



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104419683 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 18

(21) 申请号 201310409527. 5

A61K 31/7034(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 09. 10

A61P 7/06(2006. 01)

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 刘光慧 曲静

胡安·卡洛斯·伊斯毕华·贝尔蒙特

李默 铃木敬一郎 徐秀玲

张维琦 任若通

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C12N 5/10(2006. 01)

C12N 5/0775(2010. 01)

C12N 5/0789(2010. 01)

C12N 5/0797(2010. 01)

A61K 31/5377(2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页

序列表8页 附图7页

(54) 发明名称

制备范可尼贫血症患者自体诱导多能干细胞的方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及制备范可尼贫血症患者自体诱导多能干细胞的方法,所述方法包括:利用附着载体将重编程因子 OCT4、SOX2、KLF4、cMYC 和 LIN28 的编码核酸以及针对人 p53 基因的 shRNA 转入具有突变的范可尼贫血症相关基因的范可尼贫血症患者体细胞中;之后,在丁酸钠 (NaBT) 的存在下培养所述体细胞。本发明还涉及制备用于移植治疗范可尼贫血症的造血干细胞、间充质干细胞或神经干细胞的方法。另外,本发明还提供用于治疗范可尼贫血症的小分子化合物。

1. 一种制备范可尼贫血症患者自体诱导多能干细胞的方法,所述方法包括:利用附着载体将重编程因子 OCT4、SOX2、KLF4、cMYC 和 LIN28 的编码核酸以及针对人 p53 基因的 shRNA 转入具有突变的范可尼贫血症相关基因的范可尼贫血症患者体细胞中;之后,在丁酸钠 (NaBT) 的存在下培养所述体细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述范可尼贫血症患者体细胞是范可尼贫血症患者成纤维细胞。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述重编程因子 OCT4、SOX2、KLF4、cMYC 和 LIN28 的编码核酸以及所述针对人 p53 基因的 shRNA 的核酸序列如 SEQ. ID. NO:1-6 所示。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中丁酸钠的工作浓度为 50-200 μ M。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述附着载体是 Episomal 质粒载体。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述突变的范可尼贫血症相关基因是 FANCA 基因。

7. 利用根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法制备的范可尼贫血症患者自体诱导多能干细胞。

8. 一种制备用于移植治疗范可尼贫血症的造血干细胞、间充质干细胞或神经干细胞的方法,所述方法包括:

对根据权利要求 7 所述的范可尼贫血症患者自体诱导多能干细胞中的突变的范可尼贫血症相关基因进行基因矫正,优选采用非整合型腺病毒载体作为基因打靶载体;

将所述经基因矫正的范可尼贫血症患者自体诱导多能干细胞定向诱导为造血干细胞、间充质干细胞或神经干细胞。

9. Doramapimod 在制备用于治疗范可尼贫血症的药物中的用途。

10. Tremulacin 在制备用于治疗范可尼贫血症的药物中的用途。

制备范可尼贫血症患者自体诱导多能干细胞的方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及制备范可尼贫血症患者自体诱导多能干细胞的方法,本发明还涉及制备用于移植治疗范可尼贫血症的造血干细胞、间充质干细胞或神经干细胞的方法,另外,本发明还提供用于治疗范可尼贫血症的小分子化合物。

背景技术

[0002] 范可尼贫血症 (Fanconi Anemia, FA) 属于先天再生障碍性贫血,是一种严重的常染色体隐性遗传疾病,其致病突变基因携带率约为 1/180 ~ 1/300,发病率约为 10 ~ 50/10 万,其临床特征性表现为进行性骨髓衰竭,多发性先天畸形以及恶性肿瘤易患性等重大致死性症状。FA 在世界各人群中均有发现,在某些种族人群中发病率异常增高,例如德系犹太人和荷裔南非人中的 FA 基因携带率为 1/90,而西班牙吉普赛人中的 FA 基因携带率高达 1/64 ~ 1/70。近年来随着对 FA 临床表现和发病机理的深入了解,我国 FA 患者的检出率逐年增高,尤其是 3-14 岁儿童病例屡见报道,由于 FA 致残致死率极高,同时尚无便捷有效的治疗手段,给患儿及其家庭带来巨大的痛苦和经济负担,因此急需针对 FA 建立有效的诊断和治疗技术,以及高效的药物筛选平台。

