 gtgtcttcag aggcattcag gatgtgcgac gtgtgcttgg agtagccccc actcttctac 780
 ggtcggcctc tgagaccagt gagaaacccc ccttcattgt tgettaccca ggctgcaata 840
 agagatattt taagetgtcc cacttacaga tgcacagcag gaagcacact ggtgagaaac 900
 cataccagtg tgacttcaag gactgtgaac gaagggtttc tegtteagac cagctcaaaa 960
 gacaccaaaq gagacataca ggtgtgaaac cttccagtg taaaacttgt cagcgaaagt 1020
 tctcccggtc cgaccacttg aagaccacac ccaggaccca tacaggtgaa aagcccttca 1080
 acacatgca tcagagaaac atgaccaaac tccagctggc agatgaatta gtccgccatc 1140
 gggaccgttc agtgctccag gcagcacagt gtgtgaactg ctttcaagtc tgactctcca 1200
 ctctctctca ctaaaaagga aacttcagtt gatctttctc atccaacttc caagacaaga 1260
 taccggtgct tctggaacct accaggtgtg cctggaagag ttggctctct cctgcctac 1320
 ttttagttag ctcaacggcc ctggagaagc agctaaacaat gctctggttag ttaaaagccc 1380
 attgccattt ggtgtggatt ttctactgta agaagagcca tagctgatea tgteccctg 1440
 1500

```

acccttccct tcttttttta tgcctgtttt cgcctgggat ggaattattg taccattttc 1560
tatcatggaa tatttatagg ccagggcgat tgtatgtgtc tgctaattga aactttgtca 1620
tggtttccat ttactaacag caacagcaag aaataaatca gagagcaagg catcgggggt 1680
gaatcttgtc taacattccc gaggtcagcc aggcctgetaa cctggaaagc aggatgtagt 1740
tctgccagge aacttttaaa getcatgcat tteaagcagc tgaagaaaaa atcagaacta 1800
accagtaacc cigtatagaa atctaaaaga attttaceat tcagtttaatt caatgtgaac 1860
actggcacac tgcctttaag aaacatagaa gatctagat ttttttgtgt atgtttttga 1920
ctcttttgag tggtaatcat atgtgtcttt atagatgtac atacctctct gcacaaatgg 1980
aggggaatcc attttccatc ctgggaggtt ccttagtgta taaaaacac gctggtalat 2040
ggcttcaagt tgtaaaaatg naagtgactt taaaagaaaa taggggatgg tccaggatct 2100
ccaactgata gactgttttt aagtaacctt aggacctttg ggcttacaag tataatgtgaa 2160
aaaaatgaga ctactgggt gaggaatcc attgtttaaa gaiggctgtg tgtgtgtgtg 2220
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg ttgtgtgtg tttgttttt taaggagagg aatttattat 2280
ttaccgttgc ttgaaattac tgtgtaataa tatgtctgat aatgatttgc tctttgacaa 2340
ctaaanttag gactgtataa gtactagatg caccactggg tgttgatctt acaagatatt 2400
gatgataaca cttaaaattg taaactgcat ttttaccttt gctctcaatt aaagctctatt 2460
caaaaggaag aaaaaaaaaa

```

<210> 20
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 20
Met Glu Lys Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 1 5 10 15
Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 20 25 30
Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 35 40 45
Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 50 55 60
Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 65 70 75 80
Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 85 90 95
Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 100 105 110
Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 115 120 125
Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 130 135 140
His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 145 150 155 160
Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Gln Thr Ser Gln Lys
 165 170 175
Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 180 185 190
Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 195 200 205
Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 210 215 220
Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 225 230 235 240
Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 245 250 255
His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro
 260 265 270
Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His His
 275 280 285
Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu
 290 295 300

```

[0017]

<210> 21
 <211> 3092
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

```

<400> 21
tgtgtgaatg gagcggccga gcactctggt tctctctct tccctgtctc eggccctct 60
tatttagct ttggaagct gggggcagcc aggcagctgg ggtaaggagt tcaaggcagc 120
gccacacccc ggggetctcc gcaaccgcac gcctctctct cctccccctt ccttttcccg 180
cctctctctc caccactca ttcaaccacc caccagaga gaggacggca gccaggaac 240
ccgggcccgc gcctctctcg ccggatctct ggacttctct ctgtctcagg agccggcttc 300
caegtgtgtc ccggagccgg cgtctcagca caegctctgc cgggagcccg ggtctctcca 360

```

```

gcagccggag caaccigggg accgaggccc cgggagcgcc tgggccaagt ccagcgccga 420
gaatcccgag gatcgcagga geggagaacc gtecgatcc gagecgcacc tcalggttc 480
cgagctggcg gacctgaacg cgcctgctgc cgtgtgtct tcgctggcgc gggcgggcg 540
cgcttgcggg ctccctgiga ggggcgcagc gcagtgggcg cccgtgttgg acttcgcgc 600
tcggggcgcc tcggcttacg ggctcctggg cggctcccg cctctcccg ctcgcgcgc 660
gctccgcgc ccaccccaact ccttcacaa acaggagccc agctggggcg ggcgcgagcc 720
acacgaggag cagtgccctga gcgccttcc cttgcacttc tggggccagt tcaccggtag 780
agccggggcc tgtcgtacg gacccttgg tctcccccg cccagccagg cgtcctcggg 840
ccagggcagg atgttcccca algcgcctc cctgcccagc tgcctggaga gccagcctac 900
catccgcaac caaggataca gcacggtag tttcgacggg gcccaccagt atggccacac 960
gcctctgcac cagcgggcgc agttcccaca ccattccttc aacaacaggg accccatggg 1020
ccagcagggc tcgctggggc agcagcagta ctccgtgcca cctccgggtg atgctgcca 1080
caccctact gacagttgca caggcagcca ggccctgctc ctgaggacgc ectacagcag 1140
tgacaattta taccaaatga cctcccagct tgaatgcatg acctggaatc agatgaacct 1200
aggagctacc ttaaagggaa ttgctgctgg gagctccagc tcagtgaatg ggacagaagg 1260
gcagagcaac cagggcacag ggtatgagag tgagaaccac accggcccca tctctgttgg 1320
tgccagtag agaatacaca cccacggggt ctccgagcgc attcaggatg tggcgctgt 1380
atctggagtg gcccacaact ttgtccggtc agratctgaa accagtgaga aacgtccttt 1440
catgtgtgca laaccaggct gcaataagag atattttaag ctgtcccact tacagatgca 1500
tagccggaag cacactggtg agaaaccata ccagtgtgac ttcaaggact gcgagagaag 1560
gtttctcgc lcagaccagc tcaaaagaca ccaaaaggaga cacacagggt tgaaccatt 1620
ccagtgtaaa acitgtcagc gaaagttttc cggctccgac catctgaaga cccacaccag 1680
gactcataca ggtaaaacaa gtgaaaagcc cttcagctgt cgggtggaca gttgtcagaa 1740
aaagtttgag cgtcagacg aattggtccg ccaacaaac atgcatacaga gaaacatgac 1800
caaacctccg ctggcctttt gagggttccg acacggagac agtccagcat cccaggeagg 1860
aaagtgtgca aactgtctcc aaatctgatt ttgaaatcc tcccactcac cttcaaaagg 1920
acacagctgt ggatctacat ccgacttcca agacagcaca ccgattgac tgcactctat 1980
caggtttgcc ggaaggagtc ggtgcctccg ccacttttga ttaactcaca ggcctgaaaa 2040
aagtgttca cgggtcttag aaagtcattt gctattgtct gaattttcta ctgttagaag 2100
aaccaattgtt gataatgccc ccccccgcgc ccccgggtt tctcttctc ctttgtgac 2160
atttcccag gattagagag actgtttacat tttcttctat gggatattta tagccaggg 2220
catgtgtatg tgcctgctaa tctaactctt gtcatagttc ccatttacta actgcccag 2280
anagaaataa atcagagagc aaggcaccag gggcaagant cgtgcagaat ttcagaggtc 2340
tggctgcaaa cctggaacec tggaaagcca gatgtaattc tacagcgat tgtlaaagt 2400
cataggtttt gactaactgc atagtaggtt ggtattactc agaactctg tatagttagg 2460
acagagagga gcttccctgc tcagctatlc actctgaaac ctgacactgg gctcttaaga 2520
aatgatgttt taagagcaga gatctttttt taatgtcttt gatttatttt ttagtgttaa 2580
ttaggtacat cctcagagat gtacttctct cctcttctgc aggatgtgga ggactcagtt 2640
ccatcatctg gggcactttt agagtgtata gaccacactg gttatgtggc ttaagttgt 2700
aaaaattaaa atgactttaa aagaacttag ggcctggctc aggatcttca ctggtaaagc 2760
tgttcttaag taacttaagt atctttgaat ctgcaagtat gtagggaaaa aaaaaagata 2820
tattatgtg aggaaatcca ttgtttanag gttgtcgtgt gttgttgttg ttttttaang 2880
ggagggagtt tattatttac ttagcttfga aatactgtgt aaatataat gtatatatat 2940
gatgtgctct ttgtcaacta aaattaggag gtgtatggta ttagctgcac cactgtgtgg 3000
atgtcaactc taactgttat tgatgataat actaaaaatg taacctgcac cttttccac 3060
ttgctgtca attaaagttt attcaaaagg aa 3092

```

[0018]

```

<210> 22
<211> 517
<212> PRT
<213> 小家鼠

```

```

<400> 22
Met Asp Phe Leu Leu Ser Gln Glu Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu
1 5 10 15
Pro Ala Ser Gln His Thr Leu Arg Arg Glu Pro Gly Cys Val Gln Gln
20 25 30
Pro Glu Gln Pro Gly Asp Arg Gly Pro Arg Ser Ala Trp Ala Lys Ser
35 40 45
Ser Ala Glu Asn Pro Gln Asp Arg Arg Ser Gly Gln Pro Ser Ala Ser
50 55 60
Glu Pro His Leu Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu
65 70 75 80
Pro Ala Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly Leu Pro
85 90 95
Val Ser Gly Ala Ala Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro
100 105 110
Gly Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala
115 120 125
Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro
130 135 140
Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Gln Gln Gln Cys Leu Ser Ala Phe
145 150 155 160
Thr Leu His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg
165 170 175

```

Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln
 180 185 190
 Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser
 195 200 205
 Gln Pro Thr Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly
 210 215 220
 Ala Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro
 225 230 235 240
 Asn His Ser Phe Lys His Gln Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu
 245 250 255
 Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr
 260 265 270
 Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro
 275 280 285
 Tyr Ser Ser Asp Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met
 290 295 300
 Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Met Ala Ala
 305 310 315 320
 Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Gly
 325 330 335
 Thr Gly Tyr Glu Ser Gln Asn His Thr Ala Pro Ile Leu Cys Gly Ala
 340 345 350
 Gln Tyr Arg Ile His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val
 355 360 365
 Arg Arg Val Ser Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Gln
 370 375 380
 Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys
 385 390 395 400
 Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr
 405 410 415
 Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe
 420 425 430
 Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val
 435 440 445
 Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Glu Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp
 450 455 460
 His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys
 465 470 475 480
 Pro Phe Ser Cys Arg Trp His Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser
 485 490 495
 Asp Glu Leu Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys
 500 505 510
 Leu Gln Leu Ala Leu
 515

[0019]

<210> 23
 <211> 2126
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 23

