



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0009556
(43) 공개일자 2015년01월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01) *A61K 35/12* (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7032747
(22) 출원일자(국제) 2013년05월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년11월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/039316
(87) 국제공개번호 WO 2013/166321
국제공개일자 2013년11월07일
(30) 우선권주장
61/642,358 2012년05월03일 미국(US)
- (71) 출원인
프레드 헛친슨 켄서 리서치 센터
미국 워싱턴 98109, 시애틀, 1100 페어뷰 애버뉴
엔.,
(72) 발명자
슈미트, 토마스 엠.
미국, 워싱턴 98107, 시애틀, 4426 1번 애비뉴 노
스웨스트
그린버그, 필립 디.
미국, 워싱턴 98040, 머서 아일랜드, 6510 82번
애비뉴 사우스이스트
(74) 대리인
손민

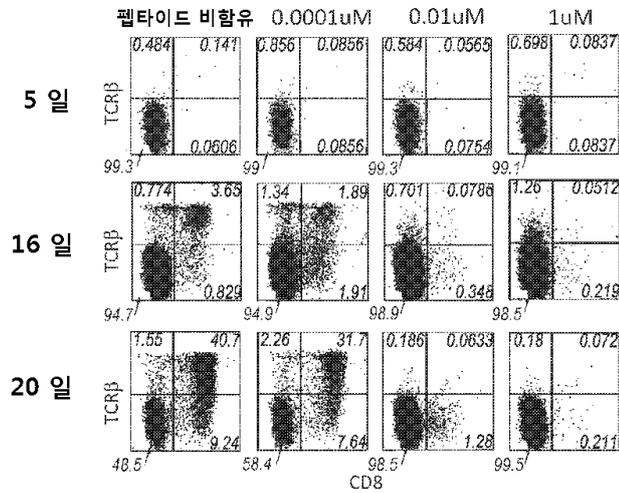
전체 청구항 수 : 총 41 항

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

(57) 요약

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

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

a. 조혈전구세포를, DN TCR $\alpha \beta^+$ 흉선세포로 조혈전구세포의 분화를 유도하는데 충분한 조건하 및 시간 동안 간질세포 및 펩타이드 항원과 접촉시키는 단계,

b. DN TCR $\alpha \beta^+$ 흉선세포로부터 다양한 TCR β 쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 단리하고, TCR β 쇄를 인코딩하는 핵산 서열을, 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있고 단계 (a)로부터의 TCR α 쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 세포 내로 도입하는 단계, 및

c. 증강된 친화성 TCR을 동정하는 단계를 포함하고,

상기 조혈전구세포는 펩타이드 항원에 특이적인 모체(parent) TCR로부터의 TCR α 쇄를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열을 포함하고,

상기 간질세포는 델타-유사-1(Delta-like-1) 또는 델타-유사-4를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열 및 MHC 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 것인, 증강된 친화성 T 세포 수용체(TCR)을 생성하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, TCR β 쇄가 모체 TCR로부터 단리되는 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 조혈전구세포가 흉선전구세포 또는 배아줄기세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 조혈전구세포가 골수 또는 제대혈로부터 유래하는 조혈줄기세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 바이러스 벡터가, 펩타이드 항원에 특이적인 TCR α 쇄를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열을 조혈전구세포 내로 도입하기 위해 사용되는 것인, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 바이러스 벡터가 레트로바이러스 벡터인 것인, 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인 것인, 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 바이러스 벡터가 형질도입을 위한 유전자 마커를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 형질도입을 위한 유전자 마커가 녹색 형광 단백질 또는 인간 CD2의 세포외 도메인을 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 간질세포가 델타-유사-1을 발현하는 것인, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 간질세포가 OP9로부터 유래하는 것인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 단계 (b)로부터 생성되는 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포를 MHC-펩타이드 사랑체 염색으로 선별하는 것을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 단계 (b)로부터 생성되는 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포가 복수회의 MHC-펩타이드 사랑체 염색으로 선별되는 것인, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 바이러스 벡터가, 단계 (b)로부터의 다양한 TCR쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포 내로 도입하기 위해 사용되는 것인, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 바이러스 벡터가 레트로바이러스 벡터인 것인, 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인 것인, 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 바이러스 벡터가 형질도입을 위한 유전자 마커를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 형질도입을 위한 유전자 마커가 녹색 형광 단백질을 포함하는 것인, 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포가 TCR α / β 58 T 세포 하이브리도마로부터 유래하는 것인, 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 증강된 친화성 TCR이 인간 TCR인 것인, 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, MHC 분자가 부류 I MHC 분자 또는 부류 II MHC 분자를 포함하는 것인, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, MHC 분자가 HLA-A2 및 인간 베타-2-미크로글로불린(β 2M)을 포함하는 것인, 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 펩타이드 항원이 바이러스 항원, 세균 항원, 암 항원 및 자가면역 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 펩타이드 항원이 WT1 펩타이드 항원 또는 메소텔린 펩타이드 항원인, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, WT1 펩타이드 항원이 아미노산 서열 RMFPNAPYL(서열번호 2)을 포함하는 것인, 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 메소텔린 펩타이드 항원이 아미노산 서열 GQKMNAQAI(서열번호 31)을 포함하는 것인, 방법.

청구항 27

제1항에 있어서, 펩타이드 항원이 배양 중의 조혈전구세포 및 간질세포에 첨가되는 것인, 방법.

청구항 28

제1항에 있어서, 간질세포가 펩타이드 항원을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 29

제1항에 있어서, DN TCR $\alpha\beta^+$ 흉선세포로부터 다양한 TCR β 쇠를 인코딩하는 핵산 서열을 단리하는 것이, 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포 내로 선택된 TCR β 쇠를 도입하기 전에, 모체 TCR β 쇠와 동일한 V_β 유전자를 갖는 TCR β 쇠를 선별하는 것을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 30

제1항의 방법에 의해 생성되는 증강된 친화성 TCR.

청구항 31

제1항의 방법에 의해 생성되는 증강된 친화성 TCR 및 세포독성 또는 검출가능한 성분을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 32

제23항 또는 제24항의 방법에 의해 생성되는 증강된 친화성 TCR.

청구항 33

제1항의 방법에 의해 생성되는 증강된 친화성 TCR 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 34

제1항의 방법으로 생성되는 증강된 친화성 TCR을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 질환을 치료하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 질환이 바이러스 감염, 세균 감염, 암 및 자가면역 질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 대상체가 인간인 것인, 방법.

청구항 37

제34항에 있어서, 증강된 TCR이 가용성 TCR로서 대상체에게 투여되는 것인, 방법.

청구항 38

제34항에 있어서, 대상체에게 증강된 친화성 TCR을 포함하는 T 세포를 투여하는 것인, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, T 세포가 조절성 T 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 40

제38항에 있어서, T 세포가 CD8⁺ T 세포 또는 CD4⁺ T 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 41

제38항에 있어서, T 세포가 자가 T 세포인 것인, 방법.

명세서

기술분야

- [0001] 관련 출원의 상호 참조
- [0002] 본 출원은, 이의 전체가 본원에서 참조로서 도입되는, 2012년 5월 3일자로 출원된 미국 가출원 제61/642,358호에 대해 35 U.S.C. § 119(e)하의 이익을 주장한다.
- [0003] 서열 목록에 관한 진술
- [0004] 본 출원과 관련된 서열 목록은 문서 사본을 대신에 텍스트 형식으로 제공되고, 명세서 중에 참조로서 도입된다. 서열 목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 360056_412WO_SEQUENCE_LISTING.TXT이다. 텍스트 파일은 129KB이고, 2013년 5월 2일에 작성되었으며, EFS-Web를 통해 전자적 문서로 제출된다.
- [0005] 정부 권리의 진술
- [0006] 본 발명은 미국 건강/국립 암 연구소의 국립 연구소에 의해 부여된 계약 번호 P01 CA 18029하에 미국 정부의 지원을 받아 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 있어서 일정의 권리를 갖는다.
- [0007] 기술 분야
- [0008] 본 발명은 증강된 친화성 T 세포 수용체(TCR) 및, 보다 특히 항원 특이적 TCR α를 발현하는 조혈전구세포의 효능제 선택을 사용하여 증강된 친화성 TCR을 생성하는 방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0009] TCR 유전자 치료는 종양 항원-특이적 T 세포 클론을 단리, 특성화 및 확장하는데 필요한 대규모 시간 및 노력 등과 같이 종래의 T 세포 양자 면역요법과 관련된 다수의 장애를 극복할 수 있는 새로운 치료 방법이다[참조: Schmitt, Ragnarsson, & Greenberg, 2009, Hum. Gene Ther. 20:1240-1248]. 유전자 치료법의 추가의 잇점은 생체내에서 장기간 지속할 수 있는 T 세포의 정의된 모집단을 이용하는 능력을 포함한다[참조: Berger et al., 2008, J. Clin. Invest. 118:294-305; Hinrichs et al., 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:17469-17474]. 이러한 T 세포는, 종양 항원에 대해 고친화성을 가져 항종양 효과를 매개할 가능성을 증가시키는, 잘 특성화된 TCR을 인코딩하는 유전자로 형질도입할 수 있다. 실제, 자가/종양-항원을 표적화하는 고친화성 키메라 수용체를 발현하는 유전자 변형된 T 세포를 사용하여 고도의 B 세포 백혈병을 표적화하는 치료법에 대한 최근의 보고는 백혈병을 치료하기 위해 조작된 고친화성 T 세포를 사용할 가능성을 강조해 왔다[참조: Kalos et al., 2011, Sci. Transl. Med. 3:95ra73]. 그러나, T 세포 면역요법에 의해 표적화된 대부분의 종양 항원은 과발현된 자가 단백질이기 때문에, 이들 항원에 특이적인 고친화성 T 세포는 일반적으로 흉선에서 음성 선택의 대상이 된다. 따라서, T 세포 기반 면역요법의 한 가지 중요한 제한은 일반적으로 비돌연변이된 종양 항원에 대해 충분히 고친화성을 갖는 내인성 TCR을 발현하는 T 세포의 제한된 이용가능성이다.
- [0010] 몇몇 전략은 TCR 유전자 치료에서 사용하기 위해 의도된 TCR의 친화성을 증강시키기 위해 개발되었다[참조: Richman & Kranz, 2007, Biomol. Eng. 24:361-373; Udyavar et al., 2009, J. Immunol. 182:4439-4447; Zhao et al., 2007, J. Immunol. 179:5845-5854]. 이들 방법은 표적 펩타이드/MHC 리간드에 대해 보다 고친화성을 부여하는 수회의 돌연변이유발 및 후속의 돌연변이체 스크리닝을 겪은 TCR 돌연변이체의 라이브러리의 생성을 수반한다. 돌연변이는 펩타이드/MHC와 상호작용하는 것으로 공지된 CDR 영역에서 일반적으로 이루어진다. CDR1 및 CDR2 영역은 MHC 분자와 주로 접촉하고, 초가변성 CDR3 영역은 주로 펩타이드를 접촉한다[참조: Wucherpfennig et al., 2010, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2:a005140-a005140]. 부위-지정 돌연변이유발 전략은 일반적으로 이들 영역 3개 모두의 선택된 부분을 표적화하지만, 보다 고친화성 변이체를 생성하는데 항상 성공한 것은 아니며, 개선은 단지 특이적으로 표적화된 영역에서의 변화로 제한된다. 더욱이, MHC 접촉 장기 내로 도입된 돌연변이는 이의 동족 펩타이드에 대한 수용체의 전체 특이성을 감소시키면서 MHC에

대한 TCR의 친화성을 잠재적으로 증가시킬 위험성을 갖는다. 이상적으로, TCR의 친화성을 증강시키기 위해 도입된 대부분의 돌연변이는 이러한 이유로 CDR3 영역으로 제한될 것이다. 그러나, 현재의 방법들은, 부위-지정 돌연변이유발이 CDR3 영역의 본래 길이에 의해 제약되기 때문에, CDR3 다양성을 생성하는 능력이 제한되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

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

과제의 해결 수단

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

[0013] 추가의 양상에서, 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 증강된 친화성 TCR이 제공되고, 이는 세포 결합된 또는 가용성 형태일 수 있고 추가로 T 세포에서의 발현을 증강시키기 위해 최적화된 코돈일 수 있다.

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

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

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1a 내지 1d: OT-1 유전자도입 마우스로부터의 흉선세포는 TCR β⁻TCR γ δ⁻CD4⁻CD8⁻CD117⁺CD44⁺ DN1 및 DN2 전구 세포에 대해 선별하고, 지시된 바와 같이 난알부민 SIINFEKL 펩타이드(서열번호 1)의 다양한 농도의 존재하에 20일 동안 MHC 부류 I H-2Kb 분자를 발현하는 OP9-DL1 세포 상에서 배양했다. (A, B, C) 배양물은 지시된 시점에서 유동 세포분석에 의해 분석했다. (D) 각 배양물의 전체 세포성은 배양 20일에 측정했다.

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

도 3a 내지 3c: B6 흉선세포를 CD4⁻CD8⁻CD117⁺CD44⁺ DN1 및 DN2 전구 세포에 대해 선별하고, 친화성 증강된 WT1 특이적 TCR 3D 클론의 TCR α쇄를 형질도입하고, 1 μM의 WT1 펩타이드 RMPFNAPYL(서열번호 2)의 존재 또는 부재하에 MHC 부류 I H-2Db 분자를 발현하는 OP9-DL1 세포 상에서 배양했다. (A) 배양 16일에, 형질도입된(hCD2⁺)

및 비형질도입된(hCD2⁻) 세포를 유동 세포분석에 의해 분석했다. (B) 1mM WT1 펩타이드 RMPFNAPYL(서열번호 2)의 존재하에 OP9-DL1 배양 21일에, DN TCR α β⁺ 세포를 지시된 계획에 따라 선별했다. (C) 선별된 세포를 용해시키고, DNA를 단리하고, Vb10-특이적 전방 프라이머 및 Cb2-특이적 역방 프라이머를 사용하여 PCR을 수행했다. 이어서, Vb10 PCR 생성물은 벡터 pENTR/D-TOPO로 지향 TOPO-클로닝시키고, 게이트웨이(Gateway[®]) 기술을 사용하여 레트로바이러스 벡터 MigR1-attR로 이동시키고, 레트로바이러스 상청액을 생성하고, 기재된 바와 같이 라이브러리 스크리닝을 위한 마우스 58^{-/-} 세포의 형질도입에 사용했다.

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

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

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

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

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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

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

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

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

[0021] 본 명세서에서, 용어 "약" 및 "실질적으로 이루어진"은, 달리 지시되지 않는 한, 지시된 범위, 값 또는 구조의

±20%를 의미한다. 본원에 사용된 용어 "하나" (a, an)은 열거된 성분의 "하나 또는 그 이상"을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 대체(예를 들면, "또는")의 사용은 어느 하나, 둘 다, 또는 대체의 임의의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포함한다", "갖는다" 및 "포함하는"은 동의적으로 사용되고, 이의 용어 및 변형태는 비제한적인 것으로 해석되는 것을 의도한다.

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

[0023] 본 발명의 TCR 및 이의 결합 도메인은 "면역특이적"일 수 있거나, 이들이 친화성 또는, 예를 들면, 약 $10^5 M^{-1}$, $10^6 M^{-1}$, $10^7 M^{-1}$, $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$ 또는 $10^{13} M^{-1}$ 이상의 K_d (즉, 1/M의 단위를 갖는 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수)을 갖는 표적 분자와 결합하는 경우, 시험 샘플에 존재하는 기타 성분과 현저히 결합하지 않으면서 표적과 "특이적으로 또는 선택적으로 결합"하는 것을 포함하여 목적하는 정도로 결합할 수 있다. "고친화성" 결합 도메인은 적어도 $10^7 M^{-1}$, 적어도 $10^8 M^{-1}$, 적어도 $10^9 M^{-1}$, 적어도 $10^{10} M^{-1}$, 적어도 $10^{11} M^{-1}$, 적어도 $10^{12} M^{-1}$, 적어도 $10^{13} M^{-1}$ 이상의 K_d 를 갖는 이들 결합 도메인을 지칭한다. 대안적으로, 친화성은 M의 단위(예: $10^{-5} M$ 내지 $10^{-13} M$)를 갖는 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수(K_d)로서 정의될 수 있다. 본 발명에 따르는 TCR 및 결합 도메인 폴리펩타이드의 친화성은 통상의 기술을 사용하여 용이하게 측정할 수 있다 [참조: Scatchard et al. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660; 및 U.S. Pat. Nos. 5,283,173; 5,468,614, Biacore^R analysis, 또는 이의 등가물]. 따라서, "증강된 친화성 T 세포 수용체"(증강된 친화성 TCR)는 야생형(또는 친) TCR이 아닌 표적 항원에 대해 강력한 결합을 갖는 선택된 또는 조작된 TCR을 지칭한다. 증강된 친화성은, 야생형(또한 모체 또는 본래로서 불리움) TCR의 것보다 높은 표적 항원의 경우에 K_a (평형 결합 상수)를 갖는 TCR에 의해, 야생형(또한 모체 또는 본래로서 불리움) TCR보다 작은 표적 항원의 경우에 K_d (해리 상수)를 갖는 TCR에 의해, 또는 야생형(또는 친) TCR보다 작은 표적 항원의 경우에 오프-속도(K_{off})로 지시될 수 있다.

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

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

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

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

- [0028] "T 세포 계통의 세포"는 기타 림프구 세포로부터의 세포 및 적혈구 또는 골수 계통의 세포를 구별하는 T 세포 또는 이의 전구체 또는 선조의 적어도 하나의 표현형 특성을 나타내는 세포를 지칭한다. 이러한 표현형 특징은 T 세포(예: CD8⁺)에 특이적인 하나 또는 그 이상의 단백질의 발현, 또는 T 세포에 특이적인 생리학적, 형태학적, 기능학적 또는 면역학적 특성을 포함할 수 있다. 예를 들면, T 세포 계통의 세포는 T 세포 계통에 위탁된 선조 또는 전구체 세포; CD25⁺ 미성숙 및 불활성화된 T 세포; CD4 또는 CD8 계통 위탁을 받은 세포; CD4⁺CD8⁺ 이중 양성인 흉선전구세포; 단일 양성 CD4⁺ 또는 CD8⁺; TCR α β 또는 TCR γ δ; 또는 성숙 및 작용성 또는 활성화된 T 세포일 수 있다.
- [0029] "간질세포"는 임의 기관의 결합 조직 세포이다. 특정 실시형태에서, 간질세포는 골수 간질세포이다. DLL1 또는 DLL4를 발현하도록 조작될 수 있는 간질세포주의 예는 마우스 간질세포주 MS5[참조: Itoh, et al., Exp. Hematol. 1989, 17:145-153] 및 S17, 및 인간 간질세포주 HGS2.11, HGS2.52, HGS.18, HGS3.30, HGS3.65, HGS.3.66, HGS3.103, 및 HGS3.114[휴먼 게놈 사이언스 인코포레이티드사에서 입수가능, MD, 미국 공개 출원 제20020001826호 참조]를 포함한다. 특정 실시형태에서, OP9 세포[참조: Kodama et al., 1994, Exp. Hematol. 22:979-984; 리켄 세포 보관소에 입수가능]가 사용된다. DLL1 및 DLL4를 발현하는 OP9 세포는 이미 기재되어 있다[참조: Schmitt et al., 2002, Immunity:17:749-756; U.S. Patent No. 7,575,925].
- [0030] "이중 음성 TCR α β 흉선세포"(DN TCR α β 흉선세포)는, CD4 및 CD8 공-수용체를 발현하지 않지만 TCR α 및 β쇄를 발현하는 흉선세포의 모집단을 지칭한다.
- [0031] "펩타이드 항원"은, 항원으로서 TCR 또는 이의 결합 도메인에 의해 특이적으로 인식되고 보다 긴 표적 생물학적 분자(예: 폴리펩타이드, 단백질)의 단편 또는 이의 유도체로부터 유래하거나 이에 기반할 수 있는 약 7개 아미노산 내지 약 25개 아미노산 길이 범위의 아미노산 서열을 지칭한다. 항원은 세포 표면 상에서, 세포 내에서, 또는 내재성 막 단백질로서 발현될 수 있다. 항원은 숙주 유래(예: 종양 항원, 자가면역 항원)될 수 있거나 외래 기원(예: 세균, 바이러스)일 수 있다.
- [0032] "핵산 서열" 또는 폴리뉴클레오타이드는 cDNA, 게놈 DNA 및 합성 DNA를 포함하는 RNA 또는 DNA의 형태일 수 있다. 핵산 서열은 이중사슬 또는 단일사슬일 수 있고, 단일사슬인 경우, 코딩 쇠 또는 비-코딩(안티센스 쇠) 쇠일 수 있다. 코딩 서열은 당해 기술분야에 공지된 코딩 서열과 동일할 수 있거나 상이한 코딩 서열일 수 있고, 이는 유전자 코드의 중복 또는 축중의 결과로서 또는 스플라이싱에 의해 동일한 폴리펩타이드를 인코딩한다.
- [0033] "비내인성"은, 분자가 도입, 예를 들면, 재조합에 의해 도입되는 숙주 세포(들)/샘플에 존재하지 않는 분자(예: 핵산 서열)를 지칭한다. 비내인성 분자는 동일한 종 또는 상이한 종의 것일 수 있다.
- [0034] 노치 리간드 "델타-유사-1"(DL1 또는 DLL1) 및 "델타-유사-4"(DL4 또는 DLL4)는 노치 델타 리간드의 동족체이고, 델타/세레이트(serrate)/재기드(jagged) 단백질 부류의 구성원이다. 이들은 조혈 동안 세포 운명 결정의 매개에서 중요한 역할을 하고, 세포-대-세포 통신에서 중요한 역할을 할 수 있다. 예시적 델타-유사-1 서열은 진뱅크(Genbank) 수탁 번호 NM_005618.3(서열번호 3) 및 NP_005609.3(서열번호 4)(각각 호모 사피엔스(*Homo sapiens*) 전사물 및 단백질 서열) 및 진뱅크 수탁 번호 NM_007865.3(서열번호 5) 및 NP_031891.2(서열번호 6)(각각 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 전사물 및 단백질 서열)을 포함한다. 예시적 델타-유사-4 서열은 진뱅크 수탁 번호 NM_019074.3(서열번호 7) 및 NP_061947.1(서열번호 8)(각각 호모 사피엔스(*Homo sapiens*) 전사물 및 단백질 서열) 및 진뱅크 수탁 번호 NM_019454.3(서열번호 9) 및 NP_062327.2(서열번호 10)(각각 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 전사물 및 단백질 서열)을 포함한다. 노치 리간드는 상업적으로 입수가능하거나, 표준 재조합 DNA 기술로 생산되어 다양한 정도로 정제할 수 있다.
- [0035] "배아줄기세포" 또는 "ES 세포" 또는 "ESC"는 발생 배의 생식 세포로 통합되어 이의 일부로 되는 능력을 갖는 미분화 배아줄기세포를 지칭한다. 배아줄기세포는 조혈전구세포로 분화할 수 있다. 본원에서 사용하기에 적합한 배아줄기세포는 J1 ES 세포주, 129J ES 세포주, 마우스 줄기 세포주 D3(아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection) 카탈로그 # CRL 1934), 129/Sv 마우스로부터 유래하는 R1 또는 E14K 세포주, Balb/c 및 C57Bl/6 마우스로부터 유래하는 세포주 및 인간 배아줄기세포[예를 들면, 위셀 리서치 인스티튜트(WiCell Research Institute)사, WI; 또는 ES 셀 인터네셔널(ES cell International)사, 멜버른, 오스트레일리아]으로부터의 세포를 포함한다.
- [0036] "WT1"은 빌름 종양(Wilm's tumor) 1, C-말단에 4개의 징크-핑거 모티프 및 N-말단에 프롤린/글루타민-풍부 DNA 결합 도메인을 함유하는 전사 인자를 지칭한다. WT1은 노생식 시스템의 정상 발달에서 중요한 역할을 갖고, 빌

를 중앙을 갖는 환자의 작은 서브세트에서 돌연변이된다. WT1의 고도 발현은 유방암, 난소암, 급성 백혈병, 혈관 종양, 흑색종, 결장암, 폐암, 갑상선암, 골 및 연질 조직 육종, 및 식도암을 포함하는 다양한 암에서 관찰된다. 선택적 스플라이싱은 WT1을 위해 주목된다. 예시적 WT1 서열은 진뱅크 수탁 번호: NM_000378.4(서열번호 11)(인간 전사물), NP_000369.3(서열번호 12)(인간 단백질); NM_024424.3(서열번호 13)(인간 전사물), NP_077742.2(서열번호 14)(인간 단백질); NM_024426.4(서열번호 15)(인간 전사물), NP_077744.3(서열번호 16); NM_001198552.1(서열번호 17), NP_001185481.1(서열번호 18)(인간 단백질); NM_001198551.1(서열번호 19)(인간 전사물), NP_001185480.1(서열번호 20)(인간 단백질); NM_144783.2(서열번호 21)(마우스 전사물), 및 NP_659032.3(서열번호 22)(마우스 단백질)을 포함한다.

[0037]

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

[0038]

"MHC-펩타이드 사랑체 염색"은 MHC 분자의 사랑체를 특징으로 하는 항원-특이적 T 세포의 검출에 사용된 분석을 지칭하고, 각각은 적어도 하나의 항원에 동족(예를 들어, 동일 또는 관련되는)인 아미노산 서열을 갖는 동일한 펩타이드를 포함하고, 여기서 복합체는 동족 항원에 특이적인 T 세포에 결합할 수 있다. 각각의 MHC 분자는 비오틴 분자로 태그 부착할 수 있다. 비오틴화 MHC/펩타이드는 통상 형광 표지되는 스트렙타비딘의 부가에 의해 사랑체화된다. 사랑체는 형광 표지를 통한 유동 세포분석에 의해 검출할 수 있다. 특정한 실시형태에서, MHC-펩타이드 사랑체 분석은 본 발명의 고친화성 TCR의 검출 또는 선택에 사용된다.