[0003] 目前已发现 15 个 FA 相关致病突变基因 (分别为 FANCA、B、C、D1、D2、E、F、G、I、J、L、M、N、O 和 P),并且所有 FA 相关基因都参与一个重要的 DNA 修复途径 (FA/BRCA 途径)。已有研究表明,通过在 FA/BRCA 通路缺陷的细胞内过表达相应的正常 FA 基因,可以纠正基因缺陷,恢复细胞正常的生理功能,提示了未来可以通过基因治疗来治愈 FA。然而,目前造血干细胞移植是临床治疗 FA 的唯一手段,但同时造血干细胞的来源以及免疫排斥反应限制了该治疗手段的临床应用。近年来,诱导多能干细胞 (Induced Pluripotent Stem Cell, iPSC) 技术的出现和发展为疾病的药物筛选、基因治疗和细胞治疗提供了广阔前景。iPSC 是通过将特定转录因子 (如 OCT4, SOX2, KLF4, cMYC 等) 导入体细胞,使其转变成为的具备胚胎干细胞特性的细胞,进一步定向分化为疾病累及细胞类型,为该类疾病药物筛选提供具有显著优势的基于人类细胞的药物筛选平台。事实上,许多公司已经开始致力于建立 iPSC 疾病模型用于药物发现研究。罗氏 (Roche) 与欧洲创新药物计划 (IMI) 2012 年联合宣布推出 StemBANCC,旨在以人诱导多能干细胞为研究工具,开发人类疾病模型,促进药物开发,该计划研究包括糖尿病和老年痴呆症在内的一系列疾病。此外,Cellular Dynamics 和 AstraZeneca 公司也宣布将合作开发人类 iPSC 体外疾病模型,特别的是利用 MyCell 技术将特定病人的细胞转化为体外疾病模型进行药物筛选。这种突破性的新技术将为人类疾病机理研究和药物筛选实现新的跨越。另外, iPSC 并非源于胚胎组织,不会受到伦理问题的限制,结合现有的基因打靶技术对患者自体来源的 iPSC 进行基因突变的基因组原位矫正,在基因水平清除内源性致病因素,为血液病的移植细胞治疗提供良好的移植材料,在个性化治疗和转化医学中巨大的应用前景。

[0004] 针对 FA,目前可用雄激素,糖皮质激素和造血生长因子进行治疗,但是只能改善症

状,疗效难以持续,更无法根除。其原因在于目前范可尼病的疾病模型和药物筛选平台不能满足进行药物筛选的需求。利用 iPSC 这一前沿技术,对范可尼病人体细胞进行重编程,并定向分化为范可尼疾病累积的细胞类型,可建立新型范可尼药物筛选平台。另外,通过 iPSC 技术平台,利用基因打靶技术对患者自体 iPSC 中的致病基因突变进行基因矫正,再将其定向分化为无致病突变的正常造血干细胞,继而用于治疗血液系统疾病。因此,建立高效的范可尼患者体细胞重编程体系至关重要。然而与其他遗传性贫血症相比,范可尼贫血症患者的体细胞重编程研究具有更大的困难和挑战性。已有研究表明,FA 涉及的 FANCA/BRCA 信号通路在发育和 DNA 损伤修复中发挥至关重要的作用,患者体细胞本身存在 DNA 损伤和不稳定性,而重编程过程中又会进一步引发活性氧 (ROS) 增加、DNA 断裂和细胞死亡 (Senescence) 等细胞事件严重阻碍体细胞重编程的过程,因此针对 FA 患者携带致病突变细胞的体细胞重编程研究困难重重,国内外鲜见成功实施的案例。