```

gccaggctct ccacccccac ttcccgaattg aggaaaccca ggcagaggag gctcagagag      60
ctaccgggtgg acccaacggtg cctccctccc tgggatctac acagaccatg gccttgcaca      120
cgctcagacc cctgttgggg tecttgggga ccccgcctcg cggaagctc ctgttccctgc      180
tcttcagcct cggatgggtg cagccctcga ggaacctgga tggagagaca gggcaggagg      240
ctgcgcccct ggaaggagtc ctggccaacc cacciaacat tccagcctc tcccctcgcc      300
aacctcctgg ctcccgctgt cgggaggtgt cggcctgag caccgagcgt gtcggggage      360
tggtgttggc cttggcacag aagaatgtea agctctcaac agagcagctg cgtgtctcgg      420
ctcaccggtc ctctgagccc cccgaggacc tggacgcctc cccattggac ctgctgctat      480
tctcaacccc agatgcttgc tggggccccc aggcctgcac ccgtttcttc tcccgcatac      540
cgaaggccaa tgtggacctg ctcccagggg ggctctccga cgcacagcgg ctgctgcctg      600
cggtctctggc ctgctggggg gtgcggggggf ctctgtgag cgagctgat gtgcgggctc      660
tgggagacct ggcttgcgac ctgctggggc gctttgtggc cgagtccgcc gaagtctctc      720
taccceggct ggtgagctgc cgggacccc tggaccagga ccagcaggag gcagccaggg      780
cggtcttcca gggeggggga cccccctacg gccccccgtc gacatggtct gctctccaga      840
tggacgctct gcggggcctg ctgcccgtgc tggccagccc caccatccgc agcatccccc      900
agggcactgt ggcgcgctgg cggcaacgct cctctcggga cccatcctgg cggcagcctg      960
aacggaccat cctccggccg cggttccggc gggaaagtga gaagacagcc tctctctcag      1020
gcaagaagge ccgagagata gacgagagcc teatcttcta caagaagtgg gagetggaag      1080
cctgcgtgga tgcggccctg ctggccaccc agatggaccg cgtgaaccgc atccccctca      1140
cctacgagca gctggacgtc ctaaagcata aactggatga gctctaccca caaggttacc      1200
ccagctctgt gatecagcac ctgggctacc tcttctcaa gatgagcctc gaggacatc      1260
gcaagtggaa tgtgacgtcc ctggagacc tgaaggcttt gcttgaagtc aacaaagggc      1320
acgaaatgag tctcaggtg gccaccctga tgcaccgctt tgtgaaggga aggggccagc      1380
tagacaaaga caccctagac accctgaccg cctctctacc tgggtaccctg tgcctccctc      1440
  
```

gccccgagga gctgagctcc gtccecccca gcagcactcg gggggtcagg ccccaggacc 1500
 tggacaecgtg tgacccaagg cagctggagc tectetatcc caaggeccgc ettgettcc 1560
 agaacatgaa cgggtccgaa tacttcgtga agatccagtc ettctgggt ggggccccca 1620
 cggaggattt gaaggegcctc agtcagcaga atgtgagcat ggacttgccc acgttcatga 1680
 agctgceggac ggatgcggtg ctgcegttga ctgtggctga ggtgcagaaa ettctgggac 1740
 cccaectgga gggectgaag ggggaggage ggcacegeccc ggtgceggac tggatcctae 1800
 ggcagcggca ggacgacctg gacacgctgg ggcctgggct acaggggggc atcccccaacg 1860
 gctacctggt cctagacctc agcatgcaag agcccctctc ggggagccc tcctctctag 1920
 gacctggacc tgtttcacc gtctctggcac tgcctctage cctcaccctg gccctgaggc 1980
 cccactecct tgcctgccc agccctgctg gggatcccgc cctggcccagg agcaggcacg 2040
 ggtggctccc gtccaccccc aagagaactc ggcctcagta aacgggaaca tgcccctgc 2100
 agacacgtaa aaaaaaaaa aaaaaa 2126

<210> 24
 <211> 622
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 24

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

[0020]

Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp
 450 455 460
 Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala
 465 470 475 480
 Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile
 485 490 495
 Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser
 500 505 510
 Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr
 515 520 525
 Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly
 530 535 540
 Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg
 545 550 555 560
 Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu
 565 570 575
 Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser
 580 585 590
 Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro
 595 600 605
 Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala
 610 615 620

<210> 25
 <211> 2187
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 25

[0021]

```

tgcaggctc tccaccccca etcccccaatt gaggaaaccg aggcagagga ggctcagegc      60
caacgaatcc tcttctggee tgcccggcca ctcccgtctg ctgtgacgcg eggaeagaga      120
gctaccggtg gaccacaggt gctctectec ctgggateta cacagaccat ggccctgcca      180
accgctegac cccgtttggg gtcctgtggg acccccgccc teggcagect cctgttctctg      240
ctcttcagcc tccgatgggt gcagecctcg agsacctggg ctggagagac agggcaggag      300
gctgcgcccc tggacggagt cctggccaac ccacctaac tttccagect ctcccctgce      360
caactctctg gcttcccgtg tgcggaggtg tccggcctga gcacggagcg tctcccggag      420
ctggctgtgg ccttggcaca gaagaatgte aagetctcaa agcagcaget gcctgtctctg      480
gctcaccggc tctctgagcc ccccaggacc ctggaagccc tcccattgga cctgctgcta      540
ttctcaacc cagatggctt ctccgggccc caggcctgca cccgtttctt ctcccgcate      600
acgaaggcca atgtggactt gctcccaggg ggggctcccg agcgacagcg gctgtctgct      660
ggcctctcgg cctgcctggg tctgcggggg tctctgctga gcgaggtga tctgcgggct      720
ctgggaggcc tggcttggga cctgcccggg cgtttgtgg ccgagtcgac cgaagtgtctg      780
ctaccccgcc tggtagcttg cccgggaccc ctggaccagg accagcagga ggcagccagg      840
ggcctctcgc agggcggggg acccccctac ggccecccgt cgcacatggtc tgtctccacg      900
atggacgctc tgcggggcct gctgcccgtg ctgggcccgc ccatcctccg cagcatcccg      960
cagggcacag tggcccgtg gcggaacgc tctctctggg acccctctg gcggcagcct      1020
gaacggacca tctctcggcc gcggttccgg cgggaagtgg agaagacagc ctgtctctca      1080
ggcaagaagg ccccgagat agacgagagc ctcctctctt acaagaagtg ggagctggaa      1140
gctgtcgtgg atcgggcctt gctggccacc cagatggacc gcctgaacgc cctccccttc      1200
acctacgagc agctggagct cctaaagcat aaactggatg agctctacc acaaggttac      1260
cccagctctg tgaaccagea cctgggctac ctctctctca agatgagccc tgaagcatt      1320
cgcaagtggg atgtgacgct cctggagacc ctgaagcctt tgcctgaagt caacaaaggg      1380
cagcaaatga gtctcaggtt ggcacacctg atcgaccgct ttgtgaaggg aaggggcccag      1440
ctagacaagg acaecctaga caccctgacc gcttctacc ctgggtacct gtgctcccct      1500
agcccggagg agctgagctc cgtgcccctc agcagcctct gggcggtcag gcccaggac      1560
ctggacagct gtgaaccaag gcagctggac gtctctatc ccaaggcccg ccttgccttc      1620
cagaacatga accggctccg aactctctg aagatccagt ccttctctgg tgggcccctc      1680
accgaggatt tgaaggcctt cagtcagcag aatgtgagca tggacttggc caagctcatg      1740
aagctcggga cggatcgctt gctgcccgtg actgtgctg aggtgcagaa acttctggga      1800
ccccacgtgg agggcctgaa ggcggaggag cggcaccgcc cggctcggga ctggatccta      1860
cggcagcggc aggacgacct ggacacgctg ggcctgggce tacaggggcg cctcccacac      1920
ggctacctgg tcttagacct cagcatgcaa gaggcctctt cggggagccc ctgctctcta      1980
ggacctggac ctgttctcac cgtctctgga ctgctcttag cctcaccctt ggcctgaggg      2040
ccccactccc ttgctgccc cagccctgct ggggatcccc gcttggccag gageaggcac      2100
gggtggtccc cgttccacc cagagaacct cgcctcagt aaaccggaac atgcccctg      2160
cagacacgta aaaaaaaaa aaaaaaa

```

<210> 26
 <211> 622
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 26

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro
 1 5 10 15

[0022]

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln
 20 25 30
 Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
 35 40 45
 Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg
 50 55 60
 Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu
 65 70 75 80
 Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
 85 90 95
 Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Gln Pro Pro
 100 105 110
 Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro
 115 120 125
 Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
 130 135 140
 Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln
 145 150 155 160
 Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
 165 170 175
 Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
 180 185 190
 Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
 195 200 205
 Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Ala Ala Arg
 210 215 220
 Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp
 225 230 235 240
 Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly
 245 250 255
 Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg
 260 265 270
 Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile
 275 280 285
 Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser
 290 295 300
 Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys
 305 310 315 320
 Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met
 325 330 335
 Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu
 340 345 350
 Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val
 355 360 365
 Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Gln Asp Ile
 370 375 380
 Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu
 385 390 395 400
 Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp
 405 410 415
 Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr
 420 425 430
 Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu
 435 440 445
 Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Glu Asp
 450 455 460
 Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala
 465 470 475 480
 Arg Leu Ala Phe Glu Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile
 485 490 495
 Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser
 500 505 510
 Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr
 515 520 525
 Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly
 530 535 540
 Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg
 545 550 555 560
 Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu
 565 570 575
 Gly Leu Glu Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser
 580 585 590
 Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro
 595 600 605
 Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala

```

610          615          620
<210> 27
<211> 2154
<212> DNA
<213> 智人

<400> 27
egceacgcac tcccttttct gectggccgg ccactcccgt ctgctgtgac gcgeggacag      60
agagctaceg gtggaccac  ggtgectccc tccctgggat ctncacagac caifggccttg      120
ccaacggctc gaccctgttt ggggtctctgt gggacccccg cctctggcag cctctgttc      180
ctgctcttca gccctggatg ggtgcagccc tcgaggacce tggctggaga gacagggcag      240
gagcttgcgc ccttggacgg agtcttggcc aaccaccta acatttcag cctctcccc      300
cgccaactcc ttggcttccc gttgtcggag gtgtccggcc tgaccacgga gcgtgtccgg      360
gagctggetg ttgecttggc acagaagaa gteaagetet caacagagca gettgcctgt      420
ctgctcaacc ggtctcttga gccccccgag gaectggacg cctctccatt ggacctgtg      480
ctatttccca acccagatgc gtctctgggg ccccaggcct gcacctgtt cttctccgc      540
atcacgaagg ccaatgtgga cctgtctccg agggggctc cggagcgaca gcggctgtg      600
acctggctc ttgecttggc ggggtgtgcg ggtctcttgc tgaccgagge tgatgtgctg      660
gctctgggag gcttggcttg cgaactgect gggccttttg tgcccgagtc ggccgaagt      720
ctgttaccce ggctgtgtgag ctgccccgga cccctggacc aggaccagca ggaggcagc      780
aggcgctgct tgcaggcgcg gggaccccc taeggccccc cgttgacatg gtcgtctctc      840
acgatggacg ctctcgggg cctgtctccc gtgttggccc agcccctcat ccgcagcctc      900
ccgcagggca tcttggccc gtggcgccaa cgtctctctc gggacccttc ctggcggeag      960
cctgaacgga ccatctctcg gcccggttcc cggcgggaag tggagaagac agcctgtctc      1020
tcaggcaaga aggcctcgca gatagaagag agcctcctct ctacaagaa gtgggagctg      1080
gaagcctcgc ttgatcgcc cctgtctgcc acccagatgg acccctgaa cgcctcccc      1140
ttcacttacc agcagcttga cgtcttaaag cataaacctg atgagctct cccacaagg      1200
taccccagat ctgtgatcca gaacctgggc taacctctcc tcaagatgag ccttggagg      1260
attcgaagt ggaatgtgac gtcccctggag accctgaagg ctcttcttga agtcaacaa      1320
gggcacgaaa ttgactctca ggtctctcgg cggccccctc cacaggttgc cacctgate      1380
gaccgctttg ttgagggaag ggccagctca gacaaagaca ccttagacac cctgaccgc      1440
ttctacctgt ggtacctgtg ctcccctcage cccgaggage ttgactcctg gccccccag      1500
agcatctggg cggtcaggcc ccaggacctg gacacgtgtg acccaaggca gctggacgtc      1560
ctctatccca aggcctcctt tcttctcag aacatgaag ggtccgaata ctctgtgaag      1620
atecagttct tcttgggttg gccccccacg gaggatttga aggcctcag tcagcagaat      1680
gtgagcatgg accttggccac gtctatgaag ctgcccagcg atgctgtct gccgttga      1740
gtgctgagg ttgcagaaact tctgggacc cactgtgagg gcttgaagge ggaggagcg      1800
caaccctcgg ttggggactg gatcttaccg cagcggcagg acgaccttga caccttggg      1860
ctgggcttac agggcggeat ccccaacggc taectgttcc tagacctcag catgeaagag      1920
gcccctctcg ggacgccctg cctcttagga cctggacctg tctcaccct cctggcactg      1980
ctcttagcct ccaccttggc ctgagggccc cactcccctg ctggccccag ccttcttgg      2040
gatecccccc ttggccaggag caggcacggg ttgtccccct tccaccceaa gagaactcgc      2100
gcteaagtaa cgggaacatg cccccctcag acaegtaaaa aaaaaaaaa aaaa      2154

```

[0023]

```

<210> 28
<211> 630
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28
Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro
 1          5          10          15
Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln
 20          25          30
Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
 35          40          45
Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg
 50          55          60
Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu
 65          70          75          80
Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
 85          90          95
Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
 100         105         110
Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro
 115         120         125
Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
 130         135         140
Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln
 145         150         155         160
Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
 165         170         175
Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
 180         185         190

```

Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
 195 200 205
 Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg
 210 215 220
 Ala Ala Leu Glu Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp
 225 230 235 240
 Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly
 245 250 255
 Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg
 260 265 270
 Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile
 275 280 285
 Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser
 290 295 300
 Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys
 305 310 315 320
 Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Glu Met
 325 330 335
 Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu
 340 345 350
 Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val
 355 360 365
 Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile
 370 375 380
 Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu
 385 390 395 400
 Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu
 405 410 415
 Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln
 420 425 430
 Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr
 435 440 445
 Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser
 450 455 460
 Ile Trp Ala Val Arg Pro Glu Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln
 465 470 475 480
 Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn
 485 490 495
 Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro
 500 505 510
 Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu
 515 520 525
 Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val
 530 535 540
 Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala
 545 550 555 560
 Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln
 565 570 575
 Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn
 580 585 590
 Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr
 595 600 605
 Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu
 610 615 620
 Leu Ala Ser Thr Leu Ala
 625 630

[0024]

<210> 29
 <211> 2135
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<400> 29
 ggacagctgc tttccaggc ccaaaagecc cttcgttgc tccaaacagt ggtgtgggtt 60
 gagggtggg acaagtggg accteagagt cattgttate cacagaccat ggccittgcca 120
 acagctcgac cctgctggg gtcctgtgga agtccatct gcagccgaag ettcctactg 180
 cttctcetta gtcttgggtg gataccactg ctgcagacc agactacaaa gacaagccag 240
 gaggccacac tctccatgc tgtgaacggt gccctgact ttgccagtct ccccacagge 300
 ctctttcttg gctccatgt tgaggaggta tetgacctga gcatggaaca agccaagggg 360
 ctggctatgg ctgtaagaca gaagaacatt acactccggg gacatcagct gcgttgtctg 420
 gcacgtgcc ttcttaggca cctcaccgac gaggaactga atgctcttcc actggacctg 480
 ctgctcttcc teaacccage catgtttcca gggcaacagg cttgtgcca cttcttctcc 540
 ctcatcteta aagccaatgt ggatgtactc ccacggaggt cctggagcg ccagagcctg 600
 ctgatggagg ctctgaagtg ccagggcgtg tatggatttc aagtgagtga ggcagatgtg 660
 eggctctctg gaggcctggc ctgtgacctg cctgggaaat ttgtggccag atcttccgaa 720

```

gttctcctcc ccigtgtggc aggatgccaa ggacccclgg accagagcca ggaaaaggca 780
gtcaggaggg ttctgaggag tggagaacc caatatggee ccccatcgaa gtggtcagtc 840
tccaccctgg atgcccctga gagcttggta gcagtgttgg atgagtcgat cgtccagagc 900
atcccacagg atgtcaaaagc tgaatggctg caacacatct ccagagaccc ctccagctg 960
gggtctaaagc tgaccgtcat acaccaagg ttcgacggg atgcagaaca gaaagcclgc 1020
ccctccaggga aggagcccta caaggtggat gaagacctca tctctacca gaattgggag 1080
ctggagagctt gtgtagatgg caccatgctg gccagacaaa tggaccttgt gaacgagatt 1140
ccctcaect atgagcaget cagtatcttt aagcacaaac tggacaagac ctaccacaaa 1200
ggctatctct agtccctgat ccagcagctg ggtaactct tcagatatgt tagccctgaa 1260
gacatccacc agtggaaatgt gacctacca gacacagtga aaactctgct caaagtcagc 1320
aaaggacaaa agatgaatgc ttaggegatt gcccttggcg ccttctatct tggggaggga 1380
ggccagctgg acgaggalat ggtaaaagcc ctgggcgaca tcccgtaag ctatctatgt 1440
gaattcagcc cccaggatct gcactcggta cctccagtg tcatgtgctt ggttgggccc 1500
caagacctgg acaagtgcag ccagaggcat ctgggtctcc tctaccagaa ggccctgctca 1560
gcccctcaga atgtgagcgg cctagaatac ttgagaaaa tcaagacatt cctgggtggg 1620
ctctccgtga aggacctcgg gcccctcag cagcacaaat tgagcatgga catagccact 1680
ttcaagagggc igcagggtga tcccctgggt ggctgagtg tggctgaggt acagaaactt 1740
ctggggccaaa acattgttga cctgaagacc gaggaggata aaagccctgt cctgactgg 1800
ctgttccggc agcatcagaa agacctagac agctgggtt tgggacttca ggttggcatc 1860
cccattgctt acctggtctt ggacttcaat gtccgagagg cctctccag cagagcctca 1920
ctcttggggc caggatttgt ataatatgg atccagctc tgcctccagc ttaaggctg 1980
agctgagacc accaccctgc aaggtctctg gtcccagctc taetggggcc ctcttgacca 2040
ggagtgggta ccaggggta ttgccaaagt ttgaggactc ttgaactcaa taacagctgg 2100
catatgctcc cttgaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 2135

```

<210> 30
 <211> 625
 <212> PRT
 <213> 小鼠鼠

[0025]