[0039]

증강된 친화성 TCR을 생성하는 방법

[0040]

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

[0041]

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

[0042]

특정 실시형태에서, 본 발명은, a) 조혈전구세포를, DN TCR $\alpha\beta$ ⁺ 흉선세포로 조혈전구세포의 분화를 유도하는데 충분한 조건하 및 시간 동안 간질세포 및 펩타이드 항원과 접촉시키는 단계로서, 상기 조혈전구세포는 펩타이드

항원에 특이적인 모체 TCR로부터의 TCR α쇄를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열을 포함하고, 상기 간질세포는 델타-유사-1 또는 델타-유사-4를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열 및 MHC 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단계; , b) DN TCR αβ⁺ 흉선세포로부터 다양한 TCRβ쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 단리하고, TCRβ쇄를 인코딩하는 핵산 서열을, 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있고 단계 (a)로부터의 TCR α쇄를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 세포 내로 도입하는 단계; 및 c) 증강된 친화성 TCR을 동정하는 단계 (예를 들어, MHC 사랑체 분석에 의해 고친화성 TCR αβ 후보를 검출 또는 선택하고, 이어서 모체 TCR αβ와 비교하여 결합 친화성을 측정함으로써)를 포함하는, 증강된 친화성 T 세포 수용체(TCR)을 생성하는 방법을 제공한다.

[0043] 특정 실시형태에서, 조혈전구세포는 흉선전구세포 또는 배아줄기세포를 포함한다. 기타 실시형태에서, 조혈전구세포는 태아 간 조직으로부터 유래한다. 기타 실시형태에서, 조혈전구세포는 골수, 재대혈 또는 말초혈로부터 유래하거나 이로부터 기원하는 조혈줄기세포를 포함한다. 기타 실시형태에서, 조혈전구세포는 인간, 마우스, 랫트 또는 기타 포유동물로부터 유래한다. 특정 실시형태에서, CD24^{lo} Lin⁻ CD117⁺ 흉선전구세포가 사용된다.

[0044] 조혈전구세포는, 펩타이드 항원에 특이적인 모체 TCR로부터의 TCR α쇄를 인코딩하는 비-내인성 핵산 서열을 포함하도록 변형된다. 특정한 실시형태에서, TCRβ쇄는 또한 모체 TCR로부터 단리된다. TCR α 및 β쇄의 클로닝은 당해 기술분야에 공지된 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 수행할 수 있다. TCR쇄를 클로닝하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: Walchli et al., 2011, PLoS ONE 6:e27930; Birkholz et al., 2009, J. Immunol. Method 346:45-54; Kurokawa et al., 2001, Clin. Exp. Immunol. 123:340-345].

[0045] "간질세포"는 임의의 기관의 결합 조직 세포이다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 간질세포는 인간 및 마우스 간질세포를 포함한다. DL1 또는 DL4를 발현하도록 조작될 수 있는 간질세포주의 예는 마우스 간질세포주 MS5(Itoh, et al., Exp. Hematol. 1989, 17:145-153) 및 S17, 및 인간 간질세포주 HGS2.11, HGS2.52, HGS.18, HGS3.30, HGS3.65, HGS.3.66, HGS3.103, 및 HGS3.114(휴먼 게놈 사이언시스 인코포레이티드사에서 입수가능, MD, US 공개 출원 제20020001826호 참조). 특정 실시형태에서, 간질세포는 골수 간질세포이다. 추가의 실시형태에서, OP9 세포가 사용된다.

[0046] 특정 실시형태에서, 간질세포는 인간 DL1 등의 DL1을 인코딩하는 비내인성 핵산 서열을 포함한다. 예시적 델타-유사-1 서열은 진뱅크 수탁 번호 NM_005618.3(서열번호 3) 및 NP_005609.3(서열번호 4)(각각 호모 사피엔스(*Homo sapiens*) 전사물 및 단백질 서열) 및 진뱅크 수탁 번호 NM_007865.3(서열번호 5) 및 NP_031891.2(서열번호 6)(각각 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 전사물 및 단백질 서열)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 간질세포는 인간 DL4 등의 DL4를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열을 포함한다. 예시적 델타-유사-4 서열은 진뱅크 수탁 번호 NM_019074.3(서열번호 7) 및 NP_061947.1(서열번호 8)(각각 호모 사피엔스(*Homo sapiens*) 전사물 및 단백질 서열) 및 진뱅크 수탁 번호 NM_019454.3(서열번호 9) 및 NP_062327.2(서열번호 10)(각각 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 전사물 및 단백질 서열)을 포함한다. 노치 리간드는 상업적으로 입수가능하거나, 표준 제조합 DNA 기술에 의해 생산되고 다양한 정도로 정제할 수 있다.

[0047] 추가의 실시형태에서, 간질세포는 OP9 세포, 또는 인간 DL1 등의 DL1을 발현하는 이의 유도체이다. DL1 및 DL4를 발현하는 OP9 세포는 이미 기재되어 있다[참조: Schmitt et al., 2002, Immunity 17:749-756; U.S. Patent No. 7,575,925].

[0048] 특정 실시형태에서, 간질세포는 또한 MHC 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 간질세포는 MHC 부류 I 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하고, 임의로 또한 β2 마이크로글로불린을 인코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. MHC 부류 I 및 β2 마이크로글로불린 분자는 인간, 마우스, 랫트 또는 기타 포유동물 중 MHC 부류 I 분자로부터 유래할 수 있고, 이의 유전자 및 단백질 서열은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 다른 실시형태에서, 간질세포는 MHC 부류 II 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함한다. MHC 부류 II 분자는 인간, 마우스, 랫트 또는 기타 포유동물 중 MHC 분자로부터 유래하고, 이의 유전자 및 단백질 서열은 당해 기술분야에 공지되어 있다.

[0049] 제공된 T 세포는, 숙주 세포의 MHC 분자(MHC-제한된 항원 인식)에 결합되는 경우에만 펩타이드 항원을 인식할 것이다. 공지된 펩타이드 항원에 대해 특이성을 갖는 모체 TCR은 기재된 방법을 사용하여 TCR 친화성의 증강을 위해 선택된다. 따라서, 특정 펩타이드 항원에 결합하는 MHC 분자가 또한 선택되고 간질세포에서 발현되어 개시된 시험관내 시스템에서 MHC-제한된 항원 인식을 가능하게 한다. 펩타이드 항원에 결합하는 MHC 분자를 동정하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: Akatsuka et al., 2002, Tissue Antigens 59:502-511]. 특정 실시형태에서, MHC 분자는 바람직하게는 인간 기원의 HLA-A2 및 베타-2 마이크로글로불린을 포함하고, 이는, 예

를 들면, WT1 펩타이드 RMFPNAPYL(서열번호 2)에 결합할 수 있다. 기타 실시형태에서, MHC 분자는, 예를 들면, 문헌[참조: Hung et al., 2007, Gene Therapy 14:921-929]의 도 3a에 개시된 바와 같은 WT1 펩타이드 RMFPNAPYL 또는 다양한 메소텔린 펩타이드에 결합할 수 있는 마우스 H-2D^b, 또는 문헌[참조: Hung et al.]의 도 3a에 개시된 바와 같은 다양한 메소텔린 펩타이드에 결합할 수 있는 H-2K^b를 포함한다. 문헌[참조: Hung et al.]에 개시된 잠재적 H-2D^b 제한된 메소텔린 에피토프는 ISKANVDVL(서열번호 42), GQKMNAQAI(서열번호 43), SAFQNVSGL(서열번호 44) 및 LLGPNIVDL(서열번호 45)을 포함한다. 문헌[참조: Hung et al.]에 개시된 잠재적 H-2K^b 제한된 메소텔린 에피토프는 EIPFTYEQL(서열번호 46) 및 GIPNGYLVL(서열번호 47)을 포함한다.

[0050]

개시된 방법에 사용된 펩타이드 항원은 항원의 펩타이드 서열, 또는 모체 TCR이 특이적으로 결합하는 표적 생물학적 분자(예: 폴리펩타이드, 단백질)를 지칭한다. 펩타이드 서열은 세포 표면 상에서, 세포 내에서 발견되는 항원으로부터 유래할 수 있거나, 완전한 막 단백질이다. 항원은 숙주 유래된 항원(예: 종양/암 항원, 및 자가면역 항원)일 수 있거나, 외인성 항원(예: 바이러스, 세균, 원충 항원)일 수 있다. 종양 또는 암 항원은 다양한 암, 예를 들면, 본원에 기재된 것들로부터 유래할 수 있다. 일부 실시형태에서, 암 항원은 백혈병 항원을 포함한다. 특정한 실시형태에서, 펩타이드 항원은 빌름 종양 1(WT1), 예를 들면, 아미노산 서열 RMFPNAPYL(서열번호 2)을 포함하는 WT1 펩타이드로부터 유래된다. 특정 실시형태에서, 펩타이드 항원은 메소텔린, 예를 들면, 문헌[참조: Hung et al., 2007, Gene Therapy 14:921-929]의 도 3a에 개시된 메소텔린 펩타이드로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 메소텔린 펩타이드는 아미노산 서열 GQKMNAQAI(서열번호 31)을 포함한다. 다른 실시형태에서, 메소텔린 펩타이드는 ISKANVDVL(서열번호 42), GQKMNAQAI(서열번호 43), SAFQNVSGL(서열번호 44), 및 LLGPNIVDL(서열번호 45), EIPFTYEQL(서열번호 46), 또는 GIPNGYLVL(서열번호 47)을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 자가면역 항원은 자가-항원에 특이적인 자가반응성 TCR에 의해 인식되는 항원이고, 후속의 면역 효과 기 기능은 자가면역 질환을 유발하고, 자가면역 질환을 악화시키고, 자가면역 질환의 진행에 기여하고, 자가면역 질환과 관련된 증상을 유발 또는 악화시킨다. 예를 들면, 콜라겐 펩타이드에 특이적인 자가반응성 TCR은 류마티스성 관절염에서 Treg의 억제 유전자 치료에 유용할 수 있다. 자가면역 항원은 또한 자가면역 질환을 유발하거나 자가면역 질환의 증상을 매개하는 기타 면역 세포(예를 들면, 자가항체를 생성하는 B 세포) 상에 위치하는 항원일 수 있다. 예를 들면, CD20 펩타이드 항원은 류마티스성 관절염에 수반되거나 이와 관련된 B 세포를 표적화하는 증강된 친화성 TCR의 생성에 유용할 수 있다. 펩타이드 항원은 본원에 개시된 바와 같이 조절면역세포 및 간질세포에 대한 배양 시스템에 첨가될 수 있다. 또는, 목적하는 펩타이드 항원을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 간질세포는 세포 배양물에서 이러한 항원을 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 이론에 국한시키고자 하는 것은 아니지만, 펩타이드 항원은, 외인성 펩타이드 항원으로서 배양 시스템에 첨가되거나 간질세포에 의해 발현되는지, 간질세포에 의해 발현된 MHC 분자와 복합체를 형성하여 MHC-펩타이드 항원 복합체를 형성한다. MHC-펩타이드 항원 복합체는 배양 시스템에서 TCR에 의한 MHC-제한된 펩타이드 항원 인식을 가능하게 한다. 특정한 실시형태에서, OP9 세포는 핵산 서열로 형질도입되어 WT1 항원 펩타이드 RMFPNAPYL(서열번호 2)을 발현한다. 다른 실시형태에서, OP9 세포는 핵산 서열로 형질도입되어 메소텔린 항원 펩타이드 GQKMNAQAI(서열번호 31)을 발현한다.

[0051]

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

[0052]

"백터"는 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자이다. 백터는, 예를 들면, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 또는 파지일 수 있다. "발현 백터"는, 적절한 환경에 존재하는 경우, 백터에 의해 운반된 하나 또는 그 이상의 유전자에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 유도할 수 있는 백터이다.

[0053]

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

[0054]

"렌티바이러스"는 분화 및 미분화 세포를 감염시킬 수 있는 레트로바이러스의 속을 지칭한다. 렌티바이러스의 몇몇 예는 HIV(인간 면역결핍 바이러스: HIV 유형 1 및 HIV 유형 2 포함); 말 감염성 빈혈 바이러스; 고양이 면

역결핍 바이러스(FIV); 소 면역 결핍 바이러스(BIV) 및 유인원 면역결핍 바이러스(SIV)를 포함한다.

- [0055] 코어 바이러스를 인코딩하는 벡터는 또한 "바이러스 벡터"로서 공지되어 있다. 문헌[참조: Pfeifer and Verma, Pfeifer, A. and I. M. Verma. 2001. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:177-211]에 기재된 것들과 같이 인간 유전자 치료 분야를 위해 동정된 것들을 포함하여 본 발명에서 사용하기 적합한 다수의 이용가능한 바이러스 벡터가 있다. 몇몇 바이러스 벡터는 RNA 바이러스에 기반한 벡터, 예를 들면, 레트로바이러스-유래된 벡터, 예를 들면, 몰로니 마우스 백혈병 바이러스(MLV)-유래된 벡터를 포함하고, 보다 복잡한 레트로바이러스-유래된 벡터, 예를 들면, 렌티바이러스-유래된 벡터를 포함한다. HIV-1-유래된 벡터는 이러한 범주에 속한다. 기타 예는 HIV-2, FIV, 말 감염성 빈혈 바이러스, SIV 및 마에디/비스나 바이러스를 포함한다. 포유동물 표적 세포를 TCR 도입 유전자를 함유하는 바이러스 벡터로 형질도입하기 위해 바이러스 입자 레트로바이러스 및 렌티바이러스 바이러스 벡터 및 팩킹 세포를 사용하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[참조: U.S. Patent 8,119,772; Walchli et al., 2011, *PLoS One* 6:327930; Zhao et al., *J. Immunol.*, 2005, 174:4415-4423; Engels et al., 2003, *Hum. Gene Ther.* 14:1155-68; Frecha et al., 2010, *Mol. Ther.* 18:1748-57; Verhoeyen et al., 2009, *Methods Mol. Biol.* 506:97-114]에 이미 기재되어 있다. 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터 작제물 및 발현 시스템은 또한 상업적으로 입수가능하다.
- [0056] 특정한 실시형태에서, 바이러스 벡터는 퀵타이드 항원에 특이적인 TCR α 쇄를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열을 조혈전구세포 내로 도입하기 위해 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 바이러스 벡터는 DL1 또는 DL4를 인코딩하는 비내인성 핵산 서열 및 MHC 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 간질세포 내로 도입하기 위해 사용된다. 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터일 수 있다. 바이러스 벡터는 또한 형질도입을 위한 마커를 인코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 바이러스 벡터를 위한 형질도입 마커는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 약물 내성을 부여할 수 있는 선택 마커, 또는 검출가능한 마커, 예를 들면, 형광 마커, 또는 유동 세포분석에 의해 검출할 수 있는 세포 표면 단백질을 포함한다. 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 녹색 형광 단백질 또는 인간 CD2의 세포외 도메인을 포함하는 형질도입을 위한 유전자 마커를 추가로 포함한다. 바이러스 벡터 게놈이 분리된 전사물로서 숙주 세포에서 발현되는 하나 또는 그 이상의 핵산 서열을 포함하는 경우, 바이러스 벡터는 또한 바이시스트론 또는 멀티시스트론 발현을 가능하게 하는 2개(또는 그 이상) 전사물 사이에 추가의 서열을 또한 포함한다. 바이러스 벡터에 사용된 이러한 서열의 예는 내부 리보솜 도입 부위(IRES), 퓨린 절단 부위, 바이러스 2A 퀵타이드를 포함한다.
- [0057] 기타 벡터는 또한, 예를 들면, 아데노바이러스-기반 벡터 및 아데노-관련 바이러스(AAV)-벡터; 앰플리콘 벡터, 복제-결합 HSV 및 약독화된 HSV를 포함하는 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV)로부터 유래하는 벡터를 포함하는 DNA 바이러스 벡터를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 전달에 사용될 수 있다[참조: Krisky et al., 1998, *Gene Ther.* 5: 1517-30].
- [0058] 유전자 치료를 위해 최근 개발된 기타 벡터를 또한 본 발명의 방법에 사용할 수 있다. 이러한 벡터는 바콜로바이러스 및 알파-바이러스로부터 유래하는 것들을 포함한다[참조: Jolly D J. 1999. *Emerging virus vectors*. pp 209-40 in Friedmann T. ed. 1999. *The development of human gene therapy*. New York: Cold Spring Harbor Lab].
- [0059] 조혈전구세포는 DN TCR $\alpha \beta^+$ 흉선세포로 조혈전구세포의 분화를 유도하는데 충분한 조건하 및 시간 동안 비내인성 DL1 또는 DL4를 인코딩하는 핵산 서열 및 MHC 분자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 간질세포로 배양한다. 특정 실시형태에서, 조혈전구세포는 6cm 또는 10cm 조직 배양-처리된 접시에서 배양한다. 배양 중의 조혈전구세포의 농도는 $1-10^9$ 또는 1×10^2 내지 1×10^6 , 또는 1×10^3 내지 1×10^4 일 수 있다. 일부 실시형태에서, 조혈전구세포(약 $1-5 \times 10^4$ 세포)는 DL1을 발현하는 OP9 세포의 단층 상에서 배양된다.
- [0060] 조혈전구세포의 정형 및 분화를 촉진하는 하나 또는 그 이상의 사이토킨을 또한 배양물에 첨가할 수 있다. 사이토킨은 인간 또는 기타 종으로부터 유래할 수 있다. 배양물 중의 사이토킨의 농도는 약 1ng/ml 내지 약 50ng/ml의 범위일 수 있다. 사용될 수 있는 사이토킨의 대표적 예는 FGF-4 및 FGF-2를 포함하는 FGF 부류의 모든 구성원; Flt-3-리간드, 줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO) 및 IL-7을 포함한다. 사이토킨은 헤파린 설페이트 등의 글리코사미노글리칸과 함께 사용될 수 있다. 사이토킨은 상업적으로 입수가능하거나, 재조합 DNA 기술에 의해 생산되어 다양한 정도로 정제할 수 있다. 몇몇 사이토킨은 표준 생화학적 기술에 의해 세포주의 배양 배지로부터 정제할 수 있다.
- [0061] 조혈전구세포는 조절된 배지, 비조절된 배지 또는 배아줄기세포 배지를 포함하는 배양 배지에서 배양할 수

있다. 적합한 조절된 배지의 예는 배아 섬유아세포 세포(예: 인간 배아 섬유아세포 세포)로 조절된 IMDM, DMEM 또는 α MEM, 또는 등가의 배지를 포함한다. 적합한 비-조절된 배지의 예는 이스코브 변형된 둘베코 배지(IDMD), DMEM 또는 α MEM 또는 등가의 배지를 포함한다. 배양 배지는 혈청(예: 소 혈청, 태소 혈청, 송아지 혈청, 말 혈청, 인간 혈청 또는 인공 혈청 대체물)을 포함할 수 있거나, 혈청을 함유하지 않을 수 있다.

[0062]

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

[0063]

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

[0064]

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

[0065]

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

[0066]

일부 실시형태에서, 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포는 인간, 마우스, 랫트 또는 기타 포유동물로부터 유래하는 일차 세포 또는 세포주를 포함하는 T 세포이다. 포유동물로부터 취득되는 경우, T 세포는 혈액, 골수, 림프절, 흉선 또는 기타 조직 또는 유체를 포함하는 다수의 공급원으로부터 취득될 수 있다. T 세포는 풍

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

[0067]

잠재적 증강된 친화성 TCR을 동정하기 위해, 모체 TCR α 쇄를 또한 발현할 수 있는 세포 표면 상에서 TCR을 발현할 수 있는 세포가 후보 TCR β 쇄의 라이브러리로 형질전환 또는 형질도입되면, 항원-특이적 세포는 MHC-펩타이드 사랑체 염색을 사용하여 선별 또는 동정된다. MHC-펩타이드 사랑체 염색은 MHC 분자의 사랑체를 특징으로 하고, 각각은 적어도 하나의 항원과 동족(예를 들어, 동일하거나 관련된)인 아미노산 서열을 갖는 동일한 펩타이드를 포함하고, 여기서 상기 복합체는 동족 항원에 특이적인 T 세포에 결합할 수 있다. 각각의 MHC 분자는 비오틴 분자로 태그 부착할 수 있다. 비오틴닐화 MHC/펩타이드는, 통상 형광 표지되는 스트렙타비딘의 첨가에 의해 사랑체화된다. 사랑체는 형광 표지를 통한 유동 세포분석에 의해 검출할 수 있다. 항원 특이적 T 세포를 검출하는 MHC-펩타이드 사랑체 염색 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: Altman et al, 1996, Science 274:94-96; Kalergis et al., 2000, J. Immunol. Methods 234:61-70; Xu and Sreaton, 2002, J. Immunol. Methods 268:21-8; James et al., J. Vis. Exp.25:1167]. 특정 실시형태에서, MHC-펩타이드 사랑체는 MHC 부류 I 분자를 포함한다. 기타 실시형태에서, MHC-펩타이드 사랑체는 MHC 부류 II 분자를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 기재된 방법의 배양 단계를 사용한 동일한 펩타이드 항원은 MHC-펩타이드 사랑체 내로 도입된 펩타이드와 동일하다. 다른 실시형태에서, 개시된 방법의 배양 단계에서 간질세포에 의해 발현된 MHC 분자는 MHC-펩타이드 사랑체 중의 MHC 분자와 동일하다. MHC-펩타이드 사랑체 염색된 세포는 유동 세포분석에 의해 1회 또는 그 이상 선별할 수 있다. 1차 선별은 검출가능한 형질도입 마커(예: 녹색 형광 단백질)를 발현하는 형질도입된 세포를 선택할 수 있다. 형질도입 양성 세포는 또한 모체 TCR과 동일한 V β 쇄를 발현하는 세포를 1회 또는 그 이상 선별할 수 있다. 이들 선별의 서브세트, 또는 단일 또는 다중 세포 선별은 세포의 목적하는 아모집단을 동정하기 위해 세포 표면 또는 형질도입 마커의 상이한 조합을 사용하여 설계될 수 있음이 당해 기술분야의 숙련자에게 명백할 것이다.

[0068]

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

[0069]

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

[0070]

증강된 친화성 TCR 및 조성물

[0071]

또 다른 양상에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 증강된 친화성 TCR이 제공된다. 증강된 친화성 TCR은 세포-결합될 수 있거나(예를 들면, 성숙 T 세포의 표면 상에서 발현), 가용성 형태일 수 있다. 특정한 실시형태에

서, 증강된 친화성 TCR은 코돈 최적화되어 T 세포에서 발현을 증강시킬 수 있다[참조: Scholten et al., 2006, Clin. Immunol. 119:135-145].

[0073] 다른 실시형태에서, 증강된 친화성 TCR은 융합 단백질의 성분일 수 있고, 이는 세포독성 성분(예를 들면, 빈데신, 엽산길항제 등의 화학치료 약물; 세균 독소, 리신, 항-바이러스제)를 추가로 포함할 수 있고, 암 세포 또는 감염된 세포의 특정한 사멸 또는 파괴 또는 검출가능한 성분(예: 비오틴, 형광 잔기, 방사선택중)에 유용하고, 암 세포, 감염된 세포 또는 자가면역 공격하의 조직의 영상화에 유용하다.

[0074] 본 발명은 또한 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 증강된 친화성 TCR 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 적합한 부형제는 물, 염수, 텍스트로즈, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합을 포함한다.

[0075] 적용

[0076] 본 발명의 방법에 의해 생성된 증강된 친화성 TCR은 증강된 친화성 TCR을 포함하는 조성물을 투여함으로써 대상체에서 질환(예를 들면, 암, 감염성 질환 또는 자가면역 질환)을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0077] 증강된 친화성 TCR 요법으로 치료될 수 있는 질환은 암, 감염성 질환(바이러스, 세균, 원생동물 감염) 및 자가면역 질환을 포함한다. TCR 유전자 치료는 다양한 유형의 암[참조: Morgan et al., 2006, Science 314:126-129; reviewed in Schmitt et al., 2009, Human Gene Therapy; reviewed in June, 2007, J. Clin. Invest. 117:1466-1476] 및 감염성 질환[참조: Kitchen et al., 2009, PLoS One 4:38208; Rossi et al., 2007, Nat. Biotechnol. 25:1444-54; Zhang et al., PLoS Pathog. 6:e1001018; Luo et al., 2011, J. Mol. Med. 89:903-913]을 위한 유망한 치료법이다. 자가반응성 TCR을 포함하는 조절성 T 세포를 사용하는 자가면역 질환의 면역억제 유전자 치료는 또한 최근 생겨난 치료법이다[참조: Fujio et al., 2006, J. Immunol. 177:8140-8147; Brusko et al., 2008, Immunol. Rev. 223:371-390].

[0078] 고형 종양 및 백혈병을 포함하는 광범위한 암은 본원에 개시된 조성물 및 방법으로 처리할 수 있다. 치료될 수 있는 암의 유형은 유방, 전립선 및 결장의 선암; 폐의 기관지원성 암의 모든 형태; 골수종; 흑색종; 간장암; 신경아세포종; 유두종; 아푸도마; 분리종; 새열종; 악성 카르시노이드 증후군; 카르시노이드 심장 질환; 및 암종(예를 들면, 워커, 기저 세포, 기저편평성, 브라운-피어스, 도관, 에틀리히 종양, 크랩 2, 메르켈 세포, 점액소, 비-소세포 폐, 구리 세포, 유두, 경섬유질, 세기관지, 기관지원성, 편평 세포 및 이행 세포)을 포함한다. 치료될 수 있는 추가 유형의 암은 조직구 장애; 백혈병; 악성 조직구증; 호지킨 질환; 면역증식성 소장; 비-호지킨 림프종; 형질세포종, 세망내피종; 흑색종; 연골아세포종; 연골종; 연골육종; 섬유종; 섬유육종; 거대 세포 종양; 조직구종; 지방종, 지방육종; 증피종; 점액종; 점액육종; 골종; 골육종; 척색종, 두개인두종; 미분화세포종; 과오종; 간엽종; 증신종; 근육종; 에나멜상피종; 시멘트질종; 치아종; 기형종; 흉선종; 용모 상피종을 포함한다. 추가로, 하기 유형의 암이 또한 치료로 처리할 수 있는 것으로 고려된다: 선종; 담관암; 진주종; 원주종; 낭종암; 낭선종; 과립막 세포 종양; 음양모세포종; 간암; 한선종; 섬 세포 종양; 라이디히(Leydig) 세포 종양; 유두종; 세르톨리 세포 종양; 난모막 세포 종양; 자궁근종; 자궁육종; 근아세포종; 근종; 근육종; 횡문근종; 횡문육종; 상의세포종; 신경절세포종; 신경교종; 수모세포종; 뇌수막종; 신경집종; 신경아세포종; 신경상피종; 신경섬유종; 신경종; 부신경절종; 부신경절종 비-크로마핀. 치료될 수 있는 암의 유형은 또한 피각혈관종; 호산구 증가증을 갖는 혈관림프양 증식; 혈관 경화증; 혈관종; 사구맥관종; 혈관내피종; 혈관종; 혈관주위 세포종; 혈관육종; 림프관종; 림프관근종; 림프관육종; 송과체종; 암육종; 연골육종; 엽상 낭육종; 섬유육종; 혈관육종; 평활근육종; 백혈육종; 지방육종; 림프관육종; 근육종; 점액육종; 난소 암종; 횡문근육종; 육종; 신생물; 신경섬유종증 및 자궁경부 이형상피증을 포함한다.