[0005] 尽管近年来已有若干研究组利用不同策略获得 FA 患者来源的 iPSC,但是仍然存在各种问题和不足。例如 2009 年本专利发明人在首先过表达野生型 FANCA 基因对患者体细胞系进行基因补偿之后,才利用慢病毒介导的体细胞重编程方法顺利对 4 例 FANCA 患者体细胞(上皮细胞和角质细胞)完成重编程过程并获得患者自体 iPSC。然而慢病毒载体介导的重编程方法会导致外源基因发生不可控的基因组整合,不但会进一步加剧携带 FA 致病基因突变细胞的 DNA 不稳定性,而且也无法实现安全的临床应用。此外,经过基因补偿的细胞也无法作为疾病模型用于药物筛选。(A. Raya, I. Rodriguez-Piza, G. Guenechea, R. Vassena, S. Navarro, M. J. Barrero, A. Consiglio, M. Castella, P. Rio, E. Sleep, F. Gonzalez, G. Tiscornia, E. Garreta, T. Aasen, A. Veiga, I. M. Verma, J. Surralles, J. Bueren, J. C. Izpisua Belmonte, Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells, *Nature*. 2009, 460:53-59)。2012 年美国哈佛医学院的 Daley 研究组改进了体细胞重编程技术,利用低氧条件 (Hypoxia) 诱导,同时结合慢病毒介导重编程因子表达,产生了 FA-A 和 FA-C 患者自体 iPSC。然而,该研究同样利用慢病毒载体产生外源基因整合型 iPSC,因而无法实现安全的临床应用。同时尽管获得了携带 FA 致病突变的 iPSC,但是该研究并未利用其开展可能的 FA 药物筛选工作。(L. U. Muller, M. D. Milson, C. E. Harris, R. Vyas, K. M. Brumme, K. Parmar, L. A. Moreau, A. Schambach, I. H. Park, W. B. London, K. Strait, T. Schlaeger, A. L. Devine, E. Grassman, A. D'Andrea, G. Q. Daley, D. A. Williams, Overcoming Reprogramming Resistance of Fanconi Anemia Cells. *Blood*. 2012, 119:5449-5457。)由此可见,现有报道产生的 FA 患者来源的 iPSC 存在重编程效率低下和宿主基因组随机整合等严重不足,无法满足临床应用的要求。同时,现有报道均未利用产生的 FA-iPSC 有效模拟疾病表型,建立药物筛选平台,因而未能开展高效的药物筛选工作。此外目前各研究机构和制药公司主要利用疾病的动物模型进行针对 FA 等重大疾病的药物筛选,但是动物模型存在与人的种属差异、无法完全重现疾病表现以及无法进行高通量药物筛选等无法克服的缺陷,因而无法实现真正意义的高效高通量药物筛选。综上所述,目前急需一种体外产生 FA 患者自体来源的 iPSC 的安全高效技术,以及利用该 FA-iPSC 及其衍生细胞产生安全的可移植材料和高效高通量的药物筛选平台。

发明内容

[0006] 本发明涉及一种体外产生范可尼贫血症患者诱导多能干细胞 (FA-iPSC) 以及造血干细胞等衍生细胞的方法,并且在此基础上建立的高效高通量药物筛选平台以及利用该平台筛选出的一种针对 FA 疾病表型具有治疗效果的天然化合物。所述方法包括在化学小分子丁酸钠 (NaBT) 诱导下,利用非基因组整合的附着体载体 (Episomal vector) 将 OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, LIN28 等因子以及 shRNA-p53 导入 FA 患者体细胞,将其重编程为无外源基因整合的诱导多能干细胞,再通过定向分化获得多种患者自体来源的细胞系来模拟 FA 疾病表型,继而建立针对 FA 的高通量药物筛选平台,以及利用其进行筛选出的具有治疗效果的天然小分子备选药物。

[0007] 首先,本发明提出结合非基因组整合型附着体载体 (Episomal vector) 介导的体细胞重编程技术和非整合型腺病毒载体介导的基因矫正技术,产生 FA 患者自体来源的无致病基因突变的非基因组整合型 iPSC,并进一步将其定向分化为造血干细胞。在重编程过程中,本发明在化学小分子 NaBT 诱导下,采用一种新型的非基因组整合附着体载体 (Episomal vector) 技术 (附着体载体可以在细胞内长时间复制,但是并不整合到基因组中,在重编程过程中,随着细胞分裂,附着体逐渐被稀释掉,因此该方法避免了由于病毒载体整合入宿主细胞基因组而引起的潜在致癌性等应用风险),将 p53 shRNA 和经典的四种重编程因子共同导入体细胞,同时给予 NaBT 处理,使在正常氧压条件下获得 FA-iPSC 成为可能。由于附着体载体可以在宿主细胞内长期复制,但并不整合到宿主基因组中,并且随着宿主细胞分裂,附着体会被逐步稀释,因此该方法避免了由于病毒载体产生的外源基因整合所引起的潜在致癌性。此后,本发明采用新型第三代非整合型腺病毒载体 (Helper-dependent Adenovirus, HDAdV) 作为基因打靶工具对 FA-iPSC 进行基因矫正。该载体携带正常功能的野生型 FANCA 基因 (Genbank 登录号:NM_000135) 组片段,通过与患者基因组进行同源重组,实现针对突变位点的原位基因矫正。HDAdV 载体不具有病毒复制和基因组整合元件,无法整合到宿主基因组中,从而提高基因矫正的安全性,是目前最安全有效的基因矫正技术,同时超大片段同源重组方法保证了基因矫正的精确性,与其他基因打靶技术 (如锌指核酶等) 相比,无脱靶 (Off-Target) 和诱变效应。结合上述两种技术,本发明对 FA-A 患者成纤维细胞依次进行重编程和基因矫正,继而再定向分化为造血干细胞,从而为临床 FA 患者移植治疗提供了患者自体来源的、比现有方法更安全的造血干细胞。