```

<400> 30
Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Ser Pro
1 5 10 15
Ile Cys Ser Arg Ser Phe Leu Leu Leu Leu Ser Leu Gly Trp Ile
20 25 30
Pro Arg Leu Gln Thr Gln Thr Lys Thr Ser Gln Glu Ala Thr Leu
35 40 45
Leu His Ala Val Asn Gly Ala Ala Asp Phe Ala Ser Leu Pro Thr Gly
50 55 60
Leu Phe Leu Gly Leu Thr Cys Glu Glu Val Ser Asp Leu Ser Met Glu
65 70 75 80
Gln Ala Lys Gly Leu Ala Met Ala Val Arg Gln Lys Asn Ile Thr Leu
85 90 95
Arg Gly His Gln Leu Arg Cys Leu Ala Arg Arg Leu Pro Arg His Leu
100 105 110
Thr Asp Glu Glu Leu Asn Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu
115 120 125
Asn Pro Ala Met Phe Pro Gly Gln Gln Ala Cys Ala His Phe Phe Ser
130 135 140
Leu Ile Ser Lys Ala Asn Val Asp Val Leu Pro Arg Arg Ser Leu Glu
145 150 155 160
Arg Gln Arg Leu Leu Met Glu Ala Leu Lys Cys Gln Gly Val Tyr Gly
165 170 175
Phe Gln Val Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys
180 185 190
Asp Leu Pro Gly Lys Phe Val Ala Arg Ser Ser Glu Val Leu Leu Pro
195 200 205
Trp Leu Ala Gly Cys Gln Gly Pro Leu Asp Gln Ser Gln Glu Lys Ala
210 215 220
Val Arg Glu Val Leu Arg Ser Gly Arg Thr Gln Tyr Gly Pro Pro Ser
225 230 235 240
Lys Trp Ser Val Ser Thr Leu Asp Ala Leu Gln Ser Leu Val Ala Val
245 250 255
Leu Asp Glu Ser Ile Val Gln Ser Ile Pro Lys Asp Val Lys Ala Glu
260 265 270
Trp Leu Gln His Ile Ser Arg Asp Pro Ser Arg Leu Gly Ser Lys Leu
275 280 285
Thr Val Ile His Pro Arg Phe Arg Arg Asp Ala Glu Gln Lys Ala Cys
290 295 300
Pro Pro Gly Lys Glu Pro Tyr Lys Val Asp Glu Asp Leu Ile Phe Tyr
305 310 315 320
Gln Asn Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Gly Thr Met Leu Ala Arg
325 330 335
Gln Met Asp Leu Val Asn Glu Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Ser
340 345 350

```

Ile Phe Lys His Lys Leu Asp Lys Thr Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu
 355 360 365
 Ser Leu Ile Gln Gln Leu Gly His Phe Phe Arg Tyr Val Ser Pro Glu
 370 375 380
 Asp Ile His Gln Trp Asn Val Thr Ser Pro Asp Thr Val Lys Thr Leu
 385 390 395 400
 Leu Lys Val Ser Lys Gly Gln Lys Met Asn Ala Gln Ala Ile Ala Leu
 405 410 415
 Val Ala Cys Tyr Leu Arg Gly Gly Gly Gln Leu Asp Glu Asp Met Val
 420 425 430
 Lys Ala Leu Gly Asp Ile Pro Leu Ser Tyr Leu Cys Asp Phe Ser Pro
 435 440 445
 Gln Asp Leu His Ser Val Pro Ser Ser Val Met Trp Leu Val Gly Pro
 450 455 460
 Gln Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg His Leu Gly Leu Leu Tyr Gln
 465 470 475 480
 Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu Glu Tyr Phe Glu
 485 490 495
 Lys Ile Lys Thr Phe Leu Gly Gly Ala Ser Val Lys Asp Leu Arg Ala
 500 505 510
 Leu Ser Gln His Asn Val Ser Met Asp Ile Ala Thr Phe Lys Arg Leu
 515 520 525
 Gln Val Asp Ser Leu Val Gly Leu Ser Val Ala Glu Val Gln Lys Leu
 530 535 540
 Leu Gly Pro Asn Ile Val Asp Leu Lys Thr Glu Glu Asp Lys Ser Pro
 545 550 555 560
 Val Arg Asp Trp Leu Phe Arg Gln His Gln Lys Asp Leu Asp Arg Leu
 565 570 575
 Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp
 580 585 590
 Phe Asn Val Arg Glu Ala Phe Ser Ser Arg Ala Ser Leu Leu Gly Pro
 595 600 605
 Gly Phe Val Leu Ile Trp Ile Pro Ala Leu Leu Pro Ala Leu Arg Leu