[0079] 증강된 TCR 치료로 처리될 수 있는 다양한 과증식성 질환의 예는 B 세포 림프종을 포함하는 B-세포 암(예를 들면, 다양한 형태의 호지킨 질환, 비-호지킨 림프종(NHL) 또는 중추신경계 림프종), 백혈병(예를 들면, 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 모발 세포 백혈병 및 만성 근아세포 백혈병) 및 골수종(예를 들면, 다발성 골수종)이다. 추가의 B 세포 암은 작은 림프구성 림프종, B 세포 프로림프구성 백혈병, 림프형질세포 림프종, 비장 대역 림프종, 형질 세포성 골수종, 골의 고립성 형질세포종, 골의 형질세포종, 점막-관련(MALT) 림프 조직의 외질성 대역 B-세포 림프종, 결절성 대역 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 외피 세포 림프종, 분산 거대 B-세포 림프종, 종격(흉선) 거대 B-세포 림프종, 혈관내 거대 B-세포 림프종, 원발성 삼출액 림프종, 버킷 림프종/백혈병, 불확실 악성 가능성의 B-세포 증식, 림파선 육아종증 및 이식후 림프증식성 질환

을 포함한다.

[0080] 자가면역 질환은 관절염, 류마티스성 관절염, 유년형 류마티스성 관절염, 골관절염, 다발성골염, 건선성 관절염, 건선, 피부염, 다발성근염/피부근염, 봉입체 근염, 염증성 근육염, 독성 표피 괴사증, 전신성 경피증 및 경화증, CREST 증후군, 염증성 장 질환과 관련된 반응, 크론병, 궤양성 대장염, 호흡 곤란 증후군, 성인 호흡 곤란 증후군(ARDS), 수막염, 뇌염, 포도막염, 대장염, 사구체신염, 알레르기 증상, 습진, 천식, T 세포 및 만성 염증 반응의 침윤을 수반하는 증상, 아테롬성 동맥경화증, 자가면역 심근염, 백혈구 부착 결핍증, 전신성 홍반성 낭창(SLE), 아급성 피부 홍반성 낭창, 원반상 루푸스, 낭창성 척추염, 루푸스 뇌염, 청소년 발병 당뇨병, 다발성 경화증, 알레르기성 뇌척수염, 시신경 척수염, 류마티스 열, 시드남 무도병, 사이토킨 및 T-림프구에 의해 매개된 급성 및 지연된 과민증과 관련된 면역 반응, 결핵, 유육종증, 베게너 육아종증 및 처그-스트라우스 질환을 포함하는 유육종증, 무과립구증, 혈관염(과민성 혈관염/혈관염, ANCA 및 류마티스성 혈관염을 포함), 재생불량성 빈혈, 다이아몬드 블랙핀 빈혈, 자가면역 용혈성 빈혈(AIHA)을 포함하는 면역 용혈성 빈혈, 악성 빈혈, 적아구 무형성(PRCA), 인자 VIII 결핍증, 혈우병 A, 자가면역 호중구감소증, 범혈구감소증, 백혈구감소, 백혈구 누출을 수반하는 질환, 중추신경계(CNS) 염증성 질환, 다장기 손상 증후군, 중증 근무력증, 항원-항체 복합체 매개된 질환, 항-사구체 지저막 질환, 항-인지질 항체 증후군, 알레르기성 신경염, 베체트병, 케슬 증후군, 굿페스처 증후군, 램버트-이튼 근무력 증후군, 르노(Reynaud) 증후군, 소그렌 증후군, 스티븐-존슨 증후군, 고형 기관 이식 거부, 이식편 대 숙주병(GVHD), 수포성류천포창, 천포창, 자가면역 다발성 내분비병증, 혈청반응 음성 척추관절염, 라이터병, 스티프-맨 증후군, 거대 세포 동맥염, 면역 복합체 신염, IgA 신장병, IgM 다발성신경병 또는 IgM 매개된 신경병, 특발성 혈소판감소성 자반병(ITP), 혈전성 혈소판감소성 자반병(TTP), 헤노흐-쑤라인 자반병, 자가면역 혈소판감소증, 자가면역 고환염 및 난소염을 포함하는 고환 및 난소의 자가면역 질환, 원발성 갑상선 기능저하증; 자가면역 갑상선염, 만성 갑상선염(하시모토 갑상선염), 아급성 갑상선염, 특발성 갑상선 기능저하증, 에디슨 질환, 그레이브 질환, 자가면역 다선성 증후군(또는 다선성 내분비 증후군), 인슐린 의존성 진성 당뇨병(IDDM)으로 또한 지칭되는 유형 I 당뇨병 및 쉬운 증후군을 포함하는 자가면역 내분비 질환; 자가면역 간염, 림프관염성 폐렴(HIV), 기관지 폐색증(비-이식) 대 NSIP, 길랑-바레 증후군, 거대 혈관 혈관염(류마티스성 다발성근육통 및 거대 세포(다카야수)관절염 포함), 중간 혈관염(가와사키 질환 및 결절성 동맥염 포함), 결절성 다발성 동맥염(PAN) 강직성 척추염, 버제 질환(IgA 신장병), 급속 진행성 사구체 신염, 원발성 담즙성 간경변, 복강 스포루(글루텐 장병증), 한랭글로불린혈증, 간염과 관련된 한랭글로불린혈증, 근위축성 측색 경화증(ALS), 관상 동맥 질환, 가족성 지중해 열, 현미경 다발혈관염, 코간 증후군, 위스코트-알드리흐 증후군 및 폐색성혈전 혈관염을 포함한다.

[0081] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 증강된 친화성 TCR로 대상체를 치료하는 방법은 급성 골수성 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 만성 골수성 백혈병을 갖는 대상체를 포함한다.

[0082] 감염성 질환은 감염성 인자와 관련된 것들을 포함하고, 임의의 다양한 세균(예를 들면, 병원성 이. 콜라이(*E. coli*), 에스 티피무리움(*S. typhimurium*), 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*), 비. 안트라시스(*B. anthracis*), 씨. 보툴리눔(*C. botulinum*), 씨. 디피실(*C. difficile*), 씨. 퍼프린젠스(*C. perfringens*), 에이치. 필로리(*H. pylori*), 브이. 콜레라에(*V. cholerae*), 리스테리아 종(*Listeria spp.*), 리케트시아 종(*Rickettsia spp.*), 클라미디아 종(*Chlamydia spp.*) 등), 마이코박테리아 및 기생충(원생동물의 임의의 공지된 기생 구성원을 포함함)을 포함한다. 감염성 바이러스는 진행생물 바이러스(예를 들면, 아데노바이러스, 분야바이러스, 헤르페스바이러스, 파포바이러스, 파라믹소바이러스, 피코르나바이러스, 라브도바이러스(예: 광견병), 오르토믹소바이러스(예: 인플루엔자), 폭스바이러스(예: 백시니아), 레오바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스(예: HIV), 플라비바이러스(예: HCV) 등)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원이 MHC 부류 I 분자로 처리되어 표시되는 시토줄 병원체에 의한 감염은 본 발명의 증강된 친화성 TCR로 치료된다.

[0083] 증강된 친화성 TCR은 세포 결합된 형태로 대상체에 투여될 수 있다(즉, 표적 세포 모집단(성숙 T 세포(예: CD8⁺ T 세포) 또는 T 세포 계통의 기타 세포)). 특정 실시형태에서, 대상체에게 투여된 증강된 친화성 TCR을 포함하는 T 세포 계통의 세포는 자가 세포이다. 또 다른 실시형태에서, 증강된 친화성 TCR은 가용성 형태로 대상체에게 투여될 수 있다. 가용성 TCR은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: Molloy et al., 2005, Curr. Opin. Pharmacol. 5:438-443; U.S. Patent #6,759,243].

[0084] "치료하다" 및 "치료"는 대상체의 질환, 장애 또는 증상의 의학적 관리를 지칭한다(즉, 인간 또는 비인간 포유동물(예: 영장류, 마우스, 랫트)일 수 있는 개체). 일반적으로, 적절한 용량 및 치료 섭생은 본원에 기재된 증강된 친화성 TCR 및 임의로 보조제를 치료학적 또는 예방학적 이점을 제공하기에 충분한 양으로 제공한다. 치료

학적 및 예방학적 이점은 개선된 임상적 결과; 질환과 관련된 증상의 경감 또는 완화; 증상의 재발 감소; 개선된 삶의 질; 보다 긴 무병 상태; 질환 정도의 축소, 질환 증상의 안정화; 질환 진행의 지연; 진정; 생존; 또는 생존 연장을 포함한다.

[0085] 증강된 친화성 수용체를 포함하는 약제학적 조성물은 당해 기술분야의 숙련가에 의해 측정된 바와 같이 치료(또는 예방)되는 질환 또는 증상에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 조성물의 적절한 용량, 적합한 기간 및 투여 빈도는 환자의 증상, 질환의 크기, 유형 및 중증도, 특정 형태의 활성 성분 및 투여 방법과 같은 인자에 의해 결정될 것이다.

[0086] 추가의 실시형태에서, 본 발명의 증강된 친화성 TCR은 본원에서 동정된 징후 또는 증상과 관련하여 사용된 이들 방법을 포함하여 진단 방법 또는 영상화 방법에 사용될 수 있다.

[0087] 실시예

[0088] 다음 실시예는 본 명세서에 의해 제공된 바와 같이, 예를 들면, TCR 유전자도입 흉선세포가 OP9-DL1 배양물 중의 이들의 동족 항원에 노출시 효율적으로 " $\gamma \delta$ 형" $CD4^-CD8^-CD24^-TCR\beta^+$ 계통으로 분화한다는 것을 입증한다. 더욱이, 종양 항원 WT1에 특이적인 T 세포 클론으로부터의 TCR α 쇄만을 발현시키는 전구 흉선세포가 또한 OP9-DL1 배양물에서 성숙한 TCR $\alpha\beta^+$ 계통으로 분화할 수 있다. TCR β 쇄의 라이브러리는 이러한 배양물로부터 선별된 DN TCR $\alpha\beta^+$ 세포의 모집단으로부터 생성되었고, 항원-특이적 TCR α 쇄와 쌍을 이룰 경우 WT1 MHC 사랑체 반응성에 대해 스크리닝했다. 이러한 접근법을 사용하여, 본래의 TCR에 비해 WT1 펩타이드에 대해 최대 10배 높은 친화성을 갖는 TCR을 생성하기 위해 항원-특이적 TCR α 쇄와 쌍을 이룰 수 있는 다수의 TCR β 쇄를 동정하였다.

[0089] **실시예 1: OP9-DL1 세포 상의 분화 동안 펩타이드 효능제의 결속은 TCR 유전자도입 마우스로부터 정제된 T 세포 전구세포로부터 성숙한 TCR $\alpha\beta^+$ DN 세포의 분화를 유도할 수 있다.**

[0090] β -선택 전에 $\alpha\beta$ TCR을 통하는 효능제 신호는 생체내에서 T 세포 발달 동안 " $\gamma \delta$ 형" 이중 음성(DN) TCR $\alpha\beta^+$ 세포의 분화를 유도하고, DN3 단계에서 TCR 가교결합은 OP9-DL1 세포 상에서 시험관내 T 세포 분화 동안 유사한 계통의 분화를 유도한다. TCR 유전자도입 마우스로부터의 전구 T 세포가 또한 DN3 단계에서 동족 펩타이드 항원에 반응하여 DN TCR $\alpha\beta^+$ 계통으로 분화할 수 있었는지를 측정하기 위해, TCR $\alpha\beta^-CD4^-CD8^-CD117^+CD44^+DN1$ 및 DN2 전구 흉선세포를 유전자도입 OT-1 마우스[MHC 부류 I H-2K^b에 제공된 난알부민 펩타이드 서열 SIINFEKL (서열번호 1)에 특이적인 TCR을 발현시킨다; Stock #003831, 잭슨 라보라토리, ME; 참조: Hogquist et al., 1994, Cell 76:17-27]로부터 선별하고, 펩타이드의 부재하에 또는 난알부민-특이적 펩타이드(서열번호 1)의 증가하는 농도로 마우스 MHC 부류 1 분자 H-2K^b를 발현시키기 위해 형질도입된 OP9-DL1 세포[참조: Schmitt et al., 2002, Immunity 17:749-756; 미국 특허 제7,575,925호]로 20일 동안 배양하고, 각종 시점에서 유동 세포분석으로 분석했다. 펩타이드의 부재하에, 이중 양성(DP) T 세포는 16일째까지 검출할 수 있었고, 20일째까지 배양물의 주요 분획을 구성했다(도 1a). 그러나, DP T 세포의 발달 또는 생존은 비정상하게 낮은 농도의 펩타이드 (0.0001 μ M)까지 감소되었고, DP는 0.01 μ M 이상의 펩타이드(도 1a)를 함유하는 배양물에 완전히 존재하지 않아서 DP 세포가 OP9-DL1 배양물에서 강력한 효능제 신호에 의해 음성 선택된다는 것을 증명한다.

[0091] 점점 강한 효능제 신호가 TCR $\alpha\beta^+$ DN 세포의 발달을 유도하는지를 측정하기 위해, DN 모집단을 CD24, 모든 미성숙 전구 T 세포 모집단 상에서 고수준으로 발현되는 성숙 마커, 및 TCR β 의 발현에 대해 분석했다. 세포의 대부분은 고수준의 CD24를 발현시키고, 5일째(도 1b)에 TCR β 발현이 결핍되지만, 16일째까지 모든 배양 조건으로부터 DN 세포의 대부분은 TCR β 를 발현시키지만, 실질적으로 많은 수의 CD24⁻ 세포가 0.01 μ M 이상의 펩타이드가 함유된 배양물로부터 관찰되었다(펩타이드 부재 배양물 중의 6.9% TCR⁺CD24⁻에 비해, 각각 0.01 및 1.0 μ M의 펩타이드를 함유하는 배양물 중의 38.2% 및 31.4% TCR⁺CD24⁻ 세포)(도 1b). 20일째까지, 모든 DN 세포 중의 약 60%는 0.01 μ M 또는 1.0 μ M 펩타이드를 함유하는 배양물로부터의 TCR β^+ CD24⁻인 반면, 어떤 펩타이드로 수용하지 않거나 저농도(0.0001 μ M)의 펩타이드를 수용한 배양물에서, 단지 약 20%의 DN이 TCR β^+ CD24⁻였고, 50%에 근접하게 TCR β^- 였다(도 1b, 1c). 더욱이, TCR 표면 발현 수준이 상이한 배양 조건 사이에서 비교될 때, 고수준의 펩타이드에 반응하여 발달된 TCR β^+ 세포는 세포 표면에서 보다 높은 수준의 TCR β 를 발현시켰다(도 1c). 이론

에 구속시키고자 하지 않고, 첨가된 펩타이드 없이 배양물 중의 일부 TCR $\alpha\beta^+$ DN 세포의 발달은 OP9-DL1 배양 시스템에서 기타 펩타이드-MHC 리간드와의 교차-반응성에 기인한다는 것이 가능하다. 이러한 배양물에서 관찰된 TCR $\alpha\beta^+$ DN 세포가 DP 단계를 통해 발달되지 않았음을 확인하기 위해, 아직 양성 선택되지 않은 CD69 $^-$ DP 세포를 B6 또는 OT-1 흉선으로부터 선별하고, 난알부민 SIINFELK 펩타이드(서열번호 1)의 존재하에 또는 부재하에 배양하였다. B6 DP 세포는 SIINFELK 펩타이드(서열번호 1)의 존재에 의해 영향을 받지 않았지만, OT-1 DP 흉선 세포가 SIINFELK(서열번호 1)의 존재하에 OP9-DL1 세포 상에서 배양되었을 경우, 세포질 및 공동-수용체 하향 조절(도 2)의 대규모 손실을 포함하여 음성 선택의 모든 홀마크가 관찰되었다. 중요하게는, 이러한 배양물에서 관찰된 DN 세포는 균일하게 TCR 음성였다(도 2).

[0092] 이러한 데이터는, OP9-DL1 세포 상에서의 분화 동안 펩타이드 효능제의 결속이 TCR 유전자도입 마우스로부터 정제된 T 세포 전구세포로부터 성숙한 TCR $\alpha\beta^+$ DN 세포의 분화를 유도할 수 있음을 나타낸다.

[0093] **실시예 2: OP9-DL1 배양 시스템에서 DN CD24 $^-$ TCR $\alpha\beta^+$ "x δ 워너비" 세포의 발달을 유도하기 위한 내인성 TCR β 쇄를 갖는 유전자도입 TCR β 쇄 쌍**

[0094] β -선택 전에 단지 TCR α 쇄의 발현이 또한 특정 친화성 임계치 이상의 OP9-DL1 배양 시스템에서 펩타이드-MHC 리간드를 결합할 수 있는 도입된 TCR α 쇄와 짝을 이루는 내인성 TCR β 쇄를 발현시키는 DN3 T 세포 전구세포의 계통 전환을 유도해야 하는지를 결정하기 위해, CD4 $^-$ CD8 $^-$ CD117 $^+$ CD44 $^+$ DN1 및 DN2 전구 흉선세포를 B6 마우스로부터 선별하고, 이전에 3D α 의 CDR3 영역의 포화 돌연변이유발 라이브러리로부터 단리된 친화성 증강된 변이체로서 동정된 빌름스 중앙 항원(WT1) 특이적 T 세포 클론 3D로부터의 TCR α 쇄로 형질도입했다. 3D α 발현 작제물은 마커 형질도입으로서 인간 CD2의 세포외 도메인(Genbank 수탁 번호 NM_001767.3(서열번호 48) 및 NP_001758.2(서열번호 49)(각각 전장 CD2에 대한 전사물 및 단백질 서열))이 이어지는 내부-리보솜 도입 서열 모티브(IRES-hCD2)를 함유한다. 형질도입된 전구 흉선세포는 1.0 μ M의 MHC 부류 I H-2D b 제한된 WT1 펩타이드 RMFPNAPYL(서열번호 2)의 존재 또는 부재하에 14일 동안 배양한 다음, 유동 세포분석에 의해 분석했다. hCD2 음성 분획 내의 DN 세포는 배양 조건에서 펩타이드의 존재와 무관하게 약간의 TCR $\alpha\beta^+$ 세포를 함유한다. 대조적으로, 펩타이드를 수용하지 않은 배양물로부터의 hCD2 양성 분획(3D α 유전자를 발현시키는)은 6.8% TCR β^+ 세포를 함유하고, 1.0 μ M WT1 펩타이드가 첨가될 때(도 3a) TCR $\alpha\beta^+$ 세포의 수는 16.6%로 증가하였다. 이러한 데이터는, TCR $\alpha\beta^+$ DN 세포의 상당한 모집단이 β -선택 전에 TCR α 쇄를 이소적으로 발현시키는 초기 전구 흉선세포로부터 발달할 수 있음을 나타낸다. 더욱이, TCR $\alpha\beta^+$ DN 세포의 이 모집단이 동족 펩타이드(도입된 TCR α 쇄에 대해)가 존재할 때 증가한다는 사실은 이러한 세포 중의 상당한 분획이 WT1 항원-특이적 신호에 반응하여 발달된다는 것을 시사한다.

[0095] 정리하면, 이러한 데이터는, TCR $\alpha\beta^+$ DN 모집단이 원래의 증강된 친화성 수용체보다 MHC-WT1 펩타이드 사랑체에 대해 더 고친화성을 갖는 TCR을 형성하기 위해 도입된 3D α 와 짝을 이룰 수 있는 TCR β 쇄를 발현시키는 세포를 잠재적으로 함유할 수 있고, 표준 T 세포 레퍼토리로부터 단리될 수 있는 것보다 상당히 더 높다는 것을 나타낸다.

[0096] 따라서, 3D α -형질도입된 CD4 $^-$ CD8 $^-$ CD117 $^+$ CD44 $^+$ DN1 및 DN2 전구 흉선세포는 마우스 MHC 부류 I H-2D b 를 발현시키는 OP9-DL1 세포 상에서 분화되고, 또한 WT1을 발현시키기 위해 형질도입되었다. 비-부착 세포는 최대 21일까지 수일 동안 수집하고, TRIzol 시약(Invitrogen)(도 3b) 속에서 hCD2 $^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ TCR β^+ 세포에 대해 선별하였다. 개별 일수로부터의 세포 종류를 풀링하고, RNA를 정제하고, cDNA를 생성시켰다. 모체 3D TCR은 Vb10 가변 영역을 사용한다. MHC를 접촉시키는 TCR CDR1 및 CDR2 도메인을 유지시키기 위해, 후보 TCR β 쇄를 이 가변 영역을 함유하는 것들로 제한하였다. 따라서, 선별된 세포 모집단 내의 V β 10-함유 TCR β 쇄는 V β 10 특이적 전방 프라이머 및 C β 2 특이적 역방 프라이머(도 3c)를 사용하여 PCR로 단리시켰다. Vb10-특이적 전방 프라이머는 CACC 서열을 함유하여 pENTR $^{\text{TM}}$ /D-TOPO $^{\text{R}}$ 내로 지향 TOPO-클로닝을 허용한 다음, 레트로바이러스 벡터 MigR1-attR(Gateway $^{\text{R}}$ 클로닝을 위한 ccdB 유전자 및 attR 부위를 함유하도록 변형된 MigR1 벡터의 변형(Pear et

al., 1998, Blood 92:3780-3792)) 내로 재조합(Invitrogen)을 위한 Gateway^R 기술을 사용하여 전이되도록 설계된다. MigR1-TCR β 라이브러리를 사용하여 PlatE 레트로바이러스 패키징 세포[참조: Morita et al., 2000, Gene Therapy 7:1063-1066; Cell Biolabs, Inc.]를 형질도입하여 레트로바이러스 상청액을 생성한 다음, 이를 사용하여 내인성 TCR α 및 TCR β 채, (58^{-/-})[참조: Letourneur and Malissen, 1989, Eur. J. Immunol. 19:2269-74]이 결여된 58 $\alpha^{-}\beta^{-}$ 세포, 마우스 T 세포주를 레트로바이러스 형질도입시켰다.

[0097]

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

[0098]

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

[0099]

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

[0100]

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

[0101] 실시예 3: 시험관내에서 초기 인간 T-세포 발달 동안 항원-특이적 TCR α쇄의 이소성 발현에 의한 고친화성 WT1-특이적 T 세포의 생성.

[0102] 윌름스 증양(WT1) 항원은 백혈병 세포의 표면 상에서 비정상적으로 높은 수준으로 발현시킨다. HLA A2/WT1-특이적 T 세포 클론을 높은 특이적 활성을 갖는 클론에 대해 스크리닝하였다. WT1에 대해 가장 고친화성을 갖는 것으로 결정된 C4 클론으로부터의 TCR α 및 TCR β쇄를 단리시켰다. C4 TCR을 포함하고 고수준 발현을 제공하는 렌티바이러스 벡터는 2012년에 계획된 TCR 유전자 치료 임상 시험의 대상이다. WT1 항원에 대한 C4 TCR의 친화성을 추가로 강화하기 위해, 이전 실시예에 기재된 시험관내 분화 시스템을 C4 TCR α쇄를 발현시키는 인간 제대혈 전구 세포와 함께 사용한다.

[0103] WT1-특이적 T 세포의 생성:

[0104] 인간 부류 I MHC 분자 HLA-A2(Genbank 수탁 번호 U18930.1(서열번호 50) 및 AAA87076.1(서열번호 51), 각각 전사물 및 단백질 서열) 및 인간 부류 I MHC β2 마이크로글로블린(β2M) 분자(Genbank 수탁 번호 NM_004048.2(서열번호 52) 및 NP_004039.1(서열번호 53), 각각 전사물 및 단백질 서열)를 발현시키는 실시예 1에 기재된 OP9-DL1 세포주의 변이체를 생성했다. C4 TCR 클론의 TCR α쇄는 형질도입 마커로서 녹색 형광 단백질(GFP)를 또한 인코딩하는 레트로바이러스 벡터를 사용하여 레트로바이러스 형질도입에 의해 제대혈-유래 조혈전구세포 내로 안정하게 형질도입된다. GFP를 발현시키는 전구 세포는 유동 세포분석으로 선별하고, WT1 펩타이드 RMFPNAPYL(서열번호 2)의 존재 또는 부재하에 OP9-DL1-A2/β2M 스트로마 세포 상에서 배양했다. 인간 조혈전구세포는 용이하게 증식하고, OP9-DL1 배양물에서 표현형 CD34⁺CD1a⁺CD4⁺[참조: La Motte-Mohs et al., 2005, Blood 105:1431-1439]로 특성화된 인간 T 세포 발달 단계로 분화하고, 이 시점에 이들은 β, γ 및 δ 유전자좌[참조: Spits, 2002, Nat. Rev. Immunol. 2:760-772]에서 TCR 유전자 재배열을 경험한다. 이들의 마우스 대상물과 같이, 인-프라임 재배열을 생산하는 TCR α-발현 인간 T 세포 전구세포는 두 세포 운명 중의 하나를 순응시킨다: 유전자도입 TCR α와 충분히 짝을 이루지 않거나 유전자도입 TCR α와 짝을 이루지만 이 αβTCR을 통해 강한 신호를 수신하지 않은 것들은 비록 전-TCR일지라도 신호에 반응하여 DP 단계로 분화하고; 한편, 유전자도입 TCR α와 짝을 이룰 수 있고 이 성숙 αβTCR을 통해 충분히 강한 신호를 수신하는 TCR β쇄를 생성하는 것들은 DN TCR αβ+ γδ-형 계통으로 분화한다고 가정된다. DP 세포만이 양성 선택 신호 없이 약 3 내지 4일 동안 생존하기 때문에, 그리고 효율적인 양성 선택이 OP9-DL1 배양물에서 발생하지 않기 때문에, αβTCR을 통해 효능제 신호를 수신하지 않은 세포의 대부분은 배양물로부터 제거되어 초기 αβTCR 신호에 기인하여 발달하는 γδ-형 세포를 축적시킨다.