[0008] 其次,本发明产生的范可尼贫血症患者自体来源的非整合型 iPSC,可以体外定向分化为携带致病基因突变的血液细胞,神经细胞以及间充质细胞等衍生细胞,能够有效模拟各种疾病相关表型,因此本发明利用上述 FA 相关 iPSC 及其衍生细胞建立高效高通量的个性化药物筛选平台,并在此基础上已筛选出一种天然化合物,可有效改善 FA 疾病表型。

[0009] 综上所述,本发明所含技术既能够为临床治疗 FA 提供大量安全的移植材料,还能够用于建立筛选 FA 治疗药物的个性化药物筛选平台,同时也为其他人类重大疾病和罕见病的治疗、诊断和药物筛选等提供了参考模式。

[0010] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0011] 1. 一种制备范可尼贫血症患者自体诱导多能干细胞的方法,所述方法包括:利用附着体载体将重编程因子 OCT4、SOX2、KLF4、cMYC 和 LIN28 的编码核酸以及针对人 p53 基因的 shRNA 转入具有突变的范可尼贫血症相关基因的范可尼贫血症患者体细胞中;之后,

在丁酸钠 (NaBT) 的存在下培养所述体细胞。

[0012] 2. 根据 1 所述的方法,其中所述范可尼贫血症患者体细胞是范可尼贫血症患者成纤维细胞。

[0013] 3. 根据 1 所述的方法,其中所述重编程因子 OCT4、SOX2、KLF4、cMYC 和 LIN28 的编码核酸以及所述针对人 p53 基因的 shRNA 的核酸序列如 SEQ. ID. NO:1-6 所示。

[0014] 4. 根据 1 所述的方法,其中丁酸钠的工作浓度为 50-200 μ M。

[0015] 5. 根据 1 所述的方法,其中所述附着体载体是 Episomal 质粒载体。

[0016] 6. 根据 1 所述的方法,其中所述突变的范可尼贫血症相关基因是 FANCA 基因。

[0017] 7. 利用根据 1-6 中任一项所述的方法制备的范可尼贫血症患者自体诱导多能干细胞。

[0018] 8. 一种制备用于药物筛选或移植治疗范可尼贫血症的造血干细胞、间充质干细胞或神经干细胞的方法,所述方法包括:

[0019] 对根据 7 所述的范可尼贫血症患者自体诱导多能干细胞中的突变的范可尼贫血症相关基因进行基因矫正,优选采用非整合型腺病毒载体作为基因打靶载体;