 610 615 620
 Ser
 625

[0026]

<210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的阿皮素肽

 <400> 31
 Gly Gln Lys Met Asn Ala Gln Ala Ile
 1 5

 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 来自小家鼠的3D θ 肽

 <400> 32
 Cys Ala Ser Ser Pro Gly Leu Gly Gly Ser Tyr Gln Gln Tyr Phe
 1 5 10 15

 <210> 33
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 来自小家鼠的3D θ 核苷酸克隆

 <400> 33
 tgtgccagca gccctggact ggggggatcc tafgaacagt acttc
 45
 <210> 34

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自小家鼠的Vβ10 克隆 #1 肽克隆

<400> 34
 Cys Ala Ser Ser Gln Gly Leu Gly Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自小家鼠的Vβ10 克隆 #1 核苷酸克隆

<400> 35
 tgtgccagca gccagggaact ggggagctcc taigaacagt acttc 45

<210> 36
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自小家鼠的Vβ10 克隆 #2 肽

[0027] <400> 36
 Cys Ala Ser Ser Tyr Ile Leu Gly Ala Tyr Glu Gln Tyr Phe
 1 5 10

<210> 37
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自小家鼠的Vβ10 克隆#2 核苷酸

<400> 37
 tgtgccagca gctatatact gggggcctat gaacagtaact tc 42

<210> 38
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自小家鼠的Vβ10 克隆 #3 肽

<400> 38
 Cys Ala Ser Ser Ser Trp Thr Val Tyr Glu Gln Tyr Phe
 1 5 10

<210> 39
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 来自小家鼠的Vβ10 克隆 #3 核苷酸

- <400> 39
 tgtgccagca gctcctggac agtctatgaa cagtacttc 39
 <210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 来自小家鼠的V β 10 克隆 #4 肽
- <400> 40
 Cys Ala Ser Ser Trp Thr Gly Ala Asn Thr Gly Gln Leu Tyr Phe
 1 5 10 15
 <210> 41
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 来自小家鼠的V β 10 克隆 #4 核苷酸
- <400> 41
 tgtgccagca gctggacagg ggcaaacacc gggcagctct acctt 45
 <210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的间皮素肽
- [0028]
 <400> 42
 Ile Ser Lys Ala Asn Val Asp Val Leu
 1 5
 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的间皮素肽
- <400> 43
 Gly Gln Lys Met Asn Ala Gln Ala Ile
 1 5
 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的间皮素肽
- <400> 44
 Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu
 1 5
 <210> 45

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的间皮素肽

<400> 45
 Leu Leu Gly Pro Asn Ile Val Asp Leu
 1 5

<210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的间皮素肽

<400> 46
 Gln Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu
 1 5

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的间皮素肽

[0029]

<400> 47
 Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu
 1 5

<210> 48
 <211> 1595
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 48
 agaateaaaa gaggaaacca acccetaaga tgagctttcc atgtaaattt gfagecagct 60
 tccitctgat ttccaatgtt tcttccaaag gtgcagttcc caaagagatt aegaatgcct 120
 tggaaacctg gggtccttgg ggtcaggaca tcaacttggg cattcctagt ttccaatga 180
 gtgatgatata igacgatata aaatgggaaa aaacttcaga caagaaaaag attgcacaat 240
 tcagaaaaaga gaaagagact ttcaaggaaa aagatacata taagctattt aaaaaatgaa 300
 ctctgaaaat taagcctctg aagaaccgat atcaggatat ctacaaggta tcaatatatg 360
 atacaaaagg aaaaaatgtg ttggaaaaaa tatttgattt gaagattcaa gagagggtct 420
 caaaaccaaa gatctcctgg acttgataca acacaacctt gacctgtgag gfaatgaatg 480