[0105] 후보 TCR β쇄의 단리:

[0106] 다양한 배양 시점에서, DN TCR αβ+ γδ-형 표현형을 갖고 WT1 펩타이드/A2 MHC-사량체 양성인 비-부착 세포는 세포 선별로 수집한다. 배양물 중의 연속된 항원의 존재가 사량체 염색을 검출 이하로 감소시킬 수 있는 TCR 방향-조절을 유도할 수 있기 때문에, WT1 사량체 양성 세포를 검출하는 것이 가능하지 않을 수 있다. 더욱이, 이러한 세포가 아마 CD8 αβ를 발현시키지 않기 때문에, CD8-독립적이지 않은 고친화성 수용체는 사량체 염색으로 검출가능하지 않다. 따라서, 배양물(이하 참조)에서 나타나는 모든 DN TCR αβ+ 세포로부터의 TCR β쇄를 스크리닝하는 것이 필요할 수 있다. 또한, 후보 T 세포를 모체 C4 TCR의 CDR1 및 CDR2 MHC 접촉을 유지하기 위해, 본래 C4 TCR β쇄(Vβ17)에 의해 이용되는 동일한 Vβ 단편을 사용하는 것들로 제한하는 것이 바람직할 수도 있다.

[0107] 세포 선별 후, 내인성 TCR β쇄는 전체 RNA를 정제시키고, 전장 RACE RT-PCR을 C-β1 또는 C-β2 프라이머로 수행하고, PCR 생성물을 pENTRTM/D-TOPO^R 벡터(Invitrogen) 내로 클로닝하여 클론화하고, 이는 지향 TOPO-클로닝을 허용하고 인비트로젠의 Gateway^R 기술 재조합 시스템을 사용하여 레트로바이러스 벡터 Mig-attR(목적하는 유전자의 삽입을 위한 attR 부위를 함유하는 MigR1[Pear et al., 1998, Blood 92:3780-3792]의 변이체)로 신속하고 효율적인 전이를 허용하는 attL 부위를 도입한다. 재조합 반응의 생성물을 고효율 세균 내로 전기천공하고, 클로닝을 함께 굼어내고, 맥시프레퍼하여 잠재적으로 WT1-반응성 TCR β쇄의 레트로바이러스 라이브러리를 생성한다.

- [0108] 고친화성 WT1-특이적 TCR의 스크리닝:
- [0109] 고친화성 WT1-특이적 TCR을 형성하기 위해 C4 TCR α 쇠와 짝을 이룰 수 있는 TCR β 쇠는 TCR β 라이브러리를 C4 TCR α 쇠(H9-C4 α)를 발현시키기 위해 형질도입된 인간 T 세포주 H9(Catalog # HTB-176, ATCC, Manassas, VA) 내로 형질도입함으로써 동정된다. 형질도입된 세포는 고수준의 MHC-WT1 펩타이드 사랑체 염색에 대해 유동 세포 분석으로 선별하고, 레트로바이러스 삽입물은 선별된 모집단으로부터 PCR에 의해 증폭된다. 후보 TCR β 쇠는 PCR 생성물의 TOPO-클로닝, 이어서 서열 분석으로 동정된다. 선택된 TCR β 쇠 및 모체 C4 α 를 H9-C4 α 세포 내로 형질도입하고, MHC-WT1 펩타이드 사랑체에 대한 상대적 친화성은 형질도입된 세포를 PE-접합된 사랑체의 연속 2배 희석(실시에 2에 기재된 바와 같음)으로 염색하여 계산한다. 친화성 값은 각각의 희석에 대한 MF1을 1/2-최대 결합을 수득하는 사랑체 농도로서 규정된 KD 및 비선형 회귀에 의해 결합 곡선에 적합시킴으로써 결정된다. MHC-펩타이드 사랑체 염색에 의해 야생형 C4 수용체보다 고친화성을 갖는 TCR을 생성하기 위해 C4 TCR α 와 짝을 이룰 수 있는 TCR β 쇠는 안전성 및 유효성을 위해 추가로 특성화한다.
- [0110] 실시에 4: WT1-표적화된 TCR 유전자 치료의 생체내 마우스 모델을 사용하는 후보 고친화성 TCR의 유효성 및 안전성의 특성화.
- [0111] 실시에 3에서와 같이 동정된 증강된 친화성 인간 WT1-특이적 TCR을 WT1 표적화된 유전자 치료의 HLA-A2 유전자 도입 마우스 모델에서 안정성 및 유효성에 대해 시험한다.
- [0112] 탈표적화 활성화에 대한 증강된 TCR의 평가:
- [0113] 고친화성 TCR의 무차별 활성화는 WT1 펩타이드의 존재 또는 부재하에 A2 발현 표적 세포의 패널에 대응하여 TCR-형질도입된 T 세포에 의해 사이토킨 생산을 측정하여 평가한다. 모체 C4 TCR에 비교하여 WT1 음성 표적 세포의 탈표적 인식을 나타내는 TCR은 추가 연구를 진행하지 않는다.
- [0114] 생체내 정상 조직 상에서 증강된 친화성 TCR 활성화:
- [0115] 정상 조직에서 WT1 발현은 마우스 및 인간 둘 다에서 유사하고, C4 TCR에 의해 인식된 WT1 펩타이드는 마우스에서 동일하고, 마우스 세포에 의해 처리되고 제공되는 것으로 공지되어 있다[Gaiger et al., 2000, Blood 96:1480-9]. HLA-A2 유전자도입 마우스는 인간 고친화성 WT1-특이적 TCR을 발현하는 T 세포에 의해 정상 조직의 인식에 대해 시험하기 위해 사용되었다[Kuball et al., 2009, J. Exp. Med. 206:463-475].
- [0116] 이전 실시예에서 개시되어 있는 바와 같이 시험관내에서 생성된 증강된 친화성 TCR의 안전성을 평가하기 위해, D^b(마우스 SD8을 결합하기 위한)[Newberg et al., 1996, J. Immunol. 156:2473-2480]의 $\alpha 3$ 에 융합된 A2의 $\alpha 1$ 및 $\alpha 2$ 도메인을 인코딩하는 도입유전자를 발현시키는 B6.A2/D^b 마우스로부터 CD8⁺ T 세포는 발현된 후보 증강된 친화성 TCR로 형질도입한다. TCR은 형질도입 이전에 인간 C α 및 C β 도메인보다는 마우스를 함유하도록 변형시키고, 이는 마우스 T 세포에서 발현을 증가시킨다[Pouw et al., 2007, J. Gene Med. 9:561-570]. 마우스내로 TCR-형질도입된 T 세포의 전이 후 약 4 내지 6주에, WT1을 자연적으로 발현시키는 것으로 공지된 조직(예: 폐 및 신장)을 T 세포 침윤 및 조직 손상의 증거를 위해 조직학으로 분석하고, 골수는 WT1-발현 조혈전구세포의 고갈을 위해 유동 세포분석으로 평가한다.
- [0117] 증강된 친화성과 개선된 표적 인식 및 기능의 상관 관계:
- [0118] TCR에 대해 친화성 임계값이 존재할 수 있고, 그 이상에서 추가의 증강은 T 세포 기능을 증가시키지 않고, 실제로 항원 감도를 감소시킬 수 있다는 증거가 있다[Schmid et al., 2010, J. Immunol. 184:4936-46]. 따라서, 제한 펩타이드 농도로 펄스화된 표적 세포에 대한 고친화성 TCR-형질도입된 CD8⁺ T 세포의 반응은 모체 C4 TCR을 발현시키는 T 세포와 비교한다. 사이토킨 생산(IFN γ /IL-2) 및 증식 뿐만 아니라 용해 활성을 분석한다. 증가된 친화성 및 강화된 기능을 나타내는 TCR은 추가 연구 및 TCR 유전자 치료 시험에서 잠재적인 사용에 대해 진행한다.

[0119] **실시예 5: 생체내에서 고친화성 WT1-특이적 T 세포의 생성.**

[0120] 생체내 마우스 모델(TCR α 레트로게닉 마우스)을 사용하여 TCR β⁺ 이중 음성(DN) 세포가 흉선에서 발달할 수 있는지를 결정하였다. 레트로게닉(레트로바이러스 형질도입된) 마우스는 유전자도입 방법에 비해, 특이적 TCR 도입유전자를 발현시키는 마우스의 신속한 생성을 허용한다. 레트로게닉 마우스를 제조하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다[참조: Holst et al., 2006, Nat. Protoc. 1:406-417; Holst et al., 2006, Nat. Methods 3:191-197; Bettini et al., 2012, Immunology 136:265-272]. 간단히, 조혈 전구/줄기 세포는 B6 마우스의 골수로부터 정제하고, 고친화성 WT1 특이적 3D-PYY TCR 또는 저친화성 메소텔린 특이적 TCR 7431로부터의 TCR α쇄를 발현시키기 위해 형질도입하였다. 3D-PYY TCR은 3D TCR로부터 유전자조작되고, WT1/D^b Ig DimerX(BD Biosciences)를 갖는 T 세포 디스플레이 시스템 및 선택을 사용하여 동정된 보다 고친화성 TCR이다[Stone et al., 2011, J. Immunol. 186:5193-5200; Chervin et al., 2008, J. Immunol. Methods 339:175-184]. 3D-PYY TCR α 또는 7431 α 도입유전자를 포함하는 레트로바이러스 작제물은 또한 두 도입유전자 사이에 IRES와 함께 형질도입 마커로서 인간 CD2의 세포외 도메인을 포함한다. 형질도입된 골수 유래 전구세포는 도입된 TCR α쇄를 발현시키는 골수 키메라를 생성하기 위해 치사적으로 조사된 B6 숙주 마우스로 전이시켰다. TCR α-형질도입된 골수 세포의 생체내 전이 후 6주에, 마우스를 희생시켰다. 흉선 및 비장으로부터의 세포를 유동 세포분석(도 6a, 6b)에 의해 CD4 및 CD8 발현에 대해 분석하였다. 흉선(도 6a)에서 TCR β⁺ 세포에 의한 CD4 및 CD8 발현의 분석은, 이중 음성 TCR β⁺ 세포의 대집단이 발달 중 초기에 TCR α쇄를 이소적으로 발현시키는 형질도입된 흉선 세포에서 생체내 검출될 수 있고, 이 모집단이 고친화성 TCR(예: 3D-PYY α)로부터의 TCR α를 발현시키는 마우스에서 보다 현저하다는 것을 보여준다. 3D-PYY α 및 7431 α 레트로게닉 마우스로부터 DN TCR β⁺ 흉선세포를 또한 각각 Vβ10 및 Vβ9의 발현에 대해 분석하였다(도 6a). 이러한 데이터는, DN TCR β⁺ 모집단이 본래 항원 특이적 TCR과 동일한 Vβ 유전자 단편을 사용하는 세포에 풍부하다는 것을 나타낸다. 정리하면, 이러한 데이터는, DN TCR β⁺ 세포가 흉선에서 발현된 표적 항원(즉, WT1 또는 메소텔린)과 동족 상호작용으로부터 생성되는 비교적 강한 TCR 신호전달에 대응하여 발달한다는 가설을 지지한다. TCR β⁺ 레트로게닉 비장세포의 CD4 및 CD8 발현의 분석은 이러한 DN TCR β⁺ 세포가 또한 레트로게닉 마우스(도 6b)의 말초에 또한 존재한다는 것을 보여준다.

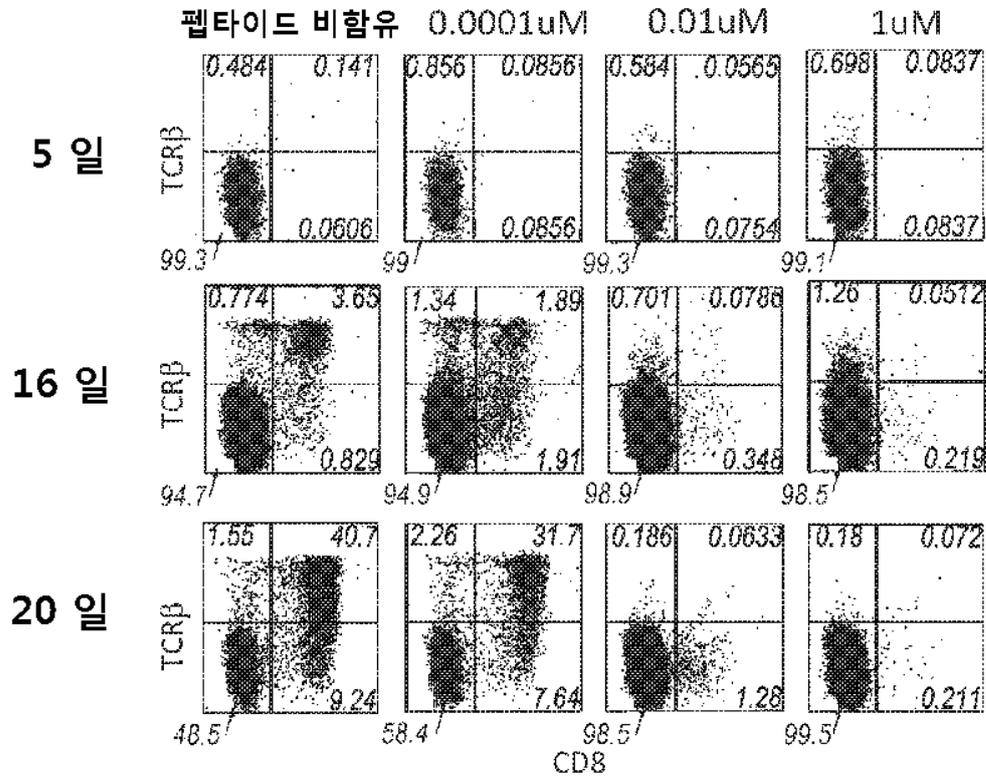
[0121] 3D-PYY α 및 7431 α 레트로게닉 마우스로부터의 비장세포를 각각 WT1 펩타이드 및 메소텔린 펩타이드로 자극하고, IL-2의 존재하에 6일 동안 시험관내 배양하였다. 항원 특이적 세포를 이들이 사랑체 염색으로 검출될 수 있도록 잠재적으로 확장하기 위해 IL-2를 배양물에 첨가하였다. 배양물을 TCR β⁺ 게이트 내에서 유동 세포분석에 의한 CD4 및 CD8 발현 및 모체 TCR Vβ 유전자(도 7)의 발현에 대해 분석하였다. 다시, 모체 Vβ 유전자 계통에 대한 증강이 특히 고친화성 3D-PYY의 경우에 관찰되었다. 배양된 T 세포를 또한 WT1 또는 메소텔린 펩타이드/MHC 사랑체(도 7)로 염색시켜 항원-특이적 T 세포의 존재에 대해 분석하였다. 이러한 데이터는, 특히 고친화성 3D-PYY α 레트로게닉 마우스의 경우에, 상당한 수의 항원 특이적 T 세포가 이러한 배양물에 존재함을 나타낸다. 사랑체 양성 세포가 TCR α-형질도입된(hCD2⁺) 모집단 내에서 발견되었다는 사실은 이러한 세포가 TCR α쇄의 초기 발현 결과로서 발달되었음을 나타낸다. 이는, 이러한 마우스에서 발달한 DN TCR β⁺ 세포가 실제로 고친화성 항원 특이적 T 세포를 함유하지 않음을 증명한다. 이들이 DN 세포이기 때문에, 그들은 사랑체 결합을 돕기 위해 CD8의 기여를 갖지 않고(이러한 TCR은 "CD8-독립적임), CD8-독립적 사랑체 결합은 고친화성 TCR을 필요로 한다.

[0122] 상기 기재된 다양한 실시형태를 조합하여 추가의 실시양태를 제공할 수 있다. 본원에서 언급된 및/또는 출원 데이터 시트에 나열된 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 비-특허 공보 모두는 전문이 본원에 참조로 인용된다. 실시형태의 양상은, 필요에 따라 각종 특허, 출원 및 공보의 개념을 사용하도록 변형되어 추가의 실시형태를 제공할 수 있다.

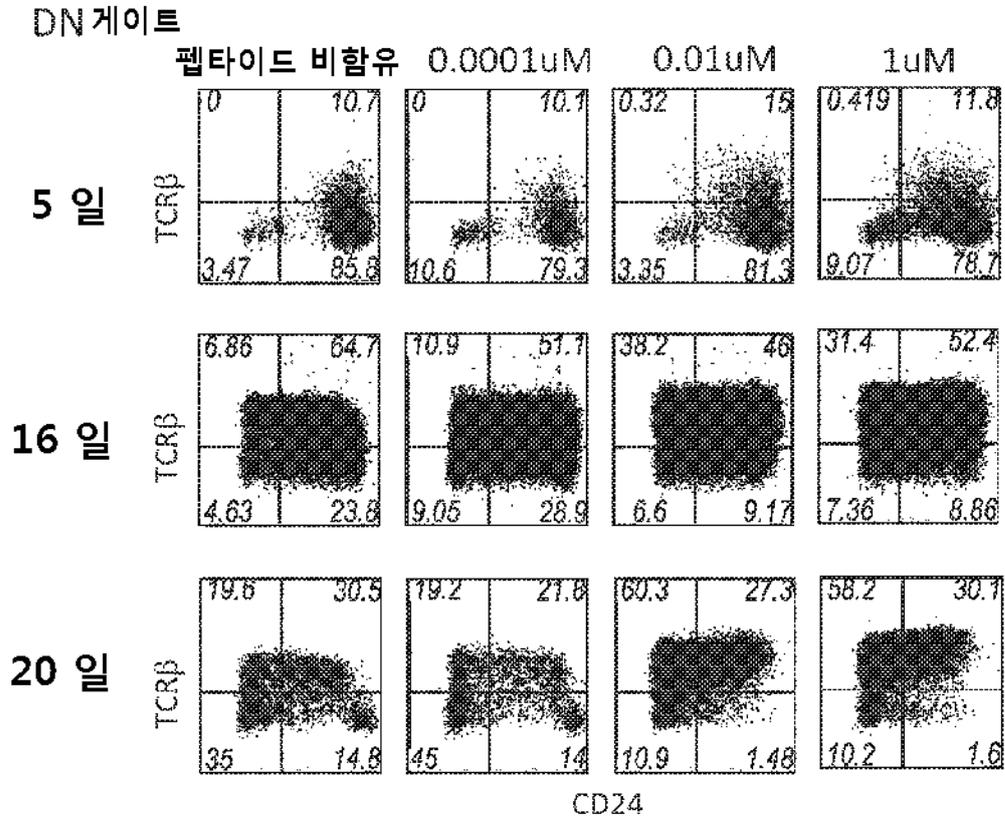
[0123] 상술된 설명의 견지에서 실시형태에 대한 이러한 변화 및 기타 변화가 이루어질 수 있다. 일반적으로, 하기 특허청구범위에, 사용된 용어들이 특허청구범위를 명세서 및 특허청구범위에 기재된 특정 실시형태로 제한하는 것으로 해석되지 않아야 하고, 이러한 특허청구범위의 등가물의 전체 범위와 함께 모든 가능한 실시형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 특허청구범위는 상기 개시에 의해 제한되지 않는다.

도면

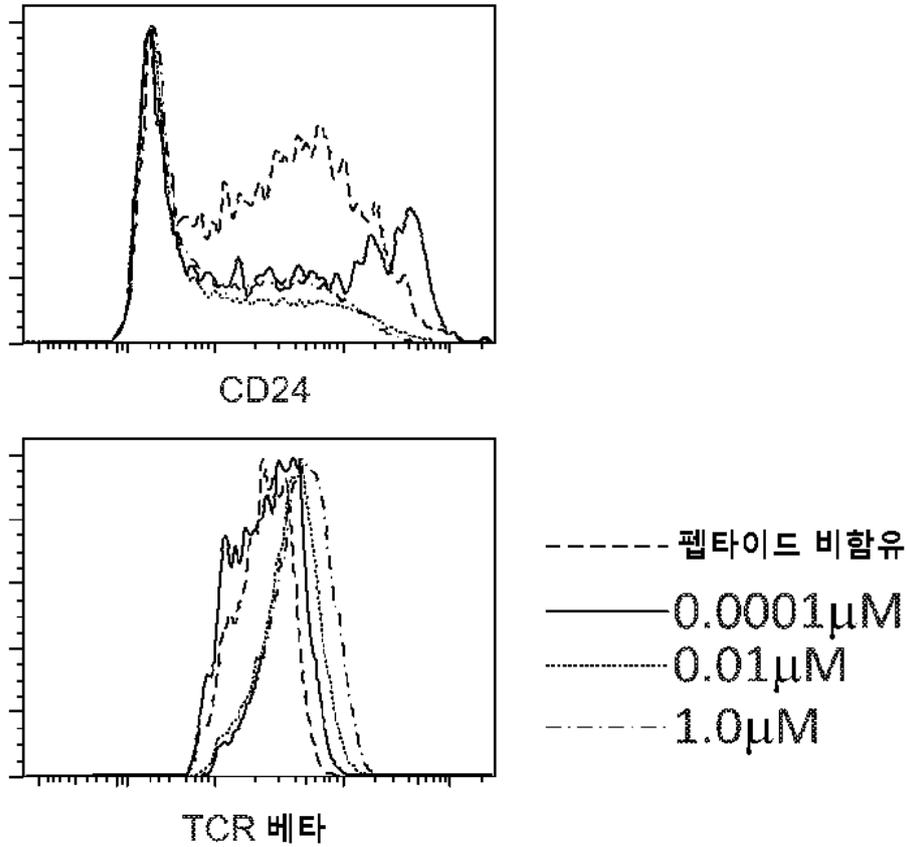
도면1a



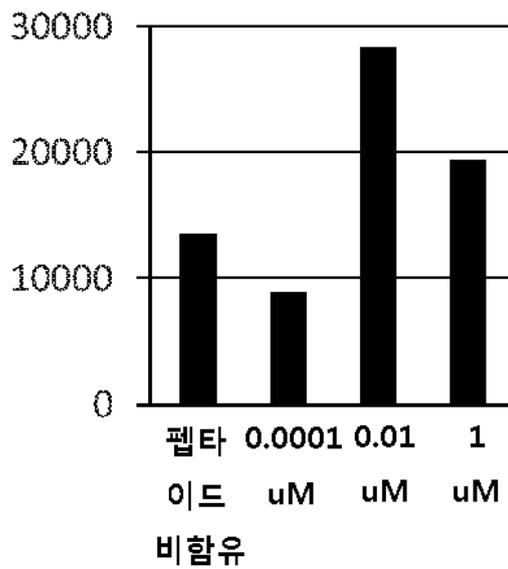
도면1b



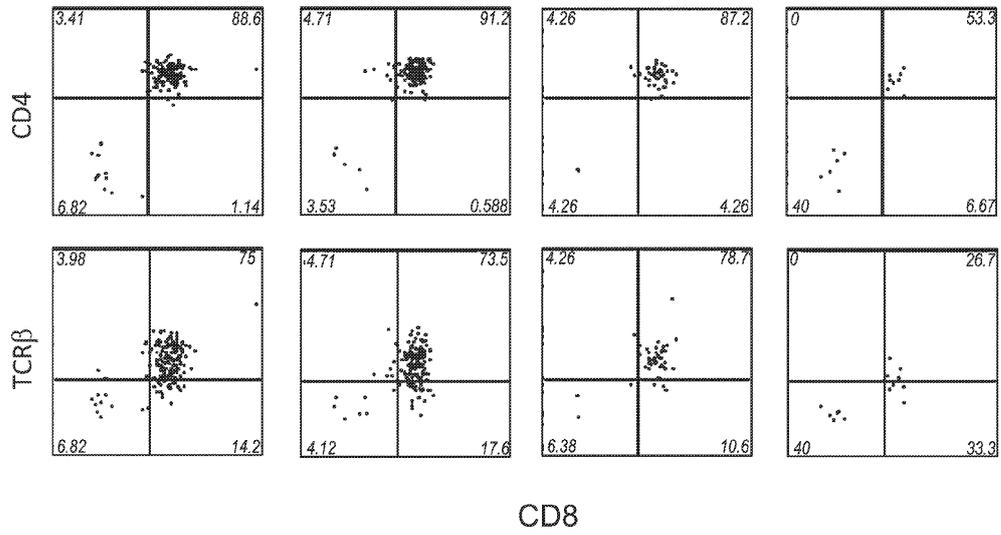
도면1c



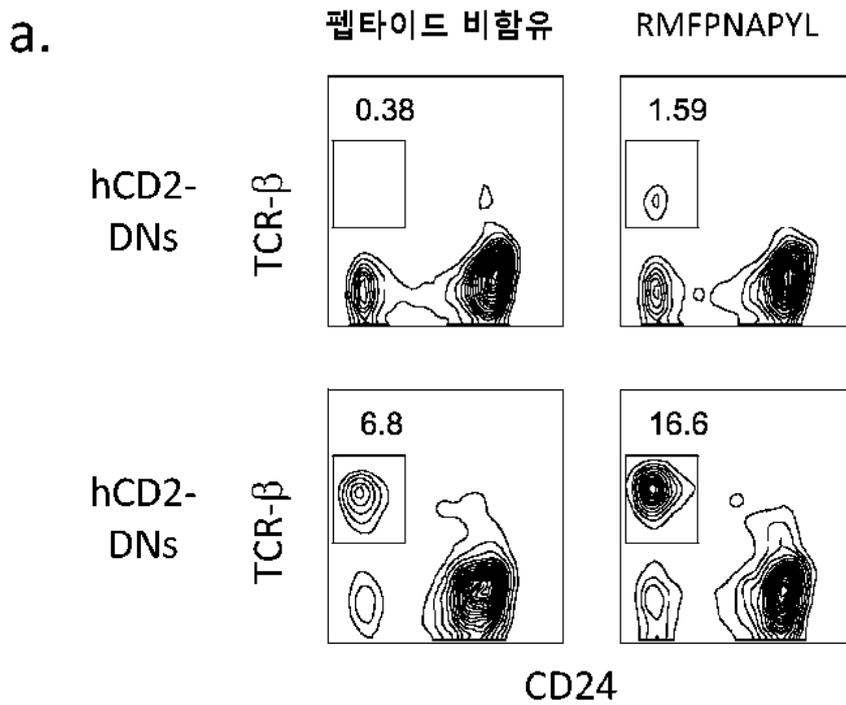
도면1d



도면2

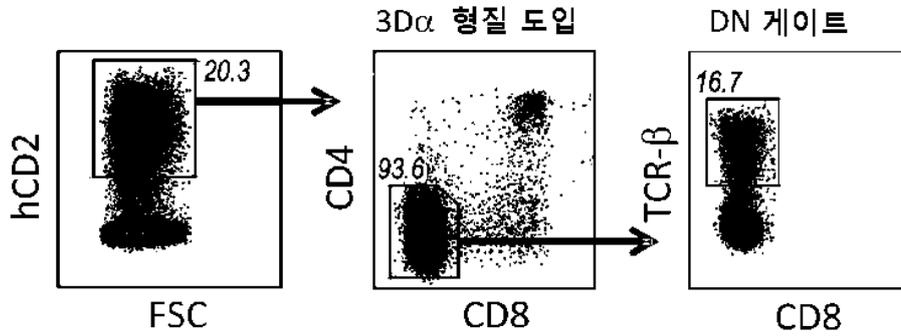


도면3a



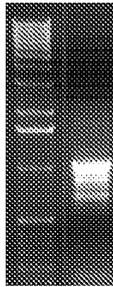
도면3b

b.