 gaactgaacc cgnattaac ctgtatecag atgggaaaca tetaaaactt tctcagaggg 540
 tcatcacaca caagtgacc accagcctga gtgcaaaatt caagtgaca gcagggaaca 600
 aagtcagcaa ggaatccagt gtcagaccct teagctgtcc agagaaaggt ctggacatct 660
 atctcactat lggeatattg ggaggagcca gccctttgat ggtctttgtg gcaactgtctg 720
 ttctctatct caccaaaagg aaaaaacaga gngtctggag aaatgatgag gagctggaga 780
 caagagccca cagagtactt actgaagaaa ggggcccagg gccceaceaa attcagett 840
 caaccctcca gaatccagca acttcccacc atctctctcc accacctggt cctcgttccc 900
 aggcaccctg tcatgtctcc ccgctctctg gacaccgtgt ccagcaccag cctcagaaga 960
 ggcctctctg tccgtctggc acacaagttc accagcagaa aggcctctcc ctcccagac 1020
 ctctgagtca gccaaaacct ccccatgggg cagcagaaaa ctctattgtc ccttctctta 1080
 attaaaaaag atagaaactt tctttttcaa taaaaagcac tcttgatttc tgcctctctg 1140
 atgtgcatat ccgtacttcc atgagggtgt ttctgtgtgc agaactttgt cactctctga 1200
 ggctgtgggc cacagccacc ctctcatctt cgaactcagc catgttggtc acatctggag 1260
 ttttttgtct cctcagagag ctccateaca ccagtaagga gaageaatat aagtgtgatt 1320
 gcaagaatgg tagaggaccg agcacagaaa tcttagagat ttcttgctcc ctctcaggte 1380
 atgtgtgatg gcgataaatc aagtgtattg tgtgctgtgg tctcactaca agcagcctat 1440
 ctgcttaaga gactctggag ttcttatgtt gccctgtgtg acacttgcct accatctgt 1500
 gagtaaaagt gaaatnaaag ctttgactag aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1595

<210> 49
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 49
 Met Ser Phe Pro Cys Lys Phe Val Ala Ser Phe Leu Leu Ile Phe Asn
 1 5 10 15
 Val Ser Ser Lys Gly Ala Val Ser Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu
 20 25 30
 Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe
 35 40 45
 Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp
 50 55 60
 Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu
 65 70 75 80
 Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His
 85 90 95
 Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr
 100 105 110
 Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu
 115 120 125
 Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu
 130 135 140
 Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln
 145 150 155 160
 Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp
 165 170 175
 Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val
 180 185 190
 Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu
 195 200 205
 Asp Ile Tyr Leu Ile Ile Gly Ile Cys Gly Gly Gly Ser Leu Leu Met
 210 215 220
 Val Phe Val Ala Leu Leu Val Phe Tyr Ile Thr Lys Arg Lys Lys Gln
 225 230 235 240
 Arg Ser Arg Arg Asn Asp Glu Glu Leu Glu Thr Arg Ala His Arg Val
 245 250 255
 Ala Thr Glu Glu Arg Gly Arg Lys Pro His Gln Ile Pro Ala Ser Thr
 260 265 270
 Pro Gln Asn Pro Ala Thr Ser Gln His Pro Pro Pro Pro Gly His
 275 280 285
 Arg Ser Gln Ala Pro Ser His Arg Pro Pro Pro Pro Gly His Arg Val
 290 295 300
 Gln His Gln Pro Gln Lys Arg Pro Pro Ala Pro Ser Gly Thr Gln Val
 305 310 315 320
 His Gln Gln Lys Gly Pro Pro Leu Pro Arg Pro Arg Val Gln Pro Lys
 325 330 335
 Pro Pro His Gly Ala Ala Glu Asn Ser Leu Ser Pro Ser Ser Asn
 340 345 350

[0030]

<210> 50
 <211> 1098
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 50