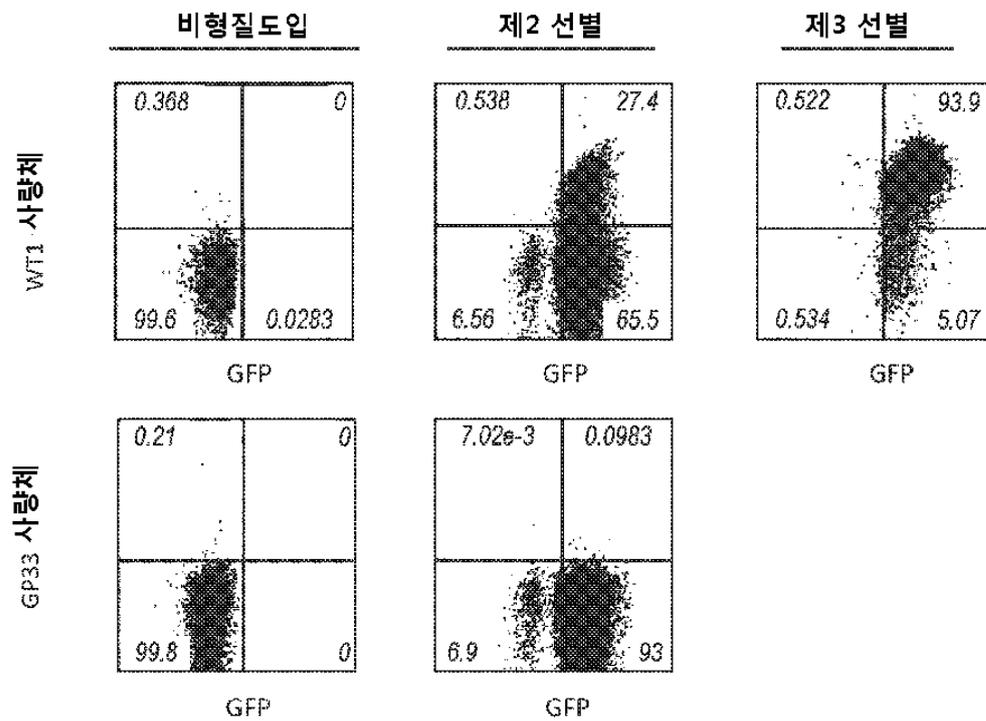
도면3c

c.



- PCR에 의한 클론 V β 10 TCR β 쇠
- pENTR으로의 직접적 클로닝
- 레트로바이러스 벡터 MigR1 (IRES-GFP)로의 전이
- 58-/- 세포의 형질도입 및 스크리닝

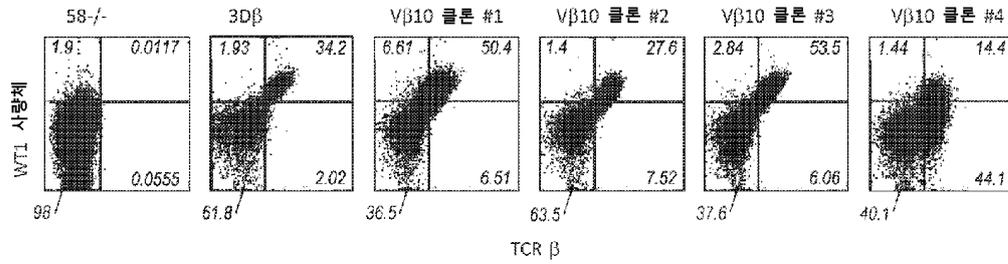
도면4a



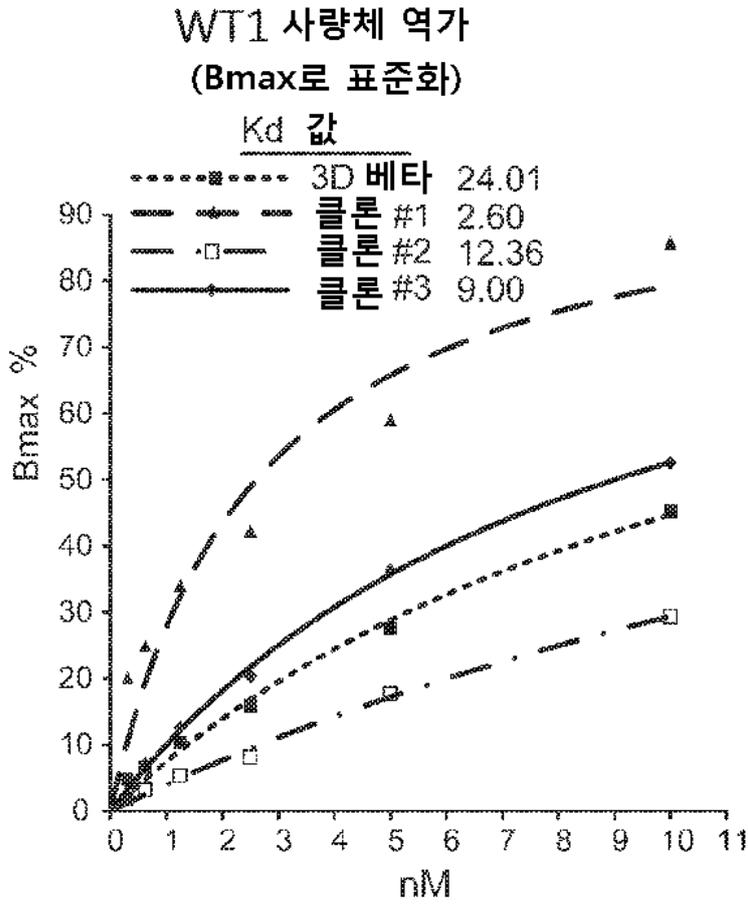
도면4b

	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	
3Dβ	C	A	S	S	P	G	L	G	G	S	Y	E	Q	Y	F	서열번호 32
	tgt	gcc	agc	agc	cct	gga	cag	ggg	gga	tcc	tat	gaa	cag	tac	ttc	서열번호 33
Vβ10 클론 #1	C	A	S	S	Q	G	L	G	S	S	Y	E	Q	Y	F	서열번호 34
	tgt	gcc	agc	agc	cag	gga	cag	ggg	agc	tcc	tat	gaa	cag	tac	ttc	서열번호 35
Vβ10 클론 #2	C	A	S	S	Y	I	L	G	A	Y	E	Q	Y	F	서열번호 36	
	tgt	gcc	agc	agc	tat	ata	cag	...	ggg	gcc	tat	gaa	cag	tac	ttc	서열번호 37
Vβ10 클론 #3	C	A	S	S	S	W	T	V	Y	E	Q	Y	F	서열번호 38		
	tgt	gcc	agc	agc	tcc	tgg	aca	gtc	tat	gaa	cag	tac	ttc	서열번호 39
Vβ10 클론 #4	C	A	S	S	W	T	G	A	N	T	G	Q	L	Y	F	서열번호 40
	tgt	gcc	agc	agc	tgg	aca	ggg	gca	aac	acc	ggg	cag	ctc	tac	ttt	서열번호 41

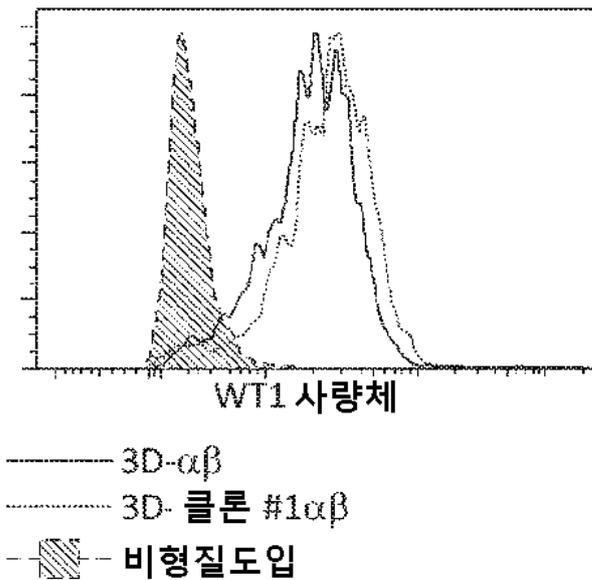
도면4c



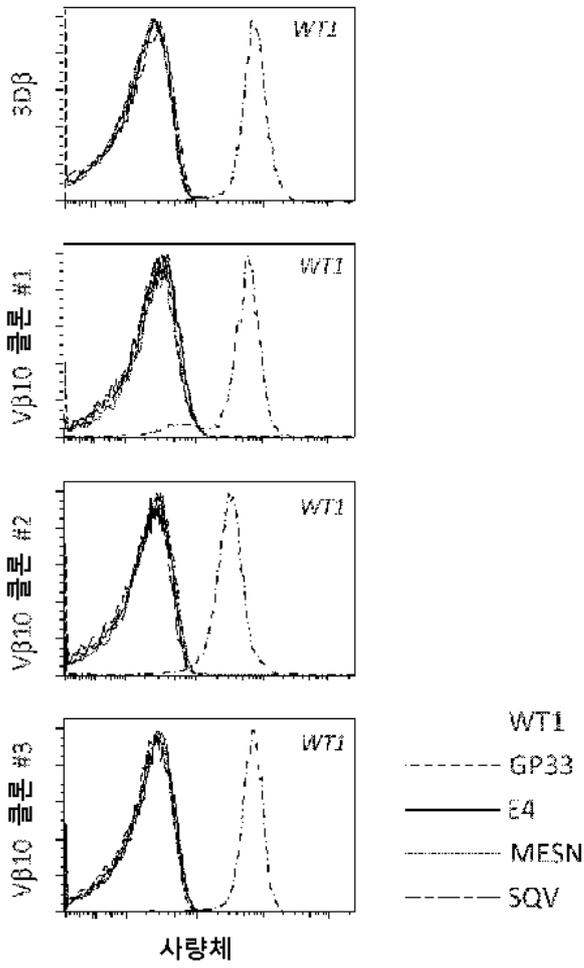
도면5a



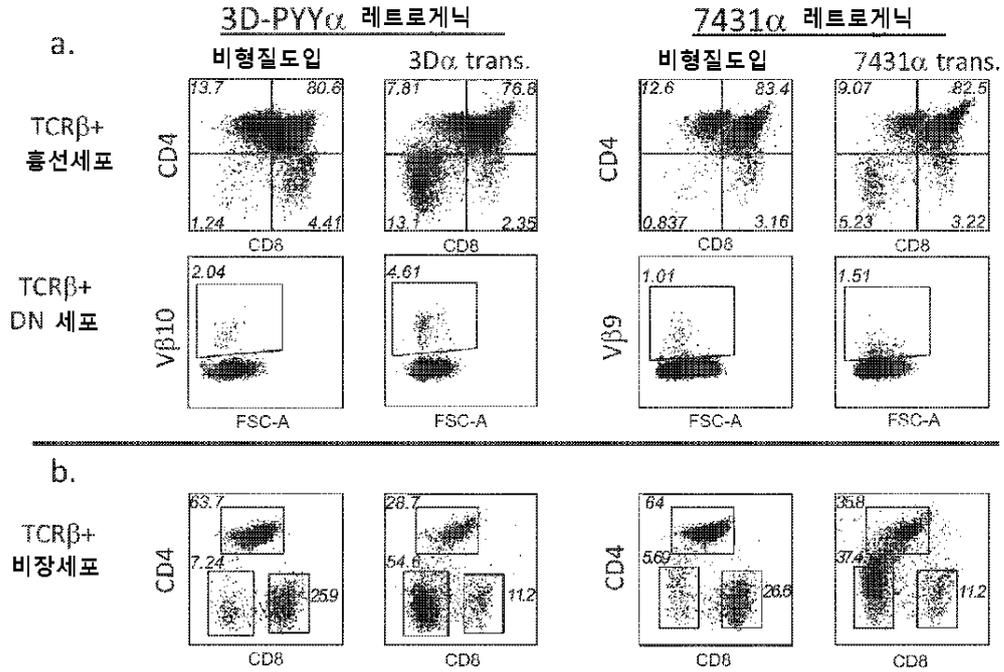
도면5b



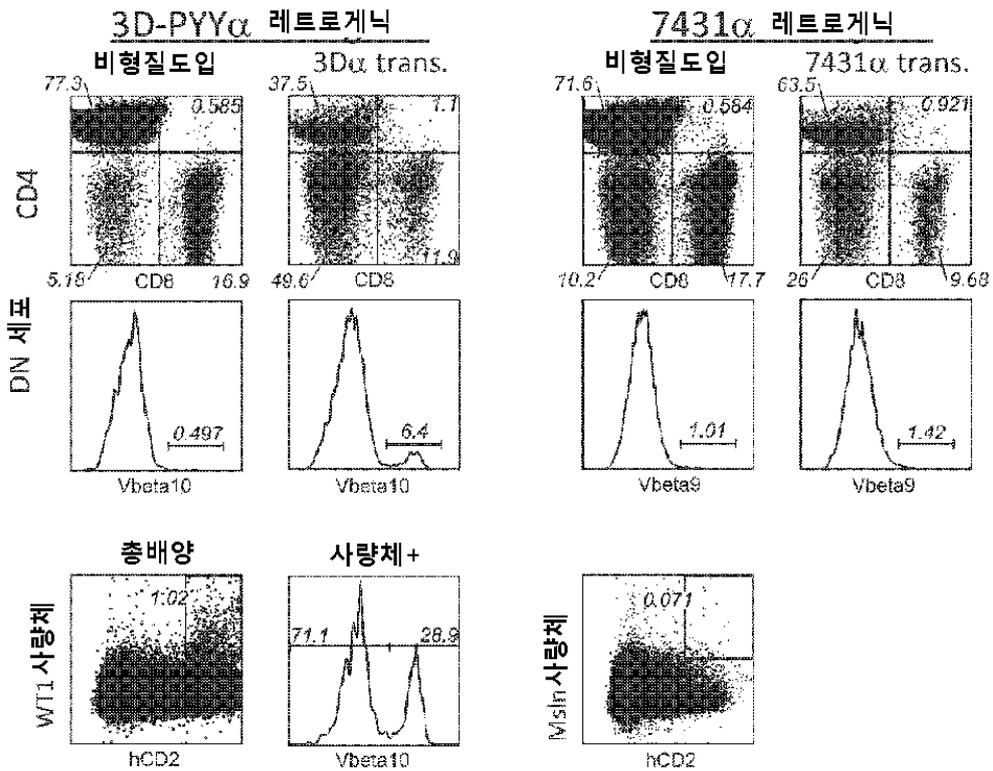
도면5c



도면6



도면7



서열목록

<110> Fred Hutchinson Cancer Research Center

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

<130> IPA141134-US

<150> US 61/642,358

<151> 2012-05-03

<160> 53

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic ovalbumin peptide

<400> 1

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic WT1 peptide

<400> 2

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1 5

<210> 3

<211> 3366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cgtgggattt ccagaccgcg gctttctaata cggctcggga ggaagctctg cagctctctt 60

gggaattaag ctcaatctct ggactctctc tctttctctt tctccccctc cctctctctgc 120

gaagaagctc aagacaaaac caggaagccg gcgaccctca cctcctcggg ggctgggagg 180

aaggaggaaa acgaaagtcg ccgccgccgc gctgtccccc gagagctgcc tttcctcggg 240
catccctggg gctgccgcgg gacctcgcag ggccgatata aagaaccgcg gccttgggaa 300

gaggcggaga ccgcttttta aagaaagaag tcctgggtcc tgcggtctgg ggcgaggcaa 360
gggcgctttt ctgccaccgc tccccgtggc ccatcgatcc cccgcgcgtc cgccgctgtt 420
ctaaggagag aagtgggggc cccccaggct cgcgcgtgga gcgaagcagc atgggcagtc 480
ggtgcgcgct ggccctggcg gtgctctcgg ccttgcctgtg tcaggctctgg agctctgggg 540
tgttcgaact gaagctgcag gatttcgtca acaagaaggg gctgctgggg aaccgcaact 600
gctgccgcgg gggcgccggg ccaccgccgt gcgectgcc gaccttcttc cgcgtgtgcc 660
tcaagcacta ccaggccagc gtgtccccg agccgccctg cacctacggc agcgcctca 720

ccccctgct gggcgtgcac tccttcagtc tgcccgcagg cgggggcgcc gactcccgct 780
tcagcaacc catccgcttc ccttcggct tcacctggcc gggcaccttc tctctgatta 840
ttgaagctct ccacacagat tctctgatg acctcgcaac agaaaacca gaaagactca 900
tcagccgctt ggccaccag aggcacctga cgggtggcga ggagtggctc caggacctgc 960
acagcagcgg ccgcacggac ctcaagtact cctaccgctt cgtgtgtgac gaacactact 1020
acggagaggg ctgctccgtt ttctgccgtc cccgggacga tgccttcggc cacttcacct 1080
gtggggagcg tggggagaaa gtgtgcaacc ctggctggaa agggccctac tgcacagagc 1140

cgatctgctt gcctggatgt gatgagcagc atggattttg tgacaaacca ggggaatgca 1200
agtgcagagt gggctggcag ggccggtact gtgacgagtg tatccgctat ccaggctgtc 1260
tccatggcac ctgccagcag ccctggcagt gcaactgcca ggaaggctgg gggggccttt 1320
tctgcaacca ggacctgaac tactgcacac accataagcc ctgcaagaat ggagccacct 1380
gcaccaacac gggccagggg agctacactt gctcttgccg gcctgggtac acaggtgcca 1440
cctgcgagct ggggattgac gagtgtgacc ccagcccttg taagaacgga gggagctgca 1500
cggatctcga gaacagctac tcctgtacct gccaccgccg cttctacggc aaaatctgtg 1560

aattgagtgc catgacctgt gcggacggcc cttgctttaa cgggggtcgg tgctcagaca 1620
gccccgatgg agggctacagc tgccgctgcc ccgtgggcta ctccgcttc aactgtgaga 1680
agaaaattga ctactgcagc tcttcacctt gttctaattg tgccaagtgt gtggacctcg 1740
gtgatgceta cctgtgccg tgccaggccg gcttctcggg gaggcaactgt gacgacaacg 1800
tggacgactg cgcctcctcc ccgtgcgcca acgggggcac ctgccgggat ggcgtgaacg 1860
acttctcctg cacctgcccg cctggctaca cgggcaggaa ctgcagtgcc cccgtcagca 1920

ggtgcgagca cgcaccctgc cacaatgggg ccacctgcca cgagaggggc caccgctatg 1980

 tgtcgcgagtg tgcccagaggc tacgggggtc ccaactgcca gttcctgctc cccgagctgc 2040
 ccccgggccc agcgggtggtg gacctcactg agaagctaga gggccagggc gggccattcc 2100
 cctgggtggc cgtgtgcgcc ggggtcatcc ttgtcctcat gctgctgctg ggctgtgccg 2160
 ctgtgggtgt ctgctccgg ctgaggctgc agaagcaccg gccccagcc gaccctgcc 2220
 ggggggagac ggagaccatg aacaacctgg ccaactgcca gcgtgagaag gacatctcag 2280
 tcagcatcat cggggccacg cagatcaaga acaccaaaa gaaggcggac ttccacgggg 2340
 accacagcgc cgacaagaat ggcttcaagg cccgctacc agcgggtggac tataacctcg 2400

 tgcaggacct caagggtgac gacaccgccc tcagggacgc gcacagcaag cgtgacacca 2460
 agtgccagcc ccagggtccc tcaggggagg agaaggggac cccgaccaca ctcagggggtg 2520
 gagaagcatc tgaagaaaa aggccggact cgggctgttc aacttcaaaa gacaccaagt 2580
 accagtcggt gtactcata tccgaggaga aggatgagtg cgtcatagca actgaggtgt 2640
 aaaatggaag tgagatggca agactcccgt ttctcttaa ataagtaaaa ttccaaggat 2700
 atatgcccc acgaatgctg ctgaagagga gggaggcctc gtggactgct gctgagaaac 2760
 cgagttcaga ccgagcaggt tctctctctg aggtcctcga cgctgccga cagcctgtcg 2820

 cggccccgcc gcctgcggca ctgccttccg tgacgtgcc gttgcactat ggacagttgc 2880
 tcttaagaga atatatattt aaatgggtga actgaattac gcataagaag catgactgct 2940
 ctgagtgtat attttgatt cttatgagcc agtcttttct tgaattagaa acacaaacac 3000
 tgcctttatt gtcctttttg atacgaagat gtgctttttc tagatggaaa agatgtgtgt 3060
 tattttttgg atttgtaaaa atatttttca tgatatctgt aaagcttgag tattttgtga 3120
 tgttcgtttt ttataattta aattttgta aatatgtaca aaggcacttc gggctctatgt 3180
 gactatattt ttttgatat aaatgtattt atggaatatt gtgcaaatgt tatttgagtt 3240

 ttttactgtt ttgtaatga agaaattcct ttttaaata tttttccaaa ataaatttta 3300
 tgaatgacaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 3360
 aaaaaa 3366

 <210> 4
 <211> 723
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Gly Ser Arg Cys Ala Leu Ala Leu Ala Val Leu Ser Ala Leu Leu

1 5 10 15
 Cys Gln Val Trp Ser Ser Gly Val Phe Glu Leu Lys Leu Gln Glu Phe
 20 25 30

 Val Asn Lys Lys Gly Leu Leu Gly Asn Arg Asn Cys Cys Arg Gly Gly
 35 40 45
 Ala Gly Pro Pro Pro Cys Ala Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu
 50 55 60
 Lys His Tyr Gln Ala Ser Val Ser Pro Glu Pro Pro Cys Thr Tyr Gly
 65 70 75 80
 Ser Ala Val Thr Pro Val Leu Gly Val Asp Ser Phe Ser Leu Pro Asp
 85 90 95
 Gly Gly Gly Ala Asp Ser Ala Phe Ser Asn Pro Ile Arg Phe Pro Phe

 100 105 110
 Gly Phe Thr Trp Pro Gly Thr Phe Ser Leu Ile Ile Glu Ala Leu His
 115 120 125
 Thr Asp Ser Pro Asp Asp Leu Ala Thr Glu Asn Pro Glu Arg Leu Ile
 130 135 140
 Ser Arg Leu Ala Thr Gln Arg His Leu Thr Val Gly Glu Glu Trp Ser
 145 150 155 160
 Gln Asp Leu His Ser Ser Gly Arg Thr Asp Leu Lys Tyr Ser Tyr Arg
 165 170 175

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

 245 250 255

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

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

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

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

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

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

ctggcgata gtgcaagaga taccggtcta gaacactctg ggagcggcag cggctgccga 60
 gtgacgccgg gccgggaaac cagggcgcgc gccgcagtcc ttgccaccac cgttcccacc 120

 gcgccccctg gggccccgga ttatcgcttc accggtggga tttccagacc gcccttctct 180
 aataggcctg cgaaggaagc cactgcaagc tctcttggga attaagctga acatctgggc 240
 tctcttcct ctgigtctta tctctttct cctctttccc tccgcaaga agcttaagac 300
 aaaaccagaa agcaggagac actcacctct ccgtggactg aaagccagac gaagagggaaa 360
 ccgaaagtgt tcctttctca gtgcctcgtg gagctcttgc cggggaccta gctgaaggca 420
 ccgcaccctc ctgaagcgac ctggccctga tagcacacct ggagccgaga gacgcctttc 480
 cgccagtact cctcgggtca tatagacttt cctggcatcc ctgggtcttt gaagaagaaa 540

 gaaaagagga tactctagga gagcaagggc gtccagcggg accatgggcc gtcggagcgc 600
 gctagccctt gccgtggtct ctgcctgct gtgccaggtc tggagctccg gcgtatttga 660
 gctgaagctg caggagtctg tcaacaagaa ggggctgctg gggaaccga actgctgccg 720
 cggggctct ggcccctt gcgcctgcag gaccttcttt cgcgtatgcc tcaagcacta 780
 ccaggccagc gtgtcaccgg agccacctg cacctacggc agtgctgtca cgccagtgt 840
 ggggtgcgac tccttcagcc tgctgatgg cgcaggcatc gaccccctct tcagcaacc 900
 catccgattc ccttcggct tcaactggcc aggtacctc tctctgatca ttgaagcct 960

 ccatacagac tctcccgatg acctcgcaac agaaaacca gaaagactca tcagcccct 1020
 gaccacacag aggacctca ctgtgggaga agaattggtct caggacctc acagtgcgg 1080
 ccgcacagac ctccggtact cttaccggtt tgtgtgtgac gagcactact acggagaagg 1140
 ttgtctgtg ttctgccgac ctccggatga cgcctttggc cacttcaact gcggggacag 1200
 aggggagaag atgtgcgacc ctggctggaa aggccagtac tgcaactgacc caatctgtct 1260
 gccagggtgt gatgaccaac atggatactg tgacaaacca ggggagtgca agtgcagagt 1320
 tggctggcag ggccgctact gcgatgagtg catccgatac ccaggttgtc tccatggcac 1380

 ctgccagcaa ccctggcagt gtaactgcca ggaaggctgg gggggccttt tctgcaacca 1440
 agacctgaac tactgtactc accataagcc gtgcaggaat ggagccacct gcaccaacac 1500
 gggccagggg agctacacat gtctctgccg acctgggtat acaggtgcca actgtgagct 1560
 ggaagtagat gagtgtctc ctagcccctg caagaacgga gcgagctgca cggaccttga 1620
 ggacagcttc tcttgcaact gccctcccgg cttctatggc aaggtctgtg agctgagcgc 1680
 catgacctgt gcagatggcc cttgcttcaa tggaggacga tgttcagata accctgacgg 1740

aggctacacc tgccattgcc ccttgggctt ctctggcttc aactgtgaga agaagatgga 1800

tctctgcggc tcttcccctt gttctaacgg tgccaagtgt gtggacctcg gcaactctta 1860

cctgtgcegg tgccaggctg gcttctccgg gaggtactgc gaggacaatg tggatgactg 1920

tgccctctcc ccgtgtgcaa atggggggcac ctgccgggac agtgtgaacg acttctcctg 1980

tacctgcccc cctggctaca cgggcaagaa ctgcagcgcc cctgtcagca ggtgtgagca 2040

tgcacctgc cataatgggg ccacctgcca ccagaggggc cagcgctaca tgtgtgagtg 2100

cgcccagggc tatggcgccc ccaactgcca gtttctgctc cctgagccac caccagggcc 2160

catggtggtg gacctcagtg agaggcatat ggagagccag ggcgggcctt tcccctgggt 2220

ggccgtgtgt gccggggtgg tgcttgtect cctgctgctg ctgggctgtg ctgctgtggt 2280

ggtctgctgc cggtgaagc tacagaaaca ccagcctcca cctgaacctt gtgggggaga 2340

gacagaaacc atgaacaacc tagccaattg ccagcgcgag aaggacgttt ctgttagcat 2400

cattggggct acccagatca agaacaccaa caagaaggcg gactttcacg gggaccatgg 2460

agccgagaag agcagcttta aggtccgata ccccactgtg gactataacc tcgttcgaga 2520

cctcaagggg gatgaagcca cggtcagggg tacacacagc aaactgaca ccaagtgcca 2580

gtcacagagc tctgcaggag aagagaagat cgcccccaaca cttaggggtg gggagattcc 2640

tgacagaaaa aggccagagt ctgtctactc tacttcaaag gacaccaagt accagtcggt 2700

gtatgttctg tctgcagaaa aggatgagtg tgttatagcg actgagggtg aagatggaag 2760

cgatgtgcca aaattcccat ttctcttaa taaaattcca aggatatagc cccgatgaat 2820

gctgctgaga gaggaagggg gaggaaacc agggactgct gctgagaacc aggttcaggc 2880

gaagctggtt ctctcagagt tagcagagc gcccgacact gccagcctag gctttggctg 2940

ccgctggact gcctgctggt tgttcccatt gcactatgga cagttgcttt gaagagtata 3000

tatttaaag gacgagtgac ttgattcata taggaagcac gcactgcccc cacgtctatc 3060

ttggattact atgagccagt ctttccttga actagaaaca caactgcctt tattgtcctt 3120

tttgatactg agatgtgttt tttttttcc tagacgggaa aaagaaaacg tgtgttattt 3180

ttttgggatt tgtaaaaata tttttcatga tatctgtaaa gcttgagtat tttgtgactg 3240

tcatTTTTT ataattTaa ttttggTaa tatgtacaaa ggcacttcgg gtctatgtga 3300

ctatattttt ttgtatataa atgtatttat ggaatattgt gcaaatgtta tttgagtttt 3360

ttactgtttt gttaatgaag aaattcattt taaaaatatt tttccaaat aaatataatg 3420

aactacaaaa aaaaaaaaaa aaaa 3444

<210> 6

<211> 722

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220
 Cys Leu Pro Gly Cys Asp Asp Gln His Gly Tyr Cys Asp Lys Pro Gly
 225 230 235 240
 Glu Cys Lys Cys Arg Val Gly Trp Gln Gly Arg Tyr Cys Asp Glu Cys
 245 250 255
 Ile Arg Tyr Pro Gly Cys Leu His Gly Thr Cys Gln Gln Pro Trp Gln
 260 265 270
 Cys Asn Cys Gln Glu Gly Trp Gly Gly Leu Phe Cys Asn Gln Asp Leu

 275 280 285
 Asn Tyr Cys Thr His His Lys Pro Cys Arg Asn Gly Ala Thr Cys Thr
 290 295 300
 Asn Thr Gly Gln Gly Ser Tyr Thr Cys Ser Cys Arg Pro Gly Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gly Ala Asn Cys Glu Leu Glu Val Asp Glu Cys Ala Pro Ser Pro Cys
 325 330 335
 Lys Asn Gly Ala Ser Cys Thr Asp Leu Glu Asp Ser Phe Ser Cys Thr
 340 345 350

 Cys Pro Pro Gly Phe Tyr Gly Lys Val Cys Glu Leu Ser Ala Met Thr
 355 360 365
 Cys Ala Asp Gly Pro Cys Phe Asn Gly Gly Arg Cys Ser Asp Asn Pro
 370 375 380
 Asp Gly Gly Tyr Thr Cys His Cys Pro Leu Gly Phe Ser Gly Phe Asn
 385 390 395 400
 Cys Glu Lys Lys Met Asp Leu Cys Gly Ser Ser Pro Cys Ser Asn Gly
 405 410 415
 Ala Lys Cys Val Asp Leu Gly Asn Ser Tyr Leu Cys Arg Cys Gln Ala

 420 425 430
 Gly Phe Ser Gly Arg Tyr Cys Glu Asp Asn Val Asp Asp Cys Ala Ser
 435 440 445
 Ser Pro Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Arg Asp Ser Val Asn Asp Phe
 450 455 460
 Ser Cys Thr Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Lys Asn Cys Ser Ala Pro

465 470 475 480
 Val Ser Arg Cys Glu His Ala Pro Cys His Asn Gly Ala Thr Cys His
 485 490 495

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

 565 570 575
 Gln Pro Pro Pro Glu Pro Cys Gly Gly Glu Thr Glu Thr Met Asn Asn
 580 585 590
 Leu Ala Asn Cys Gln Arg Glu Lys Asp Val Ser Val Ser Ile Ile Gly
 595 600 605
 Ala Thr Gln Ile Lys Asn Thr Asn Lys Lys Ala Asp Phe His Gly Asp
 610 615 620
 His Gly Ala Glu Lys Ser Ser Phe Lys Val Arg Tyr Pro Thr Val Asp
 625 630 635 640

 Tyr Asn Leu Val Arg Asp Leu Lys Gly Asp Glu Ala Thr Val Arg Asp
 645 650 655
 Thr His Ser Lys Arg Asp Thr Lys Cys Gln Ser Gln Ser Ser Ala Gly
 660 665 670
 Glu Glu Lys Ile Ala Pro Thr Leu Arg Gly Gly Glu Ile Pro Asp Arg
 675 680 685
 Lys Arg Pro Glu Ser Val Tyr Ser Thr Ser Lys Asp Thr Lys Tyr Gln
 690 695 700
 Ser Val Tyr Val Leu Ser Ala Glu Lys Asp Glu Cys Val Ile Ala Thr

 705 710 715 720

Glu Val

<210> 7

<211> 3420

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

aggtttcagt agcggcgtg cgcgcaggcc gggaacacga ggccaagagc cgcagcccca    60
gccgccttgg tgcagcgtac accggcacta gcccgttgc agccccagga ttagacagaa    120
gacgcgtcct cggcgcggtc gccgcccagc cgtagtcacc tggattacct acagcggcag    180
ctgcagcggg gccagcgaga aggccaaagg ggagcagcgt cccgagagga gcgcctcttt    240
tcagggacct cggcggctgg cggacgcgcg ggaaagcggc gtcgcgaaca gagccagatt    300

gagggcccgc ggggtggagag agcgcagccc gaggggatgg cggcagcgtc ccggagcggc    360
tctggctggg cgctactgct gctggtgca ctttggcagc agcgcgcggc cggctccggc    420
gtcttccagc tgcagctgca ggagttcacc aacgagcgcg gcgtactggc cagtgggcgg    480
ccttgcgagc ccgctgccc gactttcttc cgcgtctgcc ttaagcactt ccagcggctc    540
gtctcggccc gaccctgcac cttcgggacc gtctccacgc cggatttggg caccaactcc    600
ttcgtgtcc gggacgacag tagcggcggg gggcgcaacc ctctccaact gcccttcaat    660
ttcaactggc cgggtacctt ctcgctcacc atcgaagctt ggcacgcgcc aggagacgac    720

ctgcggccag aggccttgcc accagatgca ctcatcagca agatcgccat ccagggtctc    780
ctagctgtgg gtcagaactg gttattggat gagcaaacca gcaccctcac aaggctgcgc    840
tactcttacc gggtcactcg cagtgacaac tactatggag acaactgctc ccgctgtgc    900
aagaagcgcg atgaccactt cggccactat gtgtgccagc cagatggcaa cttgtcctgc    960
ctgcccggtt ggactgggga atattgcaa cagcctatct gtccttcggg ctgtcatgaa    1020
cagaatggct actgcagcaa gccagcagag tgccctctgcc gcccaggctg gcagggccgg    1080
ctgtgtaacg aatgcatccc ccacaatggc tgtgccacg gcacctgcag cactccctgg    1140

caatgtactt gtgatgaggg ctggggaggc ctgttttgtg accaagatct caactactgc    1200
accaccact cccatgcaa gaatgggca acgtgctcca acagtgggca gcgaagctac    1260
acctgcacct gtcgcccagg ctacactggt gtggactgtg agctggagct cagcaggtgt    1320
gacagcaacc cctgtcga tggaggcagc tgtaaggacc aggaggatgg ctaccactgc    1380
ctgtgtctc cgggctacta tggcctgcat tgtgaacaca gcacctgag ctgcgccgac    1440
tccccctgct tcaatggggg ctctgcccgg gagcgcaacc agggggccaa ctatgcttgt    1500

```

gaatgtcccc ccaacttcac cggctccaac tgcgagaaga aagtggacag gtcaccacgc 1560

 aaccctgtg ccaacggggg acagtgcctg aaccgaggtc caagccgcat gtgccgtgc 1620
 cgtcctggat tcacgggcac ctactgtgaa ctccacgtca ggcactgtgc ccgtaacct 1680
 tgcgcccacg gtggcacttg ccatgacctg gagaatgggc tcatgtgcac ctgccctgcc 1740
 ggcttctctg gccgacgctg tgagggtcgg acatccatcg atgcctgtgc ctcgagtccc 1800
 tgttcaaca gggccacctg ctacaccgac ctctccacag acaccttgt gtgcaactgc 1860
 ccttatggct ttgtgggcag ccgctgcgag ttccccgtgg gcttgccgcc cagcttcccc 1920
 tgggtggccg tctcgtggg tgtggggctg gcagtgtgc tggactgtc gggcatggtg 1980

 gcagtggctg tggcgcagct gggcttcca cggccggacg acggcagcag ggaagccatg 2040
 aacaacttgt cggacttcca gaaggacaac ctgattctg ccgccagct taaaaacaca 2100
 aaccagaaga aggagctgga agtggactgt ggcctggaca agtccaactg tggcaaacag 2160
 caaaaccaca cattggacta taatctggcc ccagggcccc tggggcgggg gaccatgcca 2220
 ggaaagttc cccacagtga caagactta ggagagaagg cgccactgc gttacacagt 2280
 gaaaagccag agtgtcgat atcagcgata tgctccccca gggactccat gtaccagtct 2340
 tgtgtttga tatcagagga gaggaatgaa tgtgtcattg ccacggaggt ataaggcagg 2400

 agcctacctg gacatcctg ctacgccccg cggctggacc ttccttctgc attgtttaca 2460
 ttgcatcctg gatgggacgt tttcatatg caactgtctg ctctcaggag gaggaggaa 2520
 tggcaggaac cggacagact gtgaacttgc caagagatgc aataccctc cacaccttg 2580
 ggtgtctgtc tggcatcaga ttggcagctg caccaaccag aggaacagaa gagaagagag 2640
 atgccactgg gcactgcct gccagtagt gccttcaggg ggctcctcc ggggctccgg 2700
 cctgtttcc agagagagtg gcagtagccc catggggccc ggagctgtg tggcctccac 2760
 tggcatcctg gtttcaaaa gtgcctttgg ccaggtcc acggcgacag ttgggcccac 2820

 atcagaaaagg agagaggggg ccaatgaggg caggcctcc tgtgggctgg aaaaccactg 2880
 ggtgcgtctc ttgctggggg ttgcctgga ggtgaggtga gtgctcagg gaggggagtg 2940
 ctttctgccc catgctcca actactgtat gcaggcctgg ctctctggtc taggcccttt 3000
 gggcaagaat gtcgcttac ccggcttcca ccacctctg gcctgggct tctgtaagca 3060
 gacaggcaga gggcctgccc ctcccaccag ccaaggtgc caggcctaac tggggcactc 3120
 agggcagtg gttgaaatt ccactgaggg ggaatcagg tgctgcggcc gcctgggccc 3180
 tttctcct caagccatc tccacaacct cgagcctggg ctctggtcca ctactgcccc 3240

agaccaccct caaagctggt cttcagaaat caataaatg agtttttatt ttgttttttt 3300

tttttttttt gtagtttatt ttggagtcta gtatttcaat aatttaagaa tcagaagcac 3360

tgacctttct acattttata acattatfff gtatataatg tgtatttata atatgaaaca 3420

<210> 8

<211> 685

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg

35 40 45

Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ile Gln Gly Ser Leu Ala Val Gly Gln Asn Trp Leu Leu Asp Glu Gln

145 150 155 160

Thr Ser Thr Leu Thr Arg Leu Arg Tyr Ser Tyr Arg Val Ile Cys Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

<211> 3451

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 9

atataagaaa ggctctggag caagcaggtt tcagtagcgg cgctgctcgc aggctaggaa	60
cccgaggcca agagctgcag ccaaagtcac ttgggtgcag tgtactcct cactagcccg	120
ctcgagacc taggatttgc tccaggacac gtacttagag cagccaccgc ccagtcgcc	180
tcacctggat tacctaccga ggcacgcagc agcggagttt ttgagaaggc gacaagggag	240
cagcgtccc aggggaatca gcttttcagg aactcggctg gcagaccgga cttcggggag	300
agcgacatcc ctaacaagca gattcggagt cccggagtgg agaggacacc ccaagggatg	360
acgcctgcgt cccggagcgc ctgtcgctgg gcgctactgc tgctggcgg actgtggccg	420
cagcagcgcg ctgcgggctc cggcatcttc cagctgcggc tgcaggagt cgtcaaccag	480
cgcggtatgc tggccaatgg gcagtcctgc gaaccgggct gccggacttt cttccgcac	540
tgccttaagc acttccaggc aaccttctcc gagggacct gcacctttgg caatgtctcc	600
acgccggtat tgggaccaa ctctctctgc gtcagggaca agaatagcgg cagtggctgc	660
aacctctgc agttgccctt caatttacc tggccgggaa cttctcact caacatcaa	720
gcttggcaca caccgggaga cgacctgcgg ccagagactt cgccaggaaa ctctctcatc	780
agccaaatca tcatccaagg ctctcttctgt gtgggtaaga tttggcgaac agacgagcaa	840
aatgacacc tcaccagact gagctactct taccgggtca tctgcagtga caactactat	900
ggagagagct gttctcgct atgcaagaag cgcgatgacc acttcggaca ttatgagtgc	960
cagccagatg gcagcctgct ctgcctgccg ggctggactg ggaagtactg tgaccagcct	1020
atatgtcttt ctggctgtca tgagcagaat ggttactgca gcaagccaga tgagtgcac	1080
tgccgtccag gttggcaggg tcgctgtgc aatgaatgta tccccacaa tggctgtcgt	1140
catggcacct gcagcatccc ctggcagtgt gcctgcgatg agggatgggg aggtctgttt	1200
tgtagcaag atctcaacta ctgtactcac cactctccgt gcaagaatgg atcaactgt	1260
tccaacagtg ggccaaaggg ttatactgc acctgtctcc caggctacac tggtagcac	1320
tgtgagctgg gactcagcaa gtgtgccagc aaccctgtc gaaatggagg cagctgtgag	1380
gaccaggaga atagctacca ctgcctgtgt cccccaggct actatggcca gcaactgtgag	1440
catagtacct tgacctgcgc ggactcacc tgcttcaatg ggggctcttg cgggagcgc	1500
aaccaggggt ccagttatgc ctgcgaatgc ccccccaact ttaccggctc taactgtgag	1560
aagaaagtag acaggtgtac cagcaaccg tgtgccaatg gaggccagt ccagaacaga	1620

ggtccaagcc gaacctgccg ctgccggcct ggattcacag gcacccactg tgaactgcac 1680
 atcagcgatt gtgcccgaag tcctgtgcc cacgggggca cttgccacga tctggagaat 1740
 gggcctgtgt gcacctgccc cgctggcttc tctggaaggc gctgagaggt gcggataacc 1800
 cacgatgect gtgectccgg accctgcttc aatggggcca cctgctacac tggcctctcc 1860
 ccaacaact tcgtctgcaa ctgtccttat ggctttgtgg gcagccgctg cgagtttccc 1920
 gtgggcttgc caccagctt cccctgggta gctgtctcgc tgggcgtggg gctagtggta 1980
 ctgctggtgc tcctggtcat ggtggtagt gctgtgcggc agctgcgct tcggaggccc 2040

 gatgacgaga gcaggaagc catgaacaat ctgtcagact tccagaagga caacctaatc 2100
 cctgccccc agctcaaaaa cacaaccag aagaaggagc tggagtggc ctgtggtctg 2160
 gacaagtcca attgtggcaa actgcagaac cacacattgg actacaatct agccccggga 2220
 ctctaggac gggcgcat gcctgggaag taccctcaca gtgacaagag cttaggagag 2280
 aaggtgccac ttcggttaca cagtgagaag ccagagtgc gaatatcagc catttgctct 2340
 cccagggact ctatgtacca atcagtgtgt ttgatatacag aagagaggaa cgagtgtgtg 2400
 attgccacag aggtataagg caggagccta ctcacacacc cagctccggc ccagcagctg 2460

 ggcttccct ctgcattgtt tacattgcat cctgtatggg acatctttag tatgcacagt 2520
 gctgctctgc ggaggaggag gaaatggcat gaactgaaca gactgtgaac ccgccaagag 2580
 tcgcaccggc tctgcacacc tccaggagtc tgcctggctt cagatgggca gcccccaa 2640
 gggaacagag ttgaggagtt agaggagcat cagttagct gatataaag gtgctctcg 2700
 aacttgact tgctctgcca acagtgtca tcatggagct cttgactgtt ctccagagag 2760
 tggcagtgcc cctagtgggt cttggcgtg ctgtagctcc tgtgggcatc tgtatttcca 2820
 aagtgcctt gccagactc catctcaca gctgggcca aatgagaaag cagagaggag 2880

 gcttgcaaag gatagcctc ccgaggcag aacagccttg gagtttgca ttaagcagga 2940
 gctactctgc aggtgaggaa agcccaggga ggggacacgt gtgactcctg cctccaacc 3000
 cagttagtgg agtccacct gtagcctcta ggcaagagtt ggtccttccc ctggtcctgg 3060
 tgcctctggg ctcatgtgaa cagatgggct tagggcacgc cccttttccc agccaggggt 3120
 acaggcctca ctggggagct cagggccttc atgctaaact cccaataagg gagatggggg 3180
 gaaggggct gtggcctagg cccttccctc cctcacacc atttctgggc ccttgagcct 3240
 gggctccacc agtgcctact gctgccccga gaccaacctt gaagccgac ttcaaaaatc 3300

 aataatatga ggttttgtt ttagtattat tttggaatct agtatattga taatttaaga 3360
 atcagaagca ctggccttcc tacattttat aacattattt tgtatataat gtgtattat 3420
 aatatgaac agatgtgtac aggaatttat t 3451

<210> 10

<211> 686

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

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

<400> 11

agctgggta aggagttaa ggcagcgccc acacccgggg gctctccgca acccgaccgc 60
ctgtccgctc ccccacttcc cgcctcctc cccacctact cattcaccca cccaccacc 120
cagagccggg acggcagccc aggcgcccgg gccccgccgt ctctcgcgg cgatcctgga 180
cttctctttg ctgcaggacc cggcttcac gtgtgtccc gagccggcgt ctcagcacac 240
gctccgctcc gggcctgggt gcctacagca gccagagcag cagggagtcc gggaccggg 300
cggcatctgg gccaagttag gcgccgccga ggccagcgt gaacgtctcc agggccggag 360

gagccgccc ggcctcgggt ctgagccgca gcaaatgggc tccagctgc gggacctgaa 420
cgcgctgtg cccgccgtcc cctccctggg tggcggcggc ggctgtgcc tgcctgtgag 480
cggcgcggcg cagtgggcgc cgggtctgga ctttgcgcc cggggcgtt cggttacgg 540
gtcgttgggc ggccccgcgc cgccaccggc tccgcccca cccccgcgc cgccgctca 600
ctccttcatc aaacaggagc cgagctgggg cggcgcggag ccgcacagg agcagtgcct 660
gagcgccttc actgtccact tttccggcca gttactggc acagccggag cctgtcgta 720
cgggcccttc ggtcctctc cgcccageca ggcgtcatcc ggccaggcca ggatgttcc 780

taacgcgcc tacttgccca gctgcctcga gagccagccc gctattcgca atcagggtta 840
cagcacggtc accttcgacg ggacgcccag ctacggtcac acgcctcgc accatgcggc 900
gcagttcccc aaccactcat tcaagcatga ggatccatg ggccagcagg gctcgtggg 960
tgagcagcag tactcgtgtc cgccccgggt ctatggctgc cacacccca cgcacagctg 1020
caccggcagc caggctttgc tgctgaggac gccctacagc agtgacaatt tataccaat 1080
gacatcccag cttgaatgca tgacctggaa tcagatgaac ttaggagcca ccttaaaggg 1140
ccacagcaca gggtagcaga gcgataacca cacaacgcc atcctctgcg gagccaata 1200

cagaatacac acgcacgggt tcttcagagg cattcaggat gtgcgacgtg tgcctggagt 1260
agccccgact cttgtacggc cggcatctga gaccagttag aaacgccct tcatgtgtgc 1320
ttaccaggc tgcaataaga gatatttaa gctgtccac ttacagatgc acagcaggaa 1380
gcacactggt gagaaacat accagtgtga cttcaaggac tgtgaacgaa ggttttctcg 1440
ttcagaccag ctcaaaagac accaaaggag acatacagg gtgaaacat tccagtgtaa 1500
aacttgtcag cgaaagtct cccggctcca ccactgaag acccacca ggaactcac 1560
aggtagaaag cccttcagct gtcggtggcc aagtgtcag aaaaagttg cccggtcaga 1620

tgaattagtc cgccatcaca acatgcatca gagaacatg accaaactcc agctggcgt 1680
ttgaggggtc tcctcgggg accgttcagt gtcccaggca gcacagtgtg tgaactgctt 1740
tcaagtctga ctctccactc ctctcacta aaaaggaac ttcagttgat cttcttcatc 1800

caacttccaa gacaagatac cgggtcttct ggaaactacc aggtgtgcct ggaagagtg 1860
 gtctctgccc tgcctacttt tagttgactc acaggccctg gagaagcagc taacaatgct 1920
 tggtagtita aaagcccatt gccatitggt gtggattttc tactgtaaga agagccatag 1980
 ctgatcatgt ccccctgacc ctteccctct tttttatgc tcgttttcgc tggggatgga 2040

attattgtac cattttctat catggaatat ttataggcca gggcatgtgt atgtgtctgc 2100
 taatgtaaac tttgtcatgg tttccattta ctaacagcaa cagcaagaaa taaatcagag 2160
 agcaaggcat cgggggtgaa tcttgtctaa cattcccagag gtcagccagg ctgctaacct 2220
 ggaaagcagg atgtagtctt gccaggcaac ttttaaagct catgcatttc aagcagctga 2280
 agaaaaaac agaactaacc agtacctctg tatagaaac taaaagaatt ttaccattca 2340
 gttaattcaa tgtgaacct ggcaactgc tcttaagaaa ctatgaagat ctgagatttt 2400
 tttgtgatg ttttgactc ttttgagtgg taatcatatg tgtctttata gatgtacata 2460

cctccttgca caaatggagg ggaattcatt ttcactctg ggagtgtcct tagtgtataa 2520
 aaaccatgct ggtatatggc ttcaagttgt aaaaatgaaa gtgactttaa aagaaaatag 2580
 gggatggtcc aggatctcca ctgataagac tgtttttaag taacttaagg acctttgggt 2640
 ctacaagtat atgtgaaaaa aatgagactt actgggtgag gaaatccatt gtttaaagat 2700
 ggtcgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgttg tgtgtgttt tgttttttaa 2760
 gggagggaaat ttattattta ccgttgcttg aaattactgt gtaaatatat gtctgataat 2820
 gatttgctct ttgacaacta aaattaggac tgtataagta ctagatgcat cactgggtgt 2880

tgatcttaca agatattgat gataacactt aaaattgtaa cctgcatttt tcactttgct 2940
 ctcaattaaa gtctattcaa aaggaaaaaa aaaaaaa 2977

<210> 12

<211> 497

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

 Ala Ser Ala Tyr Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro
 115 120 125
 Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro 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

cagagccggg acggcagccc aggcgcccgg gccccccgt ctctcgcg cgatcctgga 180
 ctctctcttg ctgcaggacc cggettccac gtgtgtccc gagccggcgt ctcagcacac 240

 gctccgctcc gggcctgggt gcctacagca gccagagcag cagggagtcc gggacccggg 300
 cggcatctgg gccaagttag gcgccgccga ggccagcgt gaacgtctcc agggccggag 360
 gagccgcccc gcgtccgggt ctgagccgca gcaaatgggc tccgacgtgc gggacctgaa 420
 cgcgtgtctg ccccccgtcc cctccctggg tggcggcggc ggctgtgccc tgcctgtgag 480
 cggcgcggcg cagtgggcgc cgggtctgga ctttgcgccc ccgggcgctt cggcttacgg 540
 gtcgttgggc ggccccgcgc gccaccggc tccgccgcca cccccccgc cgcgcctca 600
 ctcttcatc aaacaggagc cgagctgggg cggcgcggag ccgcacgagg agcagtgcct 660

 gagegccttc actgtccact tttccggcca gttcactggc acagccggag cctgtcgcta 720
 cgggcccttc ggtcctctc cgcccagcca ggcgtcatcc ggccaggcca ggatgtttcc 780
 taacgcgcc tacctgcca gctgcctcga gagccagccc gctattcga atcagggtta 840
 cagcacggtc acctcgacg ggacgccag ctacggtcac acgcctcgc accatgcggc 900
 gcagttcccc aaccactcat tcaagcatga ggatcccatg ggccagcagg gctcgtggg 960
 tgagcagcag tactcgggtc cgccccgggt ctatggctgc cacacccca ccgacagctg 1020
 caccggcagc caggctttgc tgctgaggac gccctacagc agtgacaatt tataccaaat 1080

 gacatcccag cttgaatgca tgacctgaa tcagatgaac ttaggagcca ccttaaaggg 1140
 agttgctgct gggagctcca gctcagtga atggacagaa gggcagagca accacagcac 1200
 agggtagcag agcgataacc acacaacgcc catcctctgc ggagcccaat acagaataca 1260
 cacgcacggt gtcttcagag gcattcagga tgtgcgacgt gtgcctggag tagccccgac 1320
 tcttgtacgg tcggcatctg agaccagtga gaaaacgccc ttcattgtgt cttaccagg 1380
 ctgcaataag agatatttta agctgtccca cttacagatg cacagcagga agcacactgg 1440
 tgagaaacca taccagtgtg acttcaagga ctgtgaacga aggttttctc gttcagacca 1500

 gctcaaaaaga caccaaagga gacatacagg tgtgaaacca ttccagtgtg aaacttgtca 1560
 gcgaaagttc tccgggtccg accactgaa gaccacacc aggactcata caggtgaaaa 1620
 gcccttcagc tgtcgggtgc caagttgtca gaaaaagttt gcccggtcag atgaattagt 1680
 ccgccatcac aacatgcatc agagaaacat gaccaaactc cagctggcgc tttgagggt 1740
 ctccctcggg gaccgttcag tgtcccaggc agcacagtgt gtgaactgct ttcaagtctg 1800
 actctccact cctctcact aaaaaggaaa cttcagttga tcttcttcat ccaacttcca 1860

agacaagata ccggtgcttc tggaaactac caggtgtgcc tggaaagatt ggtctctgcc 1920

ctgcctactt ttagttgact cacaggccct ggagaagcag ctaacaatgt ctggttagtt 1980

aaaagcccat tgccatttgg tgtggatttt ctactgtaag aagagccata gctgatcatg 2040

tccccctgac ccttcccttc ttttttatg ctcgttttcg ctggggatgg aattattgta 2100

ccattttcta tcatggaata tttataggcc agggcatgtg tatgtgtctg ctaatgtaaa 2160

ctttgtcatg gtttccattt actaacagca acagcaagaa ataatcaga gagcaaggca 2220

tcggggtgga atcttgtcta acattcccga ggtcagccag gctgctaacc tggaaagcag 2280

gatgtagttc tgccaggcaa cttttaaagc tcatgcattt caagcagctg aagaaaaaat 2340

cagaactaac cagtacctct gtatagaat ctaaaagaat tttaccattc agttaattca 2400

atgtaacac tggcacactg ctcttaagaa actatgaaga tctgagattt ttttgtgtat 2460

gtttttgact cttttgagtg gtaatcatat gtgtctttat agatgtacat acctccttgc 2520

acaaatggag gggaaattcat tttcatcact gggagtgtcc ttagtgtata aaaacatgc 2580

tggatatagg cttcaagttg taaaaatgaa agtgacttta aaagaaaata ggggatggtc 2640

caggatctcc actgataaga ctgtttttaa gtaacttaag gacctttggg tctacaagta 2700

tatgtgaaaa aatgagact tactgggtga ggaaatccat tgtttaaaga tggtcgtgtg 2760

tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtt gtgtgtgtt ttgtttttta aggagaggaa 2820

tttattattt accgttgctt gaaattactg tgtaaatata tgtctgataa tgatttgctc 2880

tttgacaact aaaattagga ctgtataagt actagatgca tcactgggtg ttgatcttac 2940

aagatattga tgataacact taaaattgta acctgcattt ttcactttgc tctcaattaa 3000

agtctattca aaaggaaaa aaaaaaaaa 3028

<210> 14

<211> 514

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Ser Ala Glu Arg Leu Gln Gly Arg Arg Ser Arg Gly Ala Ser Gly Ser
 50 55 60
 Glu Pro Gln Gln Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu
 65 70 75 80

 Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly 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 Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro
 130 135 140
 Ser Trp Gly Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe

 145 150 155 160
 Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg
 165 170 175
 Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln
 180 185 190
 Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser
 195 200 205
 Gln Pro Ala Ile Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly
 210 215 220

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

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

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

 435 440 445
 Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp
 450 455 460
 His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser
 465 470 475 480
 Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu
 485 490 495
 Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu
 500 505 510

Ala Leu
 <210> 15
 <211> 3037
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15

agctgggta aggagttaa ggcagcgccc acacccgggg gctctccga acccgaccgc 60
ctgtccctc cccacttcc cgcctcctt cccactact cattaccca cccaccacc 120
cagagccggg acggcagccc aggcgcccgg gccccccgt ctctcgccg cgatcctgga 180
cttctcttg ctgcaggacc cggcttcac gtgtgtccc gagccggcgt ctcagcacac 240
gctccgctcc gggcctgggt gcctacagca gccagagcag cagggagtcc gggaccggg 300
cggcatctgg gccaagttag gcgccccga ggccagcgt gaacgtctcc agggccggag 360

gagcccgagg gctcgggt ctgagccga gcaaatgggc tccacgtgc gggacctgaa 420
cgcgtgtg cccgccctt cctccctggg tggcggcggc ggctgtgcc tgcctgtgag 480
cggcggcg cagtggcgcg cgggtctgga ctttgcgcc ccggcgctt cggcttacgg 540
gtcgttggg ggcgccgcgc cgccaccggc tccgcccca cccccgcgc cgccgctca 600
ctccttcatc aaacaggagc cgagctgggg cggcggcggag ccgcacagg agcagtgcct 660
gagcgcctc actgtccact tttccggcca gttactggc acagccggag cctgtcgcta 720
cgggccctc ggtcctctc cgcccagcca ggcgtcatc ggccaggcca ggatgttcc 780

taacgcgcc tactgcccc gctgcctcga gagccagccc gctattcga atcagggtta 840
cagcacggc accttcgacg ggacgcccag ctacggctac acgcctcgc accatgcggc 900
gcagttccc aacctcat tcaagcatga ggatccatg ggccagcagg gctcgctggg 960
tgagcagcag tactcgtg cgcggcgggt ctatggctgc cacacccca cgcacagctg 1020
caccggcagc caggctttgc tgctgaggac gccctacagc agtgacaatt tataccaat 1080
gacatcccag cttgaatgca tgacctggaa tcagatgaac ttaggagcca ccttaaaggg 1140
agttgctgct gggagctcca gctcagtga atggacagaa gggcagagca accacagcac 1200

agggtacgag agcgataacc acacaacgcc cctcctctgc ggagcccaat acagaataca 1260
cacgcacggg gtcttcagag gatttcagga tgtcgcagct gtgcctggag tagccccgac 1320
tcttgtagc tcggcatctg agaccagtga gaaacgccc ttcattgtgtg cttaccagg 1380
ctgcaataag agatatttta agtgtccca cttacagatg cacagcagga agcacactgg 1440
tgagaaacca taccagtgtg acttcaagga ctgtgaacga aggttttctc gttcagacca 1500
gctcaaaaaga cacaaaagga gacatacagg tgtgaaacca ttccagtgtg aaactgtca 1560
gcgaaagttc tcccggctcg accacctgaa gaccacacc aggactcata caggtaaaac 1620

aagtgaag cccttcagct gtcggtgccc aagtgtcag aaaaagttg cccggtcaga 1680
tgaattagtc cgccatcaca acatgcatca gagaacatg accaaactcc agctggcgt 1740
ttgaggggtc tccctcgggg accgttcagt gtcccaggca gcacagtgtg tgaactgctt 1800

tcaagtctga ctctccactc ctctcacta aaaaggaac ttcagttgat cttcttcac 1860
 caacttccaa gacaagatac cgggtcttct ggaaactacc aggtgtgcct ggaagagttg 1920
 gtctctgccc tgcctacttt tagttgactc acaggccctg gagaagcagc taacaatgtc 1980
 tggtagttagta aaagcccatt gccatttggg gtggattttc tactgtaaga agagccatag 2040

ctgatcatgt cccctgacc cttcccttct tttttatgc tcgttttcgc tgggatgga 2100
 attattgtac cattttctat catggaatat ttataggcca gggcatgtgt atgtgtctgc 2160
 taatgtaaac tttgtcatgg tttcattta ctaacagcaa cagcaagaaa taaatcagag 2220
 agcaaggcat cgggggtgaa tcttgtctaa cattcccag gtcagccagg ctgctaacct 2280
 ggaaagcagg atgtagtctt gccaggcaac ttttaaagct catgcatttc aagcagctga 2340
 agaaaaaatc agaactaacc agtacctctg tatagaaatc taaaagaatt ttaccattca 2400
 gttaattcaa tgtgaacact ggcacactgc tcttaagaaa ctatgaagat ctgagatttt 2460

tttgtgatg ttttgactc ttttgagtgg taatcatatg tgtctttata gatgtacata 2520
 cctccttgca caaatggagg ggaattcatt ttcactactg ggagtgtcct tagtgtataa 2580
 aaaccatgct ggtatatggc ttcaagtgt aaaaatgaaa gtgactttaa aagaaaatag 2640
 gggatgggcc aggatctcca ctgataagac tgtttttaag taacttaagg acctttgggt 2700
 ctacaagtat attgaaaaa aatgagactt actgggtgag gaaatccatt gtttaaagat 2760
 ggtcgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgttg tgtgtgttt tgttttttaa 2820
 gggaggggaat ttattattta ccgttgcttg aaattactgt gtaaatatat gtctgataat 2880

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

<210> 16

<211> 517

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

290 295 300
 Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala
 305 310 315 320

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

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

 His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys
 465 470 475 480
 Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser
 485 490 495
 Asp Glu Leu Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys
 500 505 510
 Leu Gln Leu Ala Leu
 515

<210> 17

<211> 2438

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