 atggcgc tca tggctcccog aacctcgtc ctgctactct cgggggctct ggccctgacc 60
 cagacctggg cgggctctca ctccatgagg tatttcttca caticgtgtc ccggcccggc 120
 cgcgggggagc cccgcttcat cgcagtgggc tacgtggacg acacgcagtt cgtgcgggtc 180
 gacagcgacg ccgcgagcca gaggatggag ccgcgggcgc cgtggataga gcaggagggt 240
 cggaggtatt gggacgggga gacacggaaa gtgaaggccc actcaccagac tcaccgagtg 300
 gacctgggga cctgcgcgg ctactacaac cagagcgagg ccggttctca caccctccag 360
 atgatgtttg gctgcgacgt ggggtcggac tggcgccttc tccgggggta ccaccagtac 420
 gactacgacg gcaaggatta catgcacctg aaagaggacc tgcctctttg gaccgcggcg 480
 gacatggcag ctccagaccac caagcacaag tgggagcgg cccatgtggc ggagcagttg 540
 agagcctacc tggagggeac gtgcgtggag tggctccgea gatacctgga gaacgggaag 600
 gagacgctgc agcgcacgga cgcceccaaa acgcatatga ctaccacgc tgtctctgac 660
 catgaagcca cctgagggtg ctgggcccctg agcttctacc ctgaggagat ccaactgacc 720
 tggcagcggg atggggagga ccagaccag gacacggagc tcgtggagac caggcctgca 780
 ggggatggaa ccttcagaa gtggggcgct gtggtgtgct ctcttgaca ggagcagaga 840
 tacacctgcc atgtgcagca tgagggtttg cccaagcccc tcacctgag atgggagcgg 900
 tcttcccage ccaccatccc catcgtgggc atcattgctg gcttggttct ctttgagct 960
 gtgatcactg gagegtgtgt cgtctctgtg atgtggagga ggaagagctc agatagaana 1020
 ggagggagct actctcagcc tgaagcagct gacagtgccc agggctctga tgtgtctctc 1080

acagcttgta aagtgtga

1098

<210> 51
<211> 365
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51
Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala
1 5 10 15
Leu Ala Leu Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe
20 25 30
Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala
35 40 45
Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala
50 55 60
Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly
65 70 75 80
Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln
85 90 95
Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser
100 105 110
Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Met Met Phe Gly Cys Asp Val Gly
115 120 125
Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Glu Tyr Ala Tyr Asp Gly
130 135 140
Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala
145 150 155 160
Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys His Lys Trp Glu Ala Ala His Val
165 170 175
Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu
180 185 190
Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala
195 200 205
Pro Lys Thr His Met Thr His His Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr
210 215 220
Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
225 230 235 240
Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu
245 250 255
Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val
260 265 270
Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu
275 280 285
Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro
290 295 300
Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala
305 310 315 320
Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser
325 330 335
Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser
340 345 350
Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val
355 360 365

[0031]

<210> 52
<211> 987
<212> DNA
<213> 智人