```

aggcgcttcc accactgccc ctcccggggg gacctgaagg agagggtttg aggccggtct      60

ttgcccgcgg aggtctgcgt gtcgggtctg ggaggaggcc taggagggct cgcgggcccac      120
gggcacacct gggcccagat tctgggggtgc ggacggacgt ctcgagagtg ggtgccgcga      180
ctcgggaccc acggccctcg ccgggcacgg acagttgcgg agcagggtctc tgaggattgt      240
gcagtgccct gggtcctctg ctactcctgg gctcaggaat ggagaagggt tacagcacgg      300
tcaccttcca cgggacgccc agctacggtc acacgccctc gcaccatcgc ggcagttcc      360
ccaaccactc attcaagcat gaggatccca tgggccagca gggtctcgtg ggtgagcagc      420
agtactcggg gcccccccg gtctatggct gccacacccc caccgacagc tgcaccggca      480

gccaggcttt gctgctgagg acgcctaca gcagtgacaa tttatacaa atgacatccc      540
agcttgaatg catgacctgg aatcagatga acttaggagc caccttaaag ggccacagca      600
cagggtacga gagcgataac cacacaacgc ccatcctctg cggagcccaa tacagaatac      660
acacgcacgg tgtcttcaga ggcattcagg atgtgcgacg tgtgcctgga gtagccccga      720
ctcttgtagc gtcggcatct gagaccagtg agaaacgccc cttcatgtgt gcttaccag      780
gctgcaataa gagatatttt aagctgtccc acttacagat gcacagcagg aagcacactg      840
gtgagaaacc ataccagtgt gacttcaagg actgtgaacg aaggttttct cgttcagacc      900

agctcaaaag acaccaaaag agacatacag gtgtgaaacc attccagtgt aaaactgtc      960
agcgaagatt ctcccgttcc gaccacctga agaccacac caggactcat acaggtaaaa     1020
caagtgaaaa gcccttcagc tgtcgggtgc caagttgtca gaaaaagttt gcccggtcag     1080
atgaattagt ccgcatcac aacatgcatc agagaaacat gaccaaactc cagctggcgc      1140
tttgagggtt ctccctcggg gaccgttcag tgtcccaggc agcacagtgt gtgaactgct     1200
ttcaagtctg actctccact cctctcact aaaaaggaaa cttcagttga tcttcttcat     1260
ccaacttcca agacaagata ccggtgcttc tggaaactac caggtgtgcc tggagagtt      1320

ggtctctgcc ctgcctactt ttagttgact cacaggccct ggagaagcag ctaacaatgt     1380
ctggttagtt aaaagcccat tgccatttgg tgtggatfff ctactgtaag aagagccata     1440
gctgateatg tccccctgac ccttcccttc ttttttatg ctcgttttcg ctggggatgg     1500
aattattgta ccattttcta tcatggaata tttataggcc agggcatgtg tatgtgtctg     1560
ctaattgaaa ctttgtcatg gtttccattt actaacagca acagcaagaa ataatcaga     1620
gagcaaggca tcgggggtga atcttgtcta acattcccga ggtcagccag gctgctaacc     1680

```

tggaaagcag gatgtagttc tgccaggcaa cttttaaagc tcatgcattt caagcagctg 1740

 aagaaaaat cagaactaac cagtacctct gtatagaaat ctaaaagaat tttaccattc 1800
 agttaattca atgtgaacac tggcacactg ctcttaagaa actatgaaga tctgagattt 1860
 ttttgtgat gtttttgact cttttgagtg gtaatcatat gtgtctttat agatgtacat 1920
 acctccttgc acaaatggag ggggaattcat tttcatcact gggagtgccc ttagtgtata 1980
 aaaaccatgc tggatatgg cttcaagttg taaaaatgaa agtgacttta aaagaaaata 2040
 ggggatggtc caggatctcc actgataaga ctgtttttaa gtaacttaag gacctttggg 2100
 tctacaagta tatgtgaaaa aatgagact tactgggtga ggaaatccat tgtttaaaga 2160

 tggtcgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtt gtgtgtgtt ttgtttttta 2220
 agggagggaa tttattattt accgttgctt gaaattactg tgtaaatata tgtctgataa 2280
 tgatttgctc tttgacaact aaaattagga ctgtataagt actagatgca tcaactgggtg 2340
 ttgatcttac aagatattga tgataacact taaaattgta acctgcattt ttcactttgc 2400
 tctcaattaa agtctattca aaaggaaaa aaaaaaaaa 2438

<210> 18

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

<210> 19

<211> 2480

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

aggcgctttc accactgccc ctcccggggg gacctgaagg agagggtttg aggccggtct 60
 ttgcccgccg aggtctgcgt gtcgggtctg ggaggaggcc taggagggct cgcgggccac 120
 gggcatcett gggccccagt tctggggtgc ggacggacgt ctcgagagtg ggtgccgcga 180
 ctcgggaccc acggccctcg ccgggcacgg acagttgcgg agcagggtctc tgaggattgt 240

gcagtgcctt gggtccttgc ctactcctgg gctcaggaat ggagaagggt tacagcacgg 300
 tcaccttcca cgggacgccc agctacggtc acacgcccctc gcaccatgcg ggcagttcc 360

ccaaccactc attcaagcat gaggatccca tgggccagca gggctcgtg ggtgagcagc 420
 agtactcggg gccgccccg gtctatggct gccacacccc caccgacagc tgcaccggca 480
 gccaggcttt gctgctgagg acgcccata gcagtgacaa tttatacaca atgacatccc 540
 agcttgaatg catgacctgg aatcagatga acttaggagc cacctaaag ggagtgtctg 600
 ctgggagctc cagctcagtg aaatggacag aagggcagag caaccacagc acagggtacg 660
 agagcgataa ccacacaacg cccatcctct gcggagccca atacagaata cacagcacg 720
 gtgtcttcag aggcattcag gatgtgcgac gtgtgcctgg agtagccccg actcttctac 780

ggtcggcctc tgagaccagt gagaacgcc cttcatgtg tgettacca ggtgcaata 840
 agagatattt taagctgtcc cacttacaga tgcacagcag gaagcacact ggtgagaaac 900
 cataccagtg tgacttcaag gactgtgaac gaaggttttc tcgttcagac cagctcaaaa 960
 gacaccaaag gagacataca ggtgtgaac cattccagtg taaaacttgt cagcgaagt 1020
 tctcccgtc cgaccactg aagaccaca ccaggactca tacaggtgaa aagccctca 1080
 gctgtcggtg gccaaattgt cagaaaaagt ttgcccgctc agatgaatta gtcgccatc 1140
 acaacatgca tcagagaaac atgaccaaac tccagctggc gctttgaggg gtctccctcg 1200

gggaccgttc agtgtccag gcagcacagt gtgtgaactg cttcaagtc tgactctcca 1260
 ctctctctca ctaaaaagga aacttcagtt gatcttcttc atccaacttc caagacaaga 1320
 taccgggtct tctggaaact accaggtgtg cctggaagag ttggtctctg ccctgcctac 1380
 ttttagttga ctacagccc ctggagaagc agctaacaat gtctggttag ttaaaagccc 1440
 attgccattt ggtgtggatt ttctactgta agaagagcca tagctgatca tgeccctg 1500
 acccttccct tcttttttta tgctcgtttt cgctggggat ggaattattg taccattttc 1560
 tatcatggaa tatttatagg ccaggcatg tgtatgtgtc tgctaatgta aactttgtca 1620

tggtttccat ttactaacag caacagcaag aaataaatca gagagcaagg catcgggggt 1680
 gaatctgtc taacattccc gagctcagcc aggctgctaa cctggaaagc aggatgtagt 1740
 tctgccaggc aacttttaaa gctcatgcat ttcaagcagc tgaagaaaa atcagaacta 1800
 accgtacct ctgtatagaa atctaaaaga atttaccat tcagttaatt caatgtgaac 1860
 actggcacac tgctcttaag aaactatgaa gatctgagat ttttttgtgt atgtttttga 1920
 ctcttttgag tggtaatcat atgtgtcttt atagatgtac ataactcctt gcacaaatgg 1980

aggggaattc attttcatca ctgggagtgt ccttagtgta taaaaacat gctggtatat 2040

ggcttcaagt tgtaaaaatg aaagtgactt taaaagaaaa taggggatgg tccaggatct 2100

ccactgataa gactgttttt aagtaactta aggacctttg ggtctacaag tatatgtgaa 2160

aaaaatgaga cttactgggt gaggaaatcc attgtttaaa gatggtcgtg tgtgtgtgtg 2220

tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg ttgtgtgtg tttgttttt taaggagagg aatttattat 2280

ttaccgttgc ttgaaattac tgtgtaaata tatgtctgat aatgatttgc tctttgacaa 2340

ctaaaattag gactgtataa gtactagatg catcactggg tgttgatctt acaagatatt 2400

gatgataaca cttaaaatg taacctgcat ttttcacttt gctctcaatt aaagtctatt 2460

caaaaggaaa aaaaaaaaaa 2480

<210> 20

<211> 302

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 145 150 155 160
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 165 170 175
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 180 185 190
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro

195 200 205
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 210 215 220
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 225 230 235 240
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 245 250 255
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro
 260 265 270

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

<210> 21

<211> 3092

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 21

tgtgtgaatg gageggccga gcatcctggc tcctcctct tcctgctgc cggeccctct	60
tatttgagct ttgggaagct gggggcagcc aggcagctgg ggtaaggagt tcaaggcagc	120
gcccacacc ggggctctcc gcaaccgac gcctgcctg ctccccctt ccttttccg	180
ccctccctcc caccactca ttcaccacc cacccagaga gaggacggca gcccaggaac	240
ccgggcccgc gcctcctcg ccgcgatcct ggacttctc ctgtcgcagg agccggttc	300
cacgtgtgtc ccggagccg cgtctcagca cacgtccgc cgggagccc ggtgcgtcca	360

gcagccggag caacctgggg accgaggccc ccggagcgcc tgggccaagt ccagcgccga 420
 gaatccgag gatcgagga gcggagaacc gtccgcatcc gagccgcacc tcatgggttc 480
 cgactgctgg gacctgaacg cgctgctgcc cgctgtgtct tcgctgggcg gcggcggcgg 540
 cggctgctggg ctccctgtga gcggcgcagc gcagtgggcg cccgtgttgg acttcgccc 600

tccggcgccc tcggcttacg ggtcgctggg cggccccgcg cctcctcccg ctccgccc 660
 gcctccgccc ccaccccact ccttcatcaa acaggagccc agctggggcg gcgcccagcc 720
 acacgaggag cagtgcctga gcgccttac cttgcacttc tcgggccagt tcaccggtac 780
 agccggggcc tgtcgctacg gaccttcgg tectccccg cccagccagg cgtcctcggg 840
 ccaggccagg atgttcccca atgcgcceta cctgcccagc tgctggaga gccagcctac 900
 catccgaac caaggataca gcacggtcac tttcgacggg gcgcccagct atggccacac 960
 gccctcgcat cacgcggcgc agttcccaaa ccatccttc aaacacagg accccatggg 1020

ccagcagggc tcgctgggcg agcagcagta ctccgtgcca cctccggtgt atggctgcca 1080
 caccctact gacagttgca caggcagcca ggccctgtct ctgaggacgc cctacagcag 1140
 tgacaattta taccaaatga cctcccagct tgaatgcatg acctggaatc agatgaacct 1200
 aggagctacc ttaaaggaa tggtgctgg gagctccagc tcagtgaat ggacagaagg 1260
 gcagagcaac cacggcacag ggtatgagag tgagaaccac acggccccca tcctctgtgg 1320
 tgcccagtac agaatacaca cccacggggt cttccgaggc attcaggatg tgcggcgtgt 1380
 atctggagtg gcccaactc ttgtccggtc agcatctgaa accagtgaga aacgtcctt 1440

catgtgtgca taccagct gcaataagag atattttaag ctgtcccact tacagatgca 1500
 tagccggaag cactgtgtg agaaaccata ccagtgtgac ttcaaggact gcgagagaag 1560
 gttttctcgc tcagaccagc tcaaaagaca ccaaaggaga cacacaggtg tgaaccatt 1620
 ccagtgtaaa acttgtcagc gaaagtttc cgggtccgac catctgaaga cccacaccag 1680
 gactataca ggtaaaacaa gtgaaaagcc cttcagctgt cgggtggcaca gttgtcagaa 1740
 aaagtttgcg cgctcagacg aattggtccg ccatcacaac atgcatcaga gaaacatgac 1800
 caaactccag ctggcgcttt gaggggtccg acacggagac agtccagcat cccaggcagg 1860

aaagtgtgca aactgcttcc aaatctgatt ttgaaattcc tcccactcac ctttcaaagg 1920
 acacgactgt ggatctacat ccgacttcca agacagcaca cctgattgac tgeatcetat 1980
 caggtttgcc ggaaggagtc ggtgctccgc ccacttttga ttaactcaca ggctgaaaa 2040
 aagtggttca cgggtcttag aaagtccatt gctattgtct gaattttcta ctgttagaag 2100
 aaccattgtt gataatgcc cccgcccc ccccggtt tcctttctc ctttgtgac 2160
 atttccccag gattagagag actgttacct tttcttcat gggatattta taggccaggg 2220

catgtgtatg tgcctgctaa tgtaaactct gtcatagttc ccatttacta actgccttag 2280

aaagaaataa atcagagagc aaggcaccag gggcaagaat cgtgcagaat ttcagaggtc 2340

tggtcgcaaa cctggaaacc tggaaggcca gatgtaattc tacaggcgat tgttaaagct 2400

cataggtttt gagtaactgc atagtaggtt ggtattaact agaactcctg tatagttagg 2460

acagagagga gccttcctgc tcagctattc actctgaaca ctagcactgg gctcttaaga 2520

aatgatgttt taagagcaga gatctttttt taatgtcttt gatttatttt ttagttgtaa 2580

ttaggtacat cctcagagat gtactttcct cctcttgtgc aggatgtgga ggactcagtt 2640

ccatcatctg gggcatcttt agagtgtata gaccacactg gttatgtggc tccaagttgt 2700

aaaaatataa atgactttaa aagaaactag gggctggtcc aggatcttca ctggtaaagac 2760

tgttcttaag taacttaagt atctttgaat ctgcaagtat gtagggaaaa aaaaaagata 2820

tattattgtg aggaaatcca ttgtttaaag gtgtgcgtgt gttgttgttg ttttttaaag 2880

ggaggagatt tattatttac tgtagcttga aatactgtgt aaatatatat gtatatatat 2940

gatgtgctct ttgtcaacta aaattaggag gtgtatggta ttagctgcat cactgtgtgg 3000

atgtcaatct tacagtgtat tgatgataat actaaaaatg taacctgcat cttttccac 3060

ttggctgtca attaaagtct attcaaaaagg aa 3092

<210> 22

<211> 517

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Met Asp Phe Leu Leu Ser Gln Glu Pro Ala Ser Thr Cys Val Pro Glu
 1 5 10 15

Pro Ala Ser Gln His Thr Leu Arg Arg Glu Pro Gly Cys Val Gln Gln
 20 25 30

Pro Glu Gln Pro Gly Asp Arg Gly Pro Arg Ser Ala Trp Ala Lys Ser
 35 40 45

Ser Ala Glu Asn Pro Gln Asp Arg Arg Ser Gly Glu Pro Ser Ala Ser
 50 55 60

Glu Pro His Leu Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu
 65 70 75 80

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

tcttcagcct cggatgggtg cagccctcga ggaccctggc tggagagaca gggcaggagg 240

 ctgcgccct ggacggagtc ctggccaacc cacctaacat ttccagcctc tcccctcgcc 300
 aactccttgg cttcccgtgt gcggagggtg cggcctgag cacggagcgt gtcggggagc 360
 tggctgtggc cttggcacag aagaatgtca agctctcaac agagcagctg cgctgtctgg 420
 ctaccggct ctctgagccc cccgaggacc tggacgcctt cccattggac ctgctgctat 480
 tcctcaacc agatgcgttc tgggggcccc aggcctgcac ccgtttcttc tcccgcata 540
 cgaaggccaa tgtggacctg ctcccagggg gggctcccga gcgacagcgg ctgctgcctg 600
 cggtcttggc ctgctgggggt gtgcgggggt ctctgctgag cgaggctgat gtgcgggctc 660

 tgggaggcct ggcttgcgac ctgcctgggc gctttgtggc cgagtggcc gaagtgtctc 720
 taccgccgct ggtgagctgc ccgggacccc tggaccagga ccagcaggag gcagccaggg 780
 cggctctgca gggcggggga cccccctacg gccccccgtc gacatggtct gtctccacga 840
 tggacgtctt gcggggcctg ctgcccgtgc tgggccagcc catcatccgc agcatcccgc 900
 agggcatcgt ggccgcgtgg cggcaacgct cctctcgga cccatcctgg cggcagcctg 960
 aacggaccat cctccggccg cggttccggc ggggaagtga gaagacagcc tgtccttcag 1020
 gcaagaaggc ccgcgagata gacgagagcc tcatttctca caagaagtgg gagctggaag 1080

 cctgcgtgga tgggccctg ctggccacc agatggaccg cgtgaaccgc atccccttca 1140
 cctacgagca gctggacgtc ctaaagcata aactggatga gctctacca caaggttacc 1200
 ccgagtctgt gatccagcac ctgggctacc tcttctcaa gatgagcctt gaggacattc 1260
 gcaagtggaa tgtgacgtcc ctggagacc tgaaggcttt gcttgaagtc aacaaagggc 1320
 acgaaatgag tcctcaggtg gccaccctga tcgaccgctt tgtgaaggga agggggccagc 1380
 tagacaaaga caccctagac acctgaccg ctttctacc tgggtacctg tgetccctca 1440
 gccccgagga gctgagctcc gtgccccca gcagcatctg ggcggtcagg ccccaggacc 1500

 tggacacgtg tgaccaagg cagctggacg tcctctatcc caaggcccgc cttgctttcc 1560
 agaacatgaa cgggtccgaa tacttctgta agatccagtc cttctgggt ggggccccca 1620
 cggaggattt gaaggcgtc agtcagcaga atgtgagcat ggacttggcc acgttcatga 1680
 agctgcggac ggatgcggtg ctgccgttga ctgtggctga ggtgcagaaa cttctgggac 1740
 cccacgtgga gggcctgaag gcggaggagc ggcaccgccc ggtgcgggac tggatcctac 1800
 ggcagcggca ggacgacctg gacacgctgg ggctggggct acagggcggc atcccacag 1860
 gctacctggt cctagacctc agcatgcaag aggcctctc ggggacgccc tgcctcctag 1920

gacctggacc tgttctcacc gtcctggcac tgctcctagc ctccaccctg gcctgagggc 1980
 cccactcctt tgctggcccc agccttctct gggatccccg cctggccagg agcaggcagc 2040
 ggtggteccc gttccacccc aagagaactc gcctcagta aacgggaaca tgccccctgc 2100
 agacacgtaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2126

<210> 24

<211> 622

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

acggctcgac ccctgttggg gtcctgtggg accccccccc tcggcagcct cctgttcctg 240

ctcttcagcc tcggatgggt gcagcccctcg aggaccctgg ctggagagac agggcaggag 300

gctgcgcccc tggacggagt cctggccaac ccacctaaca tttccagcct cteccctcgc 360

caactccttg gcttcccctg tgcggagggt tccggcctga gcacggagcg tgtccgggag 420

ctggctgtgg ccttggcaca gaagaatgtc aagctctcaa cagagcagct gcgctgtctg 480

gctcaccggc tctctgagcc ccccaggac ctggacgccc tcccattgga cctgctgcta 540

ttcctcaacc cagatgcgtt ctcggggccc caggcctgca cccgtttctt cteccgcatc 600

acgaaggcca atgtggacct gctcccaggg ggggctcccg agcgacagcg gctgctgcct 660

gcggtcttgg cctgctgggg tgtcgggggg tctctgctga gcgaggctga tgtcgggct 720

ctgggaggcc tggcttgcga cctgcctggg cgctttgtgg ccgagtcggc cgaagtgtctg 780

ctacccccgc tggtagctg cccgggacct ctggaccagg accagcagga ggcagccagg 840

gcggtcttgc agggcggggg acccccctac ggccccctg cgacatggtc tgtctccacg 900

atggacgctc tgcggggcct gctgcccgtg ctgggccagc ccatcatccg cagcatcccg 960

cagggcacg tggccgctg gcggcaacgc tcctctcggg acccatcctg gcggcagcct 1020

gaacggacca tcctccggcc gcggttccgg cgggaagtgg agaagacagc ctgtccttca 1080

ggcaagaagg cccgcgagat agacgagagc ctcatcttct acaagaagtg ggagctggaa 1140

gcctgcgtgg atgcggccct gctggccacc cagatggacc gcgtgaacgc catccccttc 1200

acctacgagc agctggacgt cctaaagcat aaactggatg agctctacc acaaggttac 1260

cccgagtctg tgatccagca cctgggctac ctcttctca agatgagccc tgaggacatt 1320

cgcaagtgga atgtgacgtc cctggagacc ctgaaggctt tgcttgaagt caacaaaggg 1380

cacgaaatga gtctcaggt ggccacctg atcgaccgt ttgtgaaggg aaggggccag 1440

ctagacaaag acacctaaga cacctgacc gccttctacc ctgggtacct gtgctcctc 1500

agccccgagg agctgagctc cgtgcccccc agcagcatct gggcggctcag gccccaggac 1560

ctggacacgt gtgaccaag gcagctggac gtcctctatc ccaaggcccg ccttgccttc 1620

cagaacatga acgggtccga atacttctg aagatccagt ccttctcggg tggggcccc 1680

acggaggatt tgaaggcgt cagtcagcag aatgtgagca tggacttggc cacgttcatg 1740

aagctgcgga cggatgcggt gctgccgttg actgtggctg aggtgcagaa acttctggga 1800

ccccactgg agggcctgaa ggccggaggag cggcaccgcc cggcgcggga ctggatccta 1860

cggcagcggc aggacgacct ggacacgctg gggctggggc tacaggcgg catccccaac 1920

ggctacctgg tcctagacct cagcatgcaa gaggcctct cggggacgcc ctgcctccta 1980
 ggacctggac ctgtttctcac cgtcctggca ctgctcctag cctccacct ggcctgaggg 2040
 cccactccc ttgtggccc cagcctgct ggggatcccc gcctggccag ggcagggcac 2100
 ggggtgtccc cgttccacc caagagaact cgcgctcagt aaacgggaac atgccccctg 2160
 cagacacgta aaaaaaaaa aaaaaaa 2187

<210> 26

<211> 622

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

1 5 10 15
 Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln
 20 25 30
 Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
 35 40 45
 Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg
 50 55 60
 Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu
 65 70 75 80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
 85 90 95
 Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
 100 105 110
 Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro
 115 120 125
 Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
 130 135 140
 Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln

145 150 155 160
 Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
 165 170 175

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

 Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp
 225 230 235 240
 Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly
 245 250 255
 Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg
 260 265 270
 Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile
 275 280 285
 Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser
 290 295 300
 Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys
 305 310 315 320
 Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met
 325 330 335
 Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu
 340 345 350
 Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val
 355 360 365

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

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

<210> 27

<211> 2154

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

cgccacgcac tcctctttct gcctggccgg ccaactcccgt ctgctgtgac ggcggacag 60

agagctaccg gtggaccac ggtgcctccc tcctgggat ctacacagac catggccttg 120

ccaacggctc gaccctgtt ggggtcctgt gggacccccg ccctcggcag cctcctgttc 180

 ctgctcttca gcctcggatg ggtgcagccc tcgaggaccc tggctggaga gacagggcag 240
 gaggtcgcgc ccctggacgg agtcctggcc aaccaceta acatttcag cctctccct 300
 cgccaactcc ttggcttccc gtgtcggag gtgtccggcc tgagcacgga gcgtgtccgg 360
 gagctggctg tggccttggc acagaagaat gtcaagctct caacagagca gctgcgctgt 420
 ctggctcacc ggctctctga gcccccgag gacctggacg ccctccatt ggacctgtg 480
 ctattctca acccagatgc gttctcgggg ccccaggcct gcacccttt cttctcccgc 540
 atcacgaagg ccaatgtgga cctgtcccg aggggggctc ccgagcgaca gcggctgtctg 600

 cctcggctc tggcctgtg ggggtgtcgg gggctctctg tgagcagggc tgatgtcgg 660
 gctctgggag gcctggcttg cgacctgctt gggcgctttg tggccgagtc ggccgaagtg 720
 ctgtacccc ggctgggtgag ctgccccgga cccctggacc aggaccagca ggaggcagcc 780
 agggcggctc tgcagggcgg gggaccccc tacggcccc cgtcgacatg gtctgtctcc 840
 acgatggacg ctctcggggg cctgtgccc gtgtcggcc agcccatcat ccgcagcatc 900
 ccgcagggca tcgtggccgc gtggcggcaa cgctcctctc gggaccatc ctggcggcag 960
 cctgaacgga ccatcctccg gcccggttc cggcgggaag tggagaagac agcctgtcct 1020

 tcaggcaaga aggcccgga gatagacgag agcctcatct tctacaagaa gtgggagctg 1080
 gaagcctgcg tggatgcggc cctgtggcc acccagatgg accgcgtgaa cgccatccc 1140
 ttacctaag agcagctgga cgtcctaaag cataaactgg atgagctcta cccacaaggt 1200
 tacccegagt ctgtgatcca gcacctgggc tacctcttcc tcaagatgag ccctgaggac 1260
 attcgcaagt ggaatgtgac gtcctggag acctgaagg ctttcttga agtcaacaaa 1320
 gggcacgaaa tgagtctca ggctcctcgg cgccccctcc cacaggtggc caccctgatc 1380
 gaccgctttg tgaaggaag gggccagcta gacaaagaca ccctagacac cctgaccgcc 1440

 ttctaccctg ggtacctgtg ctccctcagc cccgaggagc tgagctcctg gccccccagc 1500
 agcatctggg cggtcaggcc ccaggacctg gacacgtgtg acccaaggca gctggacgtc 1560
 ctctatccca aggcccgct tgtttccag aacatgaacg ggtccgaata cttcgtgaag 1620
 atccagctct tcctgggtgg ggccccacg gaggatttga aggcgctcag tcagcagaat 1680
 gtgagcatgg acttggccac gttcatgaag ctgcccagg atgcggtgct gccgttgact 1740
 gtggctgagg tgcagaaact tctgggacc cactggagg gcctgaaggc ggaggagcgg 1800
 caccgcccgg tgcgggactg gatcctacgg cagcggcagg acgacctgga cacgtgggg 1860

ctggggctac agggcggcat cccaacggc tacctggtcc tagacctcag catgcaagag 1920
 gccctctcgg ggacgcctg cctcctagga cctggacctg ttctaccctg cctggcactg 1980
 ctctagcct ccaccctggc ctgagggccc cactcccttg ctggccccag ccctgctggg 2040
 gatccccgcc tggccaggag caggcacggg tggccccctg tccaccccaa gagaactcgc 2100
 gctcagtaaa cggaacatg cccctgcag acacgtaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2154

<210> 28

<211> 630

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

1 5 10 15
 Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln
 20 25 30
 Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
 35 40 45
 Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg
 50 55 60
 Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu
 65 70 75 80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
 85 90 95
 Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
 100 105 110
 Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro
 115 120 125
 Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
 130 135 140
 Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln

145 150 155 160
 Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
 165 170 175

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

 Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp
 225 230 235 240
 Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly
 245 250 255
 Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg
 260 265 270
 Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile
 275 280 285
 Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser
 290 295 300
 Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys
 305 310 315 320
 Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met
 325 330 335
 Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu
 340 345 350
 Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val
 355 360 365

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

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Leu Ala Ser Thr Leu Ala

625 630

<210> 29

<211> 2135

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 29

ggacagctgc tttccaggc ccaaaagccc cttcgttgtc tccaacagt ggtgtgggtt

60

gaggggtggg acaagtgggg acctcagagt cattgttatc cacagacat ggccttgcca 120

acagctcgac ccctgctggg gtctgttga agtcccatct gcagccgaag cttcctactg 180

cttctctta gtcttgggtg gataccacgt ctgcagacc agactacaaa gacaagccag 240

gagccacac tctccatgc tgtgaacggt gccgctgact ttgccagtct cccacaggc 300

ctctttcttg gcctcacatg tgaggaggta tctgacctga gcatggaaca agccaagggg 360

ctggctatgg ctgtaagaca gaagaacatt aactccggg gacatcagct gcgttgtctg 420

gcacgtgcc ttcctagca cctaccgac gaggaactga atgctctcc actggacctg 480

ctgctctcc tcaaccagc catgtttcca gggcaacagg cttgtgcca cttctctcc 540

ctcatctcta aagccaatgt ggatgtactc ccacggaggt ctctggagcg ccagagctg 600

ctgatggagg ctctgaagtg ccagggcgtg tatggatttc aagtgagtga ggcagatgtg 660

cgggctctcg gaggcctggc ctgtgacctg cctgggaaat ttgtggccag atcttccgaa 720

gttctctcc cctggctggc aggatgcaa ggaccctgg accagagcca gaaaaggca 780

gtcagggagg ttctgaggag tggaagaacc caatatgcc cccatcgaa gtggtcagtc 840

tccacctgg atgcctgca gagcttggta gcagtgttg atgagtcct cgtccagagc 900

atcccaagg atgtcaaagc tgaatggctg caacacatct ccagagacc ctccagctg 960

gggtctaagc tgaccgtcat acaccaagg tccgacggg atgcagaaca gaaagcctgc 1020

cctccagga aggagcccta caagtgatg gaagacctca tctctacca gaattgggag 1080

ctggaggctt gtgtatagtg caccatgctg gccagacaaa tggacctgt gaacgagatt 1140

cccttcacct atgagcagct cagtatctt aagcacaac tggacaagac ctaccacaa 1200

ggctatctg agtcctgat ccagcagctg ggtcactct tcagatatg tagcctgaa 1260

gacatccacc agtggaatgt gacctacca gacacagtga aaactctgct caaagtcagc 1320

aaaggacaaa agatgaatgc tcagcgatt gccttggctg cctgctatct tcggggagga 1380

ggccagctgg acgaggatat ggtaaaagcc ctggcgaca tccgtaag ctatctatgt 1440

gacttcagcc cccagatct gactcggtg ccctccagtg tcatgtggct ggttgggccc 1500

caagacctgg acaagtgcag ccagagcat ctgggtctcc tctaccagaa ggcctgctca 1560

gccttcaga atgtgagcgg cctagaatac tttgagaaaa tcaagacatt cctgggtggg 1620

gcctccgtga aggacctgc ggccctcagc cagcacaatg tgagcatgga catagccact 1680

ttcaagaggc tgcaggtgga ttccctgggt gggtgagtg tggtgaggt acagaaactt 1740

ctggggccaa acatgtgga cctgaagacc gaggaggata aaagcctgt ccgtgactgg 1800

ctgttccggc agcatcagaa agacctagac aggctgggtt tgggacttca gggtagcatc 1860
 cccaatggct acctggctct ggacttcaat gtccgagagg ccttctccag cagagcctca 1920
 ctcttgggc caggatttgt attaatatgg attccagctc tgctcccagc ttttaaggctg 1980
 agctgagacc accaccctgc aaggctcctg gtcccagctc tactggggcc ctcttgacca 2040
 ggagtgggta ccaggggtca ttgcaaaagt ttgaggactc ttgaactcaa taaacagtgg 2100
 catatgctcc cttgaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 2135

<210> 30

<211> 625

<212> PRT

<213> Mus musculus

<

400> 30

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

<223> Synthetic mesothelin peptide

<400> 31

Gly Gln Lys Met Asn Ala Gln Ala Ile

1 5

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3D beta peptide clone from Mus musculus

<400> 32

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

1 5 10 15

<210> 33

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3D beta nucleotide clone from Mus musculus

<400> 33

tgtgccagca gccctggact ggggggatcc tatgaacagt acttc 45

<210> 34

<

211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<400> 34

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

1 5 10 15

<210> 35

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<400> 35

gtgtccagca gccagggact ggggagctcc tatgaacagt acttc 45

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<400> 36

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

1 5 10

<210> 37

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<400> 37

gtgtccagca gctatatact gggggcctat gaacagtact tc 42

<210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<400> 38

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

1 5 10

<210> 39

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<400> 39

tgtgccagca gctcctggac agtctatgaa cagtacttc 39

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<400> 40

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

1 5 10 15

<210> 41

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

<400> 41

tgtgccagca gctggacagg ggcaaacacc ggcagctct acttt

45

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

> synthetic mesothelin peptide

<400> 42

Ile Ser Lys Ala Asn Val Asp Val Leu

1

5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic mesothelin peptide

<400> 43

Gly Gln Lys Met Asn Ala Gln Ala Ile

1

5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic mesothelin peptide

<400> 44

Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu

1 5

<210>

> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic mesothelin peptide

<400> 45

Leu Leu Gly Pro Asn Ile Val Asp Leu

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic mesothelin peptide

<400> 46

Glu Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic mesothelin peptide

<400

> 47

Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu

1 5

<210> 48

<211> 1595

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

```

agaatcaaaa gaggaaacca acccctaaga tgagctttcc atgtaaattt gtagccagct      60
tccttctgat tttcaatgtt tcttccaaag gtgcagctctc caaagagatt acgaatgcct    120
tggaaacctg ggggtccttg ggtcaggaca tcaacttga caticctagt tttcaaatga    180
gtgatgatat tgacgatata aaatgggaaa aaacttcaga caagaaaaag attgcacaat    240
tcagaaaaga gaaagagact ttcaaggaaa aagatacata taagctatth aaaaatggaa    300

ctctgaaat taagcatctg aagaccgatg atcaggatat ctacaaggta tcaatatatg     360
atacaaaagg aaaaaatgtg ttggaaaaaa tatttgattt gaagattcaa gagagggtct    420
caaaacaaa gatctcctgg acttgtatca acacaacct gacctgtgag gtaatgaatg     480
gaactgacce cgaattaaac ctgtatcaag atgggaaaca tctaaaactt tctcagaggg    540
tcatcacaca caagtggacc accagcctga gtgcaaaatt caagtgcaca gcagggaaaca    600
aagtcagcaa ggaatccagt gtcgagcctg tcagctgtcc agagaaaggt ctggacatct    660
atctcatcat tggcatatgt ggaggaggca gcctcttgat ggtctttgtg gcactgctcg    720

ttttctatat caccaaaagg aaaaaacaga ggagtcggag aatgatgag gagctggaga     780
caagagccca cagagtagct actgaagaaa ggggccggaa gccccaccaa attccagctt    840
caaccctca gaatccagca acttcccaac atctctctcc accacctggt catcgttccc    900
aggcacctag tcatcgtccc ccgctctctg gacaccgtgt tcagcaccag cctcagaaga    960
ggcctctgct tccgtcgggc acacaagttc accagcagaa aggccccccc ctccccagac   1020
ctcgatttca gccaaaacct cccatgggg cagcagaaaa ctattgtcc ctttctcta   1080
attaaaaaag atagaaactg tctttttcaa taaaaagcac tgtggatttc tgcctcctg   1140

```

atgtgcatat ccgtacttcc atgaggtgtt ttctgtgtgc agaacattgt cacctcctga 1200
 ggctgtgggc cacagccacc tctgcatctt cgaactcagc catgtgggtca acatctggag 1260
 tttttggtct cctcagagag ctccatcaca ccagtaagga gaagcaatat aagtgtgatt 1320
 gcaagaatgg tagaggaccg agcacagaaa tcttagagat ttcttgtccc ctctcaggtc 1380
 atgtgtagat gcgataaatc aagtgattgg tgtgcctggg tctcactaca agcagcctat 1440
 ctgcttaaga gactctggag tttcttatgt gccctggtgg acacttgccc accatcctgt 1500
 gagtaaaagt gaaataaaag ctttgactag aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1560

aaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaa 1595

<210> 49

<211> 351

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160
 Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp
 165 170 175
 Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val
 180 185 190
 Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu

 195 200 205
 Asp Ile Tyr Leu Ile Ile Gly Ile Cys Gly Gly Gly Ser Leu Leu Met
 210 215 220
 Val Phe Val Ala Leu Leu Val Phe Tyr Ile Thr Lys Arg Lys Lys Gln
 225 230 235 240
 Arg Ser Arg Arg Asn Asp Glu Glu Leu Glu Thr Arg Ala His Arg Val
 245 250 255
 Ala Thr Glu Glu Arg Gly Arg Lys Pro His Gln Ile Pro Ala Ser Thr
 260 265 270

Pro Gln Asn Pro Ala Thr Ser Gln His Pro Pro Pro Pro Pro Gly His
 275 280 285
 Arg Ser Gln Ala Pro Ser His Arg Pro Pro Pro Pro Gly His Arg Val
 290 295 300
 Gln His Gln Pro Gln Lys Arg Pro Pro Ala Pro Ser Gly Thr Gln Val
 305 310 315 320
 His Gln Gln Lys Gly Pro Pro Leu Pro Arg Pro Arg Val Gln Pro Lys
 325 330 335
 Pro Pro His Gly Ala Ala Glu Asn Ser Leu Ser Pro Ser Ser Asn

 340 345 350
 <210> 50
 <211> 1098
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 50

atggcctca tggctccccg aaccctcgtc ctgctactct cgggggtctt ggccctgacc 60
 cagacctggg cgggtctca ctccatgagg tatttcttca catcctgttc cggccccggc 120

cgcggggagc cccgcttcat cgcagtgggc tacgtggacg acacgcagtt cgtgcggttc 180
 gacagcgacg ccgcgagcca gaggatggag ccgcgggagc cgtggataga gcaggagggt 240
 ccgagatatt gggacgggga gacacggaaa gtgaaggccc actcacagac tcaccgagtg 300
 gacctgggga ccctgcgagg ctactacaac cagagcgagg ccggttctca cacctccag 360

 atgatgtttg gctgcgacgt ggggtcggac tggcgcttcc tccgaggta ccaccagtac 420
 gcctacgacg gcaaggatta catcgccctg aaagaggacc tgcgctcttg gaccgaggcg 480
 gacatggcag ctcagaccac caagcacaag tgggaggcgg cccatgtggc ggagcagttg 540
 agagcctacc tggagggcac gtgcgtggag tggctccgca gatactgga gaacgggaag 600
 gagacgctgc agcgcacgga cgccccaaa acgcatatga ctcaccacgc tgtctctgac 660
 catgaagcca ccctgaggtg ctgggcccctg agcttctacc ctgcggagat cacactgacc 720
 tggcagcggg atggggagga ccagaccag gacacggagc tcgtggagac caggcctgca 780

 ggggatggaa ccttccagaa gtgggaggct gtggtggtgc cttctggaca ggagcagaga 840
 tacacctgcc atgtgcagca tgagggtttg cccaagcccc tcacctgag atgggagccg 900
 tcttcccagc ccaccatccc catcgtgggc atcattgctg gcctggttct ctttggagct 960
 gtgatcactg gagctgtggt cgctgctgtg atgtggagga ggaagagctc agatagaaaa 1020
 ggaggagct actctcaggc tgcaagcagt gacagtgcc agggctctga tgtgtctctc 1080
 acagcttgta aagtgtga 1098

<210> 51

<211> 365

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<

400> 51

Met Ala Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu Leu 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

	325	330	335	
	Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser			
	340	345	350	
	Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val			
	355	360	365	
<210>	52			
<211>	987			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<400>	52			
	aatataagtg gaggcgtcgc gctggcgggc attcctgaag ctgacagcat tcgggccgag		60	
	atgtctcgtc ccgtagcctt agctgtgctc gcgctactct ctctttctgg cctggaggct		120	
	atccagcgtc ctccaaagat tcaggtttac tcacgtcadc cagcagagaa tggaaagtca		180	
	aatttctga attgctatgt gtctgggttt catccatccg acattgaagt tgacttactg		240	
	aagaatggag agagaattga aaaagtggag cattcagact tgtctttcag caaggactgg		300	
	tctttctatc tcttgacta cactgaattc acccccactg aaaaagatga gtatgcctgc		360	
	cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta agtgggatcg agacatgtaa		420	
	gcagcatcat ggaggtttga agatgccca tttggattgg atgaattcca aattctgctt		480	
	gcttgctttt taatattgat atgcttatac acttacctt tatgcacaaa atgtagggtt		540	
	ataataatgt taacatggac atgatcttct ttataattct actttgagtg ctgtctccat		600	
	gtttgatgta tctgagcagg ttgctccaca ggtagctcta ggaggctgg caacttagag		660	
	gtggggagca gagaattctc ttatccaaca tcaacatctt ggtcagattt gaactcttca		720	
	atctcttgca ctcaaagctt gttaagatag ttaagcgtgc ataagttaac ttccaattta		780	
	catactctgc ttagaatttg ggggaaaatt tagaaatata attgacagga ttattggaaa		840	
	tttgttataa tgaatgaaac atttgtcat ataagattca tatttacttc ttatacattt		900	
	gataaagtaa ggcatggttg tggttaatct ggtttatfff tgttccacaa gttaaataaa		960	
	tcataaaaact tgatgtgtta tctctta		987	
<210>	53			
<211>	119			
<212>	PRT			
<213>	Homo sapiens			
<400>	53			

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

 Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
 100 105 110
 Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
 115