<400> 52
aatataagtg gagcgctcgc gctggcgggc attcctgaag ctgacagcat tcgggcccag 60
atgctctcgt ccgtggcctt agctgtgcte gegctactct ctctttctgg cctggaggct 120
atccagcgtc ctccaaagat tcagggttac tcacgtcacc cagcagagaa tggaaagtea 180
aaattctcga attgetatgt gctctgggtt catccatccg acatigaagt tgacttaetg 240
aagaatggag agagaattga aaaagtgag caticagact tgcctttcag caaggactgg 300
tcctttctac tccttgaacta cactgaatte acecccaactg aaaaagaiga gtaigtectgc 360
cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta agtgggateg agacatgtaa 420
gcagcaccat ggaggtttga agatgcgcga tttggattgg atgaattcca aattctgett 480
gcttgccttt taatattgat atgcttatac acttacactt tatgcacaaa atgtagggtt 540
ataataatgt taacatggac atgatcttct ttataattct acitigagtg ctgtctccat 600
gtttgatgta lctgagcagg ttgctccaca gglagctcta ggaggctgg caacttagag 660
gtggggagca gagaattctc ttatecaaca tcaacatctt ggctcagatt gaactcttca 720
atctcttgca ctcaaaagctt gttaaagatag ttaagegtgc ataagttaac ttccaattta 780
catactctgc ttagaatttg ggggaaaatt tagaaatata atfgacagga ttattggaaa 840

tttgttataa tgaatgaaac attttgteat ataagattca tatttactic ttatacattt 900
 gataaagtaa ggcattggtt iggttaactt gggtttattt tgttccacaa gttaaataaa 960
 tcataaaact tgaatgtgta tctctta 987

<210> 53
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 智人

[0032]

<400> 53
 Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
 1 5 10 15
 Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
 20 25 30
 His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
 35 40 45
 Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
 50 55 60
 Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
 65 70 75 80
 Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
 85 90 95
 Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
 100 105 110
 Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
 115

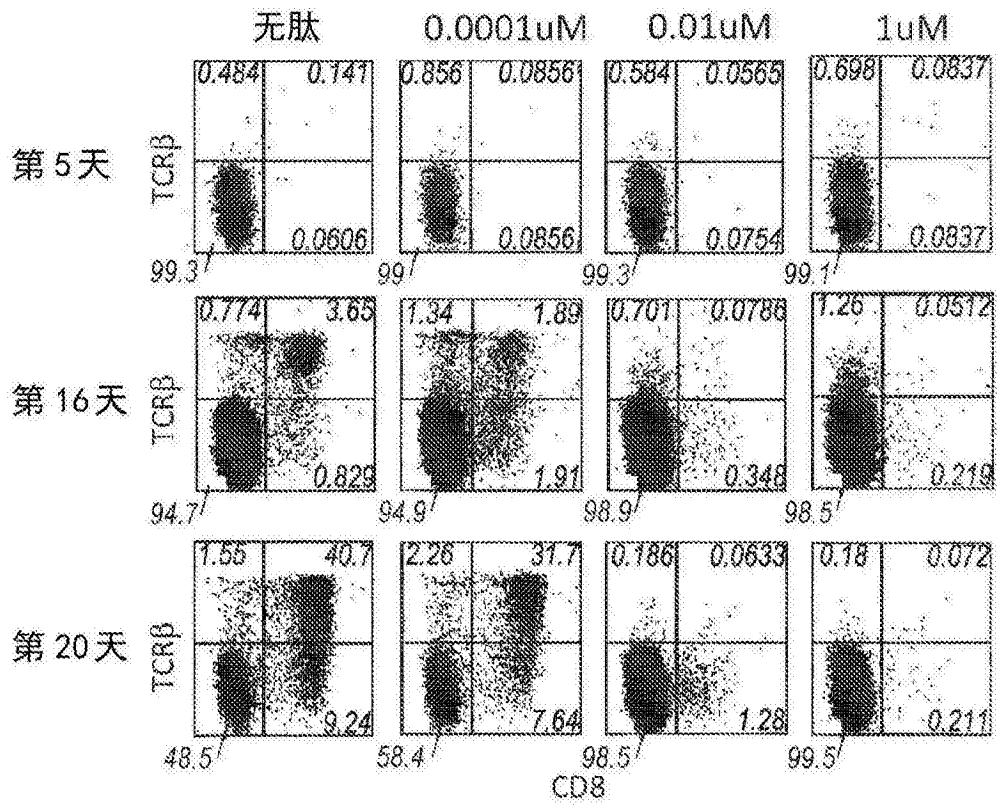


图1A

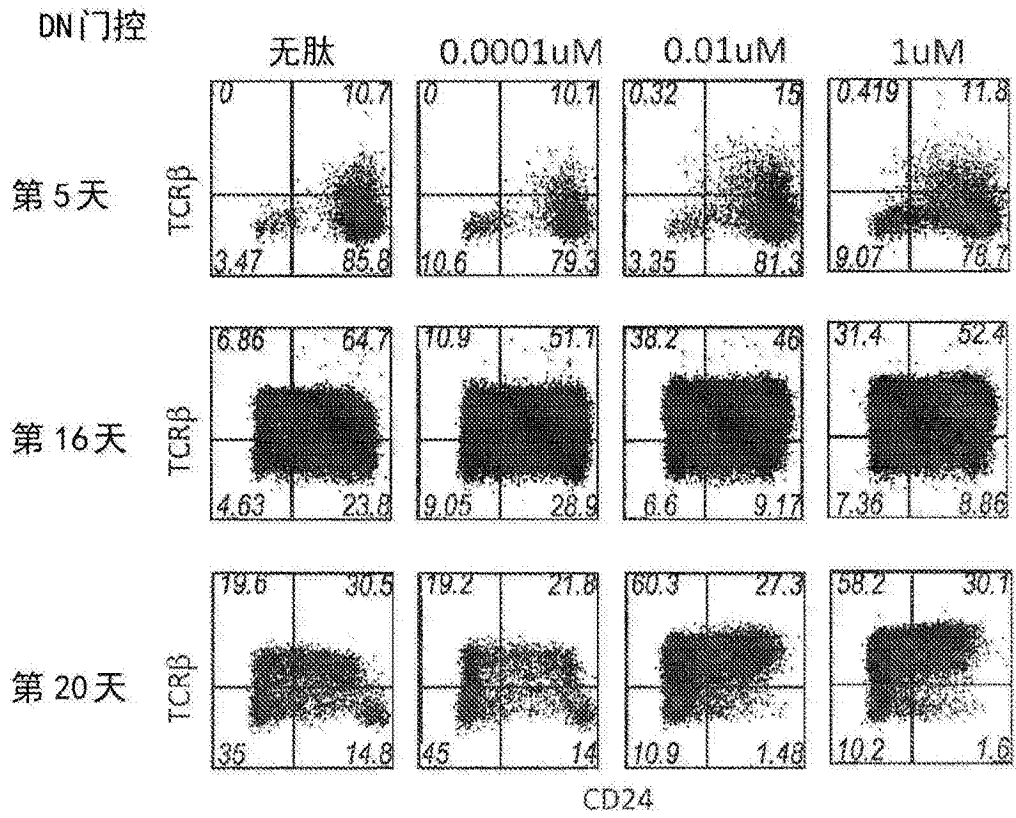


图1B

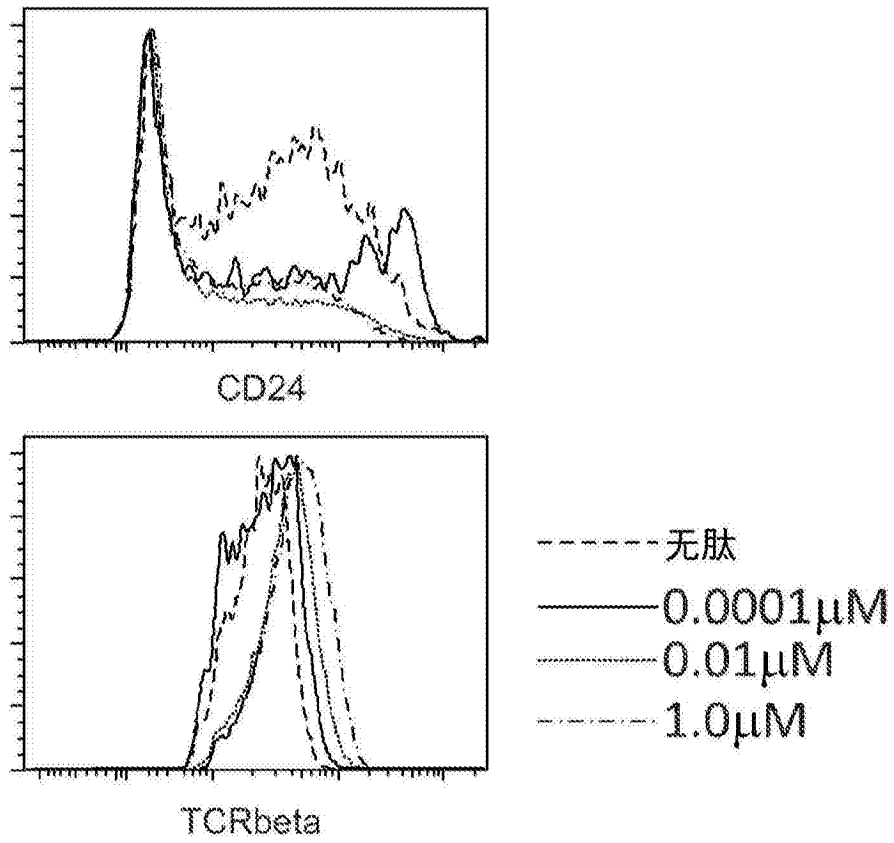


图1C

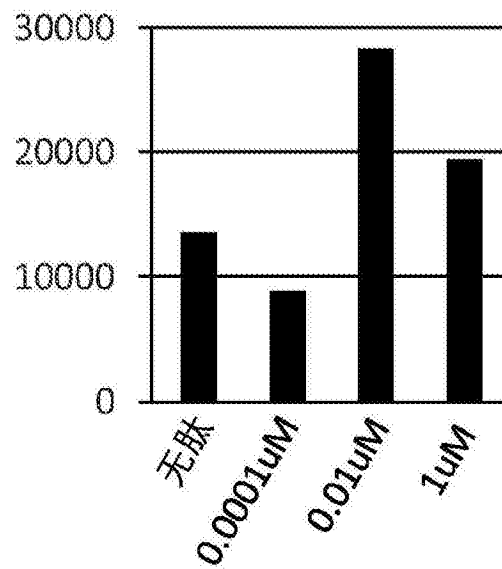
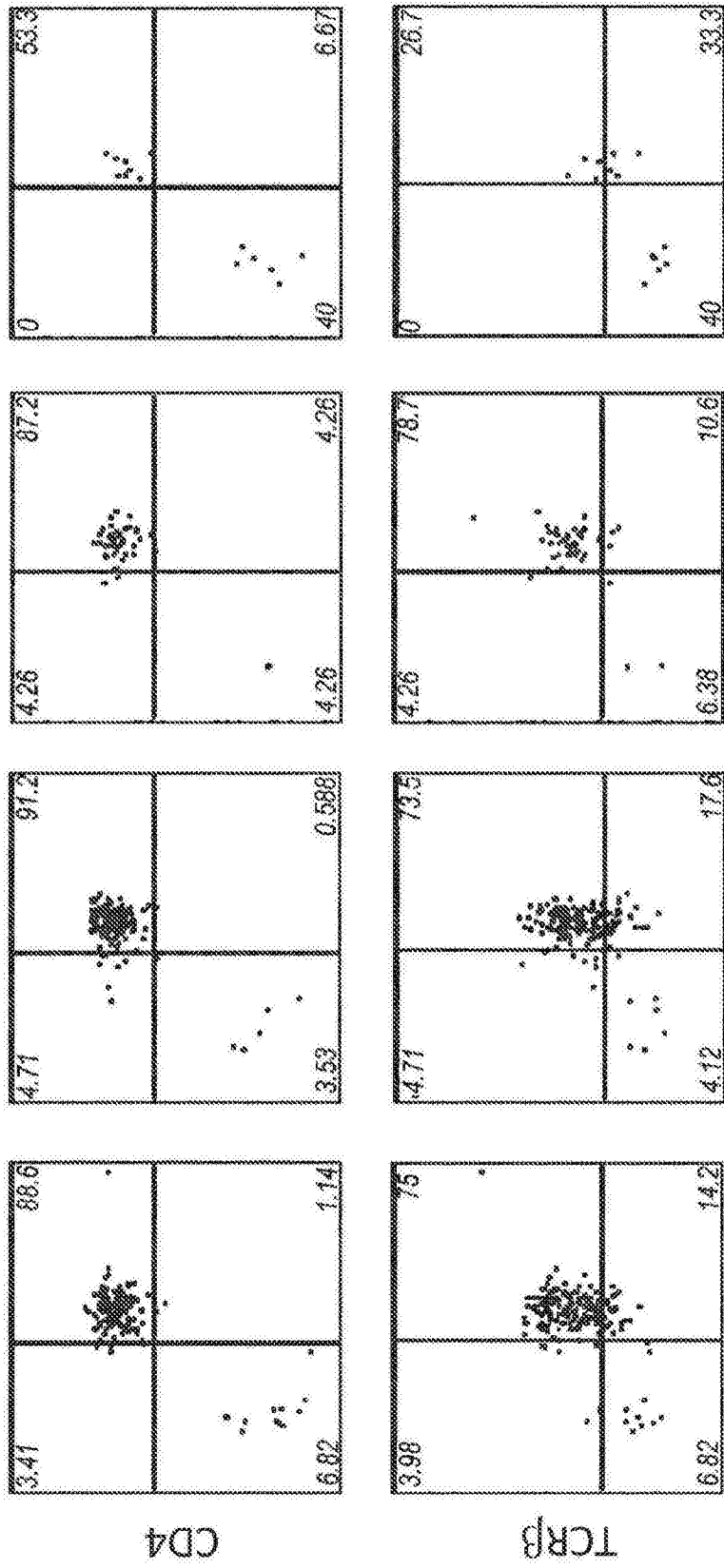


图1D



CD8

图2

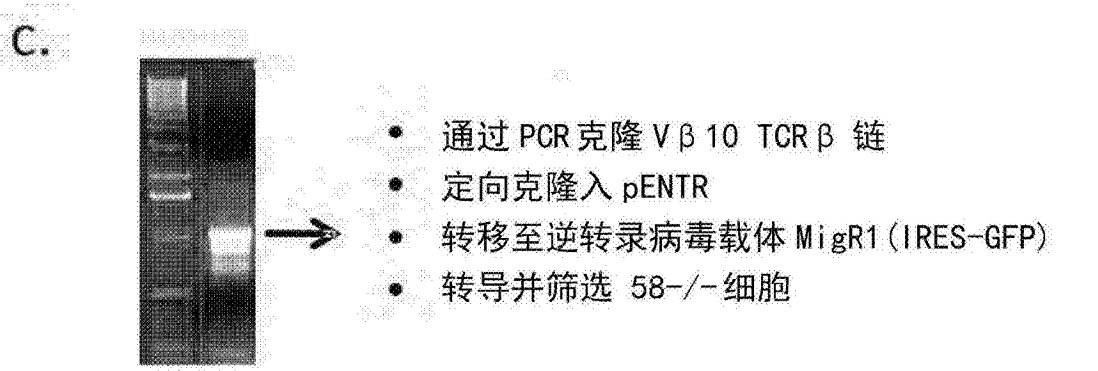
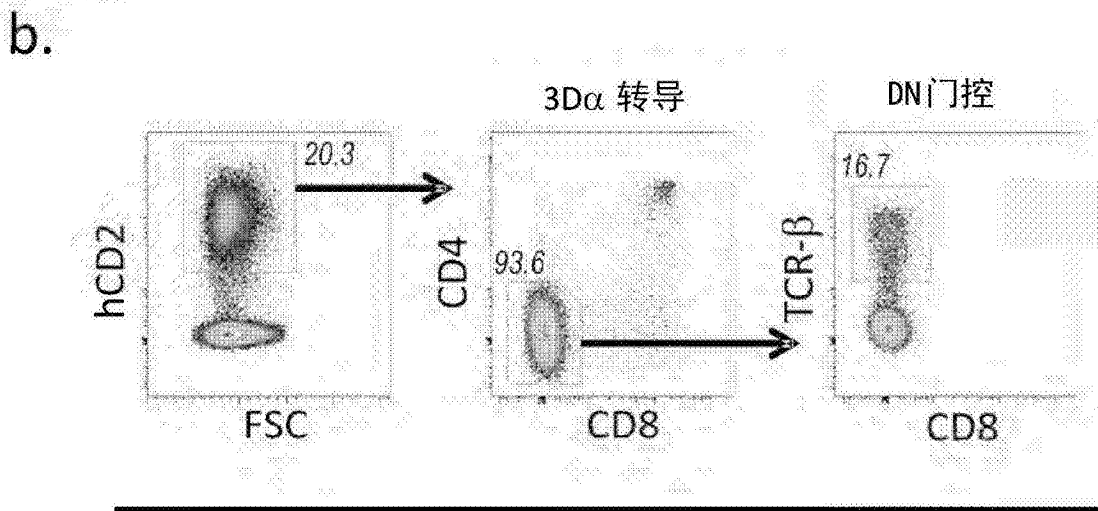
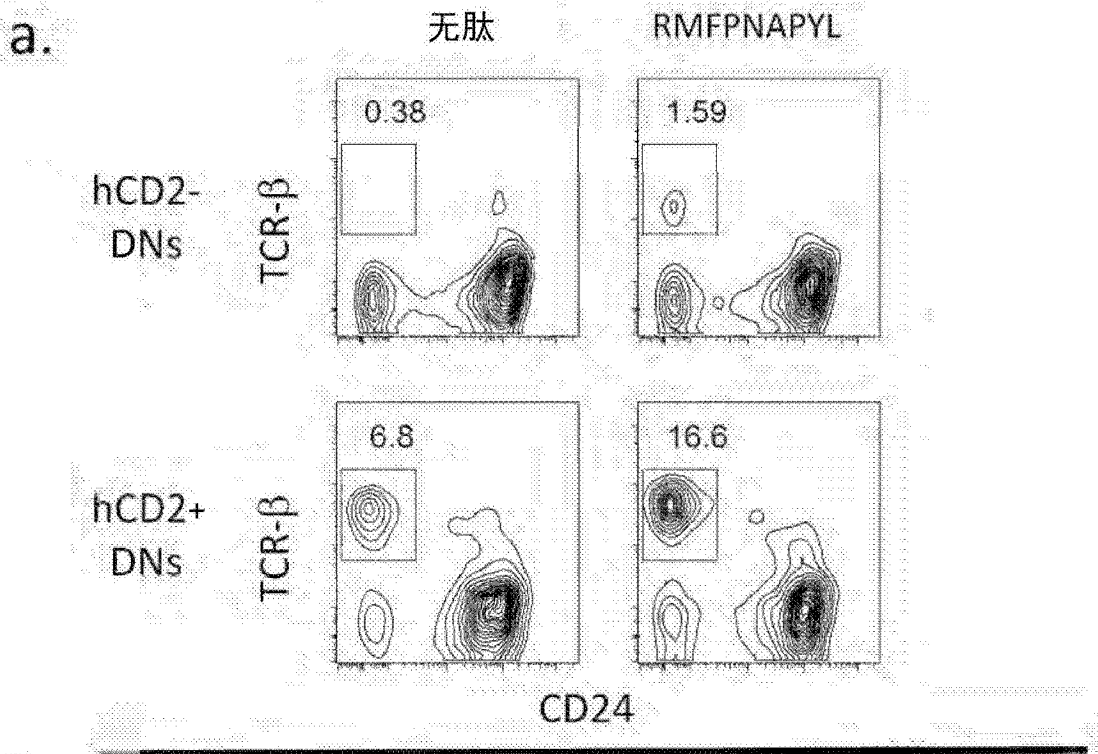


图3

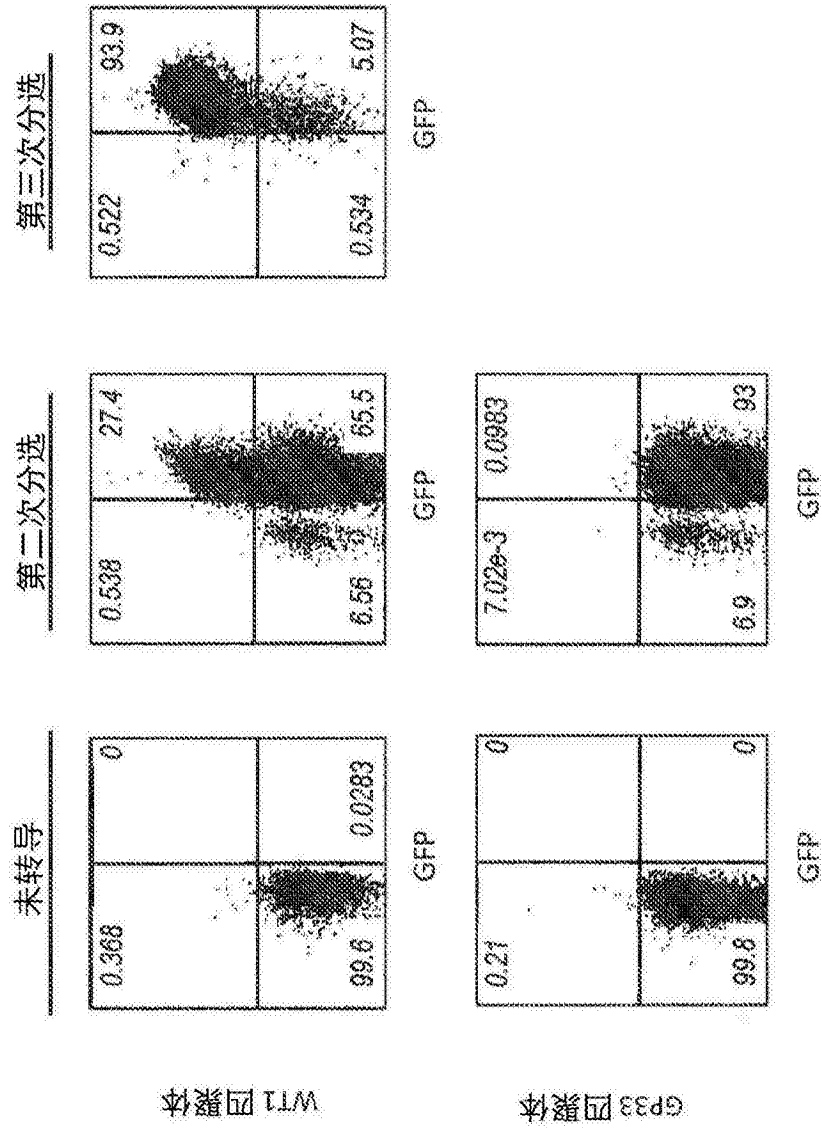


图4A

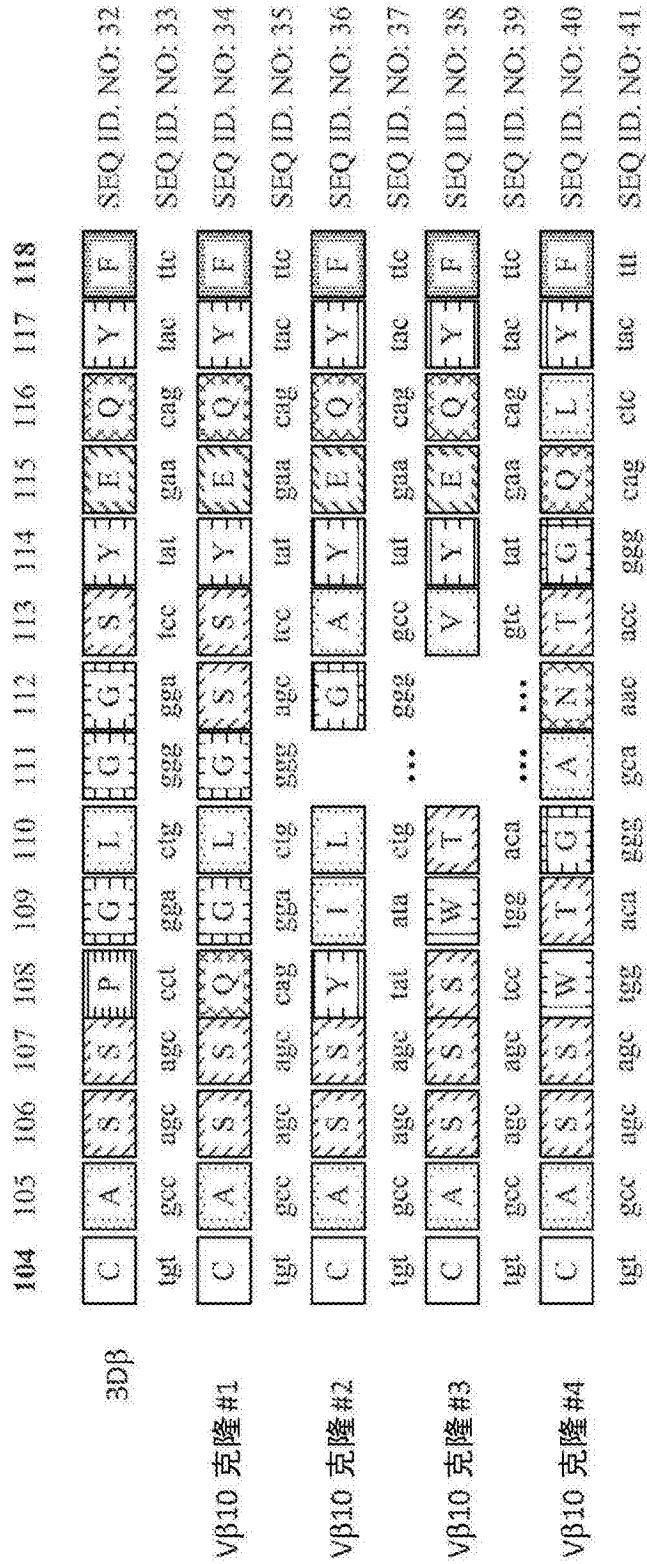


图4B

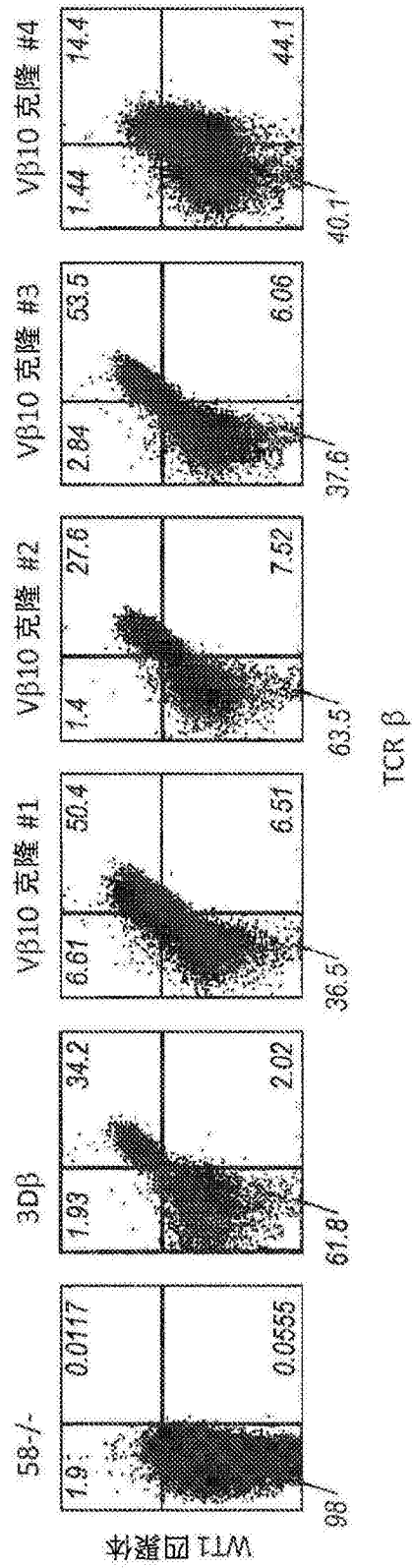


图4C

WT1 四聚体滴定

(标准化到 Bmax)

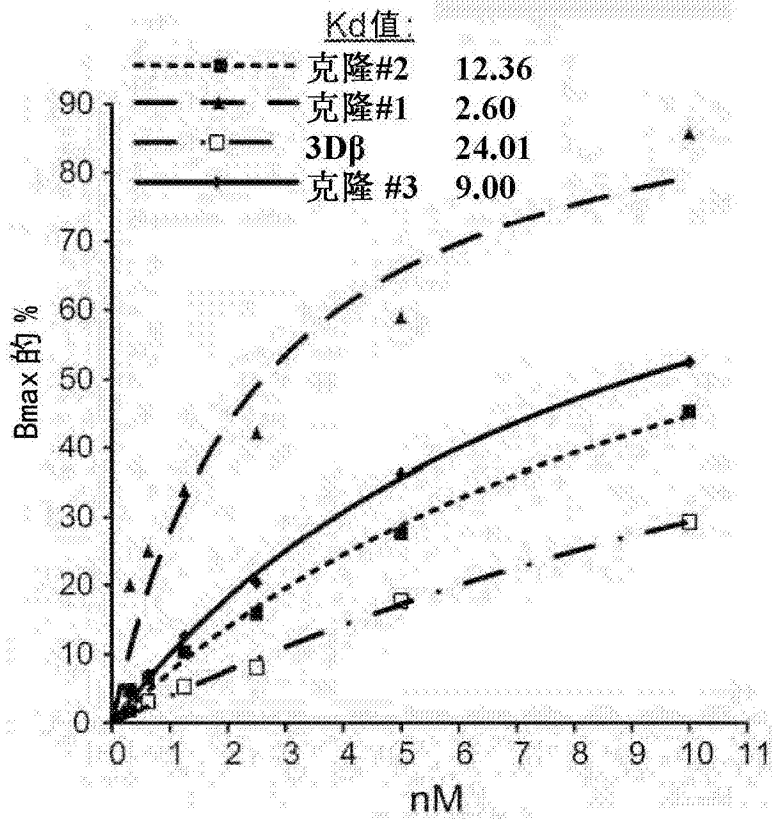


图5A

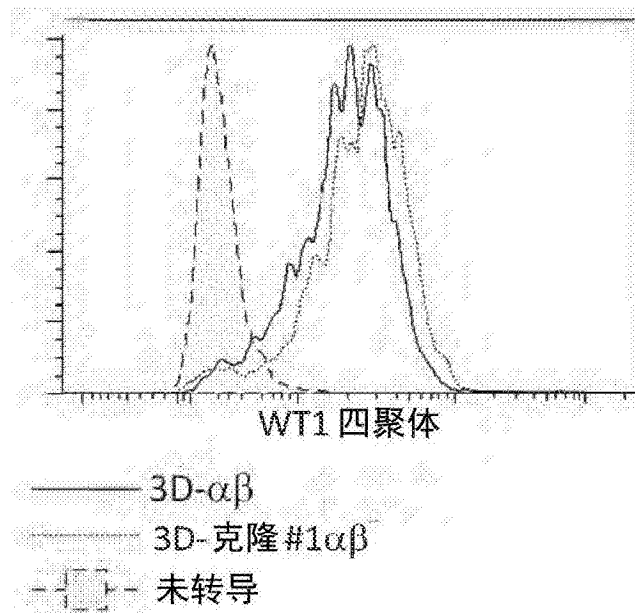


图5B

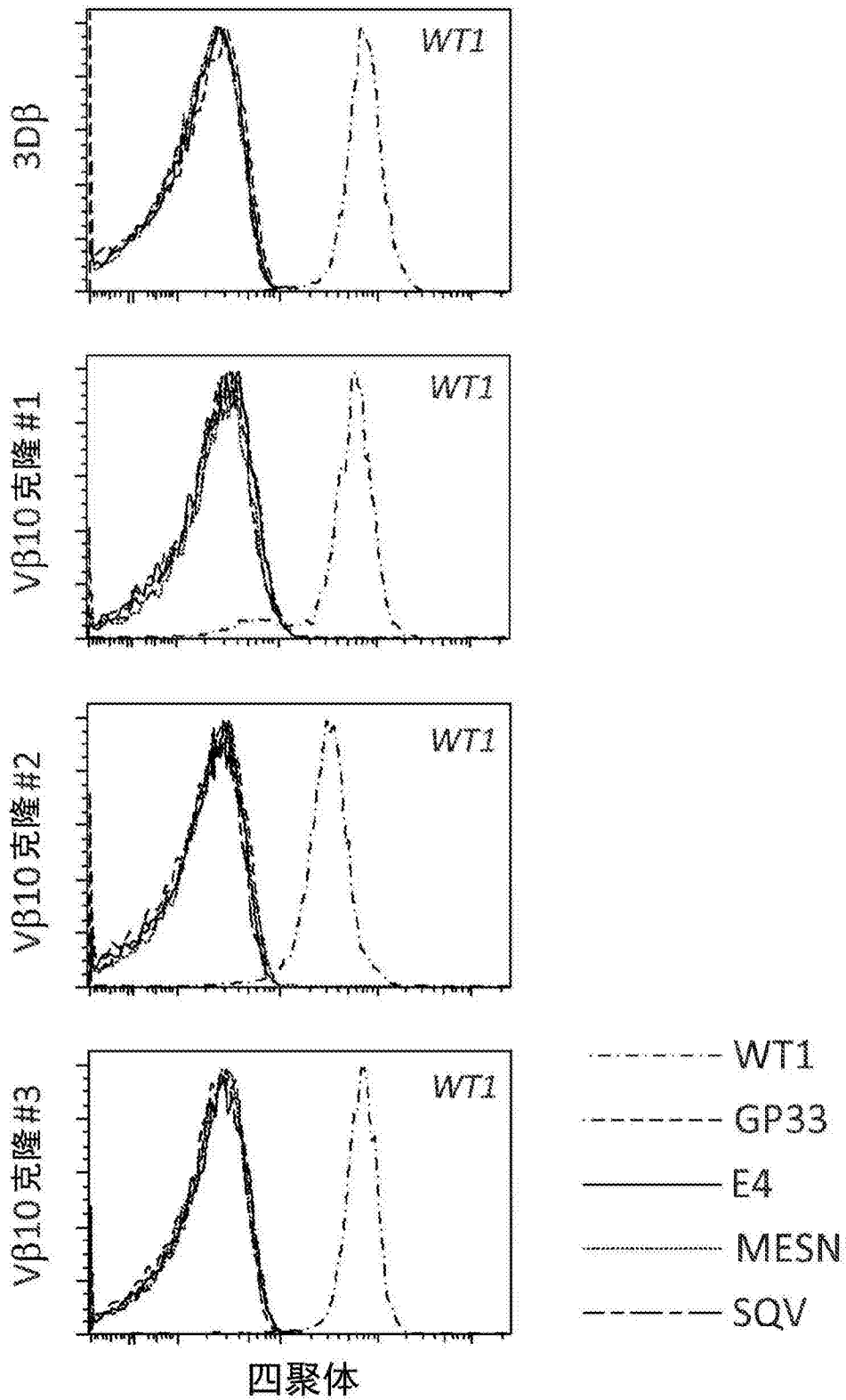
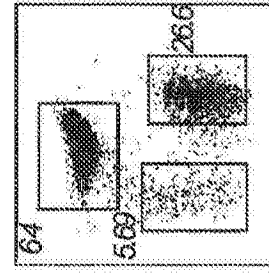
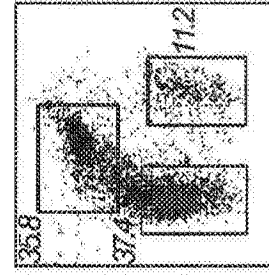
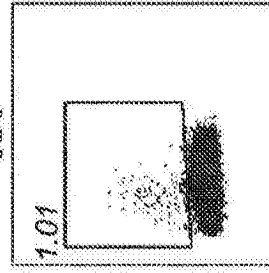
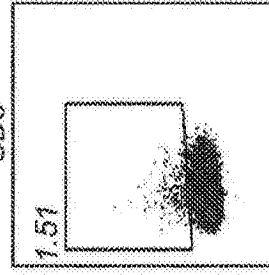
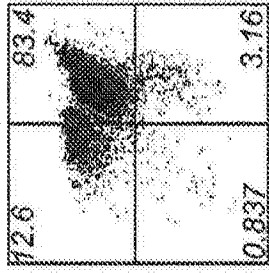
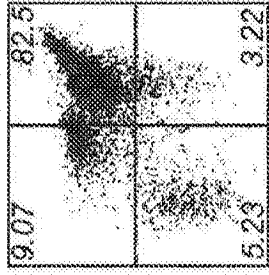


图5C

7431 α 逆基因

7431 α 转导

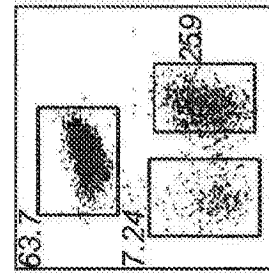
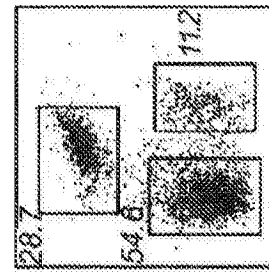
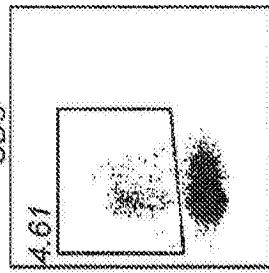
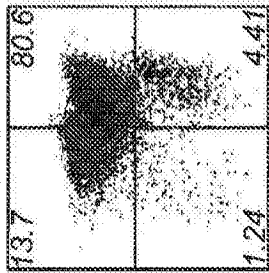
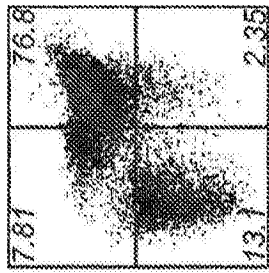
未转导



3D-PYY α 逆基因

3D α 转导

未转导



a. TCR β + 胸腺细胞

TCR β + DN 细胞

b.

TCR β + 脾细胞

图6

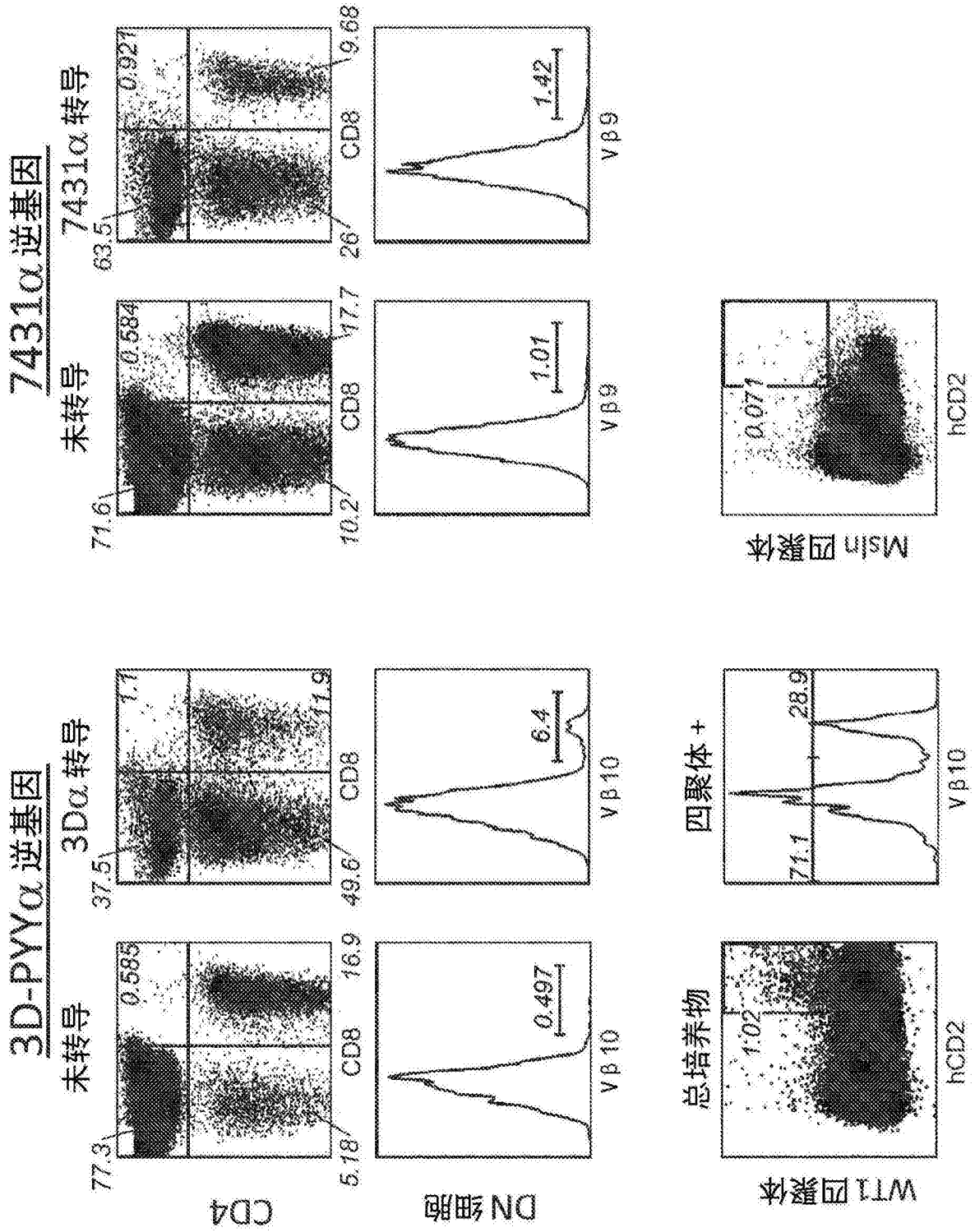


图7