[0020] 将所述经基因矫正的范可尼贫血症患者自体诱导多能干细胞定向诱导为造血干细胞、间充质干细胞或神经干细胞。

[0021] 9. Doramapimod 在制备用于治疗范可尼贫血症的药物中的用途。

[0022] 10. 根据权利要求 9 所述的用途,其中所述范可尼贫血症是由范可尼贫血症相关基因 FANCA 基因的突变引起的。

[0023] 11. 一种用于治疗范可尼贫血症的组合物,所述组合物包含 Doramapimod 作为活性成分。

[0024] 12. Doramapimod 用于治疗范可尼贫血症的用途。

[0025] 13. Tremulacin 在制备用于治疗范可尼贫血症的药物中的用途。

[0026] 14. 根据权利要求 13 所述的用途,其中所述范可尼贫血症是由范可尼贫血症相关基因 FANCA 基因的突变引起的。

[0027] 15. 一种用于治疗范可尼贫血症的组合物,所述组合物包含 Tremulacin 作为活性成分。

[0028] 16. Tremulacin 用于治疗范可尼贫血症的用途。

附图说明

[0029] 图 1 显示本发明的总体技术方案。

[0030] 图 2 显示非基因组整合的 FA-iPSC 的产生。

[0031] 图 3 显示针对 FA-iPSC 的原位靶向基因矫正。

[0032] 图 4 显示 FA-iPSC 造血前体细胞的定向分化以及疾病表型模拟。

[0033] 图 5 显示 FA-iPSC 间充质干细胞细胞的定向分化以及疾病表型模拟。

[0034] 图 6 显示 FA-iPSC 神经干细胞的定向分化以及疾病表型模拟。

[0035] 图 7 显示利用针对 FA 的个性化药物筛选平台进行高效高通量药物筛选。

具体实施方式

- [0036] 材料：
- [0037] 1) 用于流式细胞术的荧光标记抗体：
- [0038] 荧光素 APC 标记抗人细胞表面识别分子 CD45 抗体 (555485), BD Biosciences
- [0039] 荧光素 APC 标记抗人细胞表面识别分子 CD43 抗体 (560198), BD Biosciences
- [0040] 荧光素 FITC 标记抗人细胞表面识别分子 CD43 抗体 (555475), BD Biosciences
- [0041] 荧光素 PE 标记抗人细胞表面识别分子 CD34 抗体 (555822), BD Biosciences
- [0042] 荧光素 FITC 标记抗人细胞表面识别分子 CD31 抗体 (555445), BD Biosciences
- [0043] 荧光素 FITC 标记抗人细胞表面识别分子 CD90 抗体 (555595), BD Biosciences
- [0044] 荧光素 PE 标记抗人细胞表面识别分子 CD73 抗体 (550257), BD Biosciences
- [0045] 荧光素 APC 标记同型对照抗体 (555751), BD Biosciences
- [0046] 荧光素 PE 标记同型对照抗体 (555749), BD Biosciences
- [0047] 荧光素 FITC 同型对照抗体 (555742), BD Biosciences
- [0048] 荧光素 APC 标记抗人细胞表面识别分子 CD34 抗体 (130-090-954), Miltenyi Biotec
- [0049] 荧光素 APC 标记抗人细胞表面识别分子 CD105 抗体 (17-1057-42), eBioscience
- [0050] 荧光素 APC 标记抗人 Tra-1-85 抗体 (FAB3195A), R&D Systems
- [0051] 2) 用于免疫荧光的抗体：
- [0052] 抗人 OCT-3/4 抗体 (sc-5279), Santa Cruz Biotechnology
- [0053] 抗人 SOX2 抗体 (sc-17320), Santa Cruz Biotechnology
- [0054] 抗人 Lamin B1 抗体 (sc-6217), Santa Cruz Biotechnology
- [0055] 抗人 FANCD2 抗体 (sc-20022), Santa Cruz Biotechnology
- [0056] 抗人 WRN 抗体 (sc-5629), Santa Cruz Biotechnology
- [0057] 抗人 GAPDH 抗体 (sc-25778), Santa Cruz Biotechnology
- [0058] 抗人 NANOG 抗体 (ab21624), Abcam
- [0059] 抗人 Emerin 抗体 (ab14208), Abcam
- [0060] 抗人 Ki67 抗体 (ab16667), Abcam
- [0061] 抗人 FANCD2 抗体 (ab2187), Abcam
- [0062] 抗人 NESTIN 抗体 (MAB5326), Millipore
- [0063] 抗人 Tra-1-60 抗体 (MAB4360), Millipore
- [0064] 抗人 β -Tubulin III/Tuj1 抗体 (T2200), Sigma
- [0065] 抗人 PAX6 抗体 (PRB-278P), Covance
- [0066] 抗人 Ku80 抗体 (2753), Cell Signaling Technology
- [0067] 抗人 FANCA 抗体 (A301-980A), Bethyl Laboratories
- [0068] 本发明涉及的质粒：
- [0069] pCXLE-hOCT3/4、pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL 和 pCXLE-EGFP 均购自 Addgene (货号分别为：27076、27077、27078、27080 和 27082)。
- [0070] 本发明涉及培养基配方：
- [0071] CDF12 培养基：
- [0072] DMEM/F12 培养基 (Invitrogen, 11320-033)

- [0073] 0.1mM 非必需氨基酸 (Invitrogen, 11140-050)
- [0074] 1mM GlutaMAX™ 二肽 (Invitrogen, 35050-061)
- [0075] 20% Knockout 血清替代物 (Invitrogen, N10828-028)
- [0076] 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen, 15070-063)
- [0077] 55 μM β-巯基乙醇 (Invitrogen, 21985-023)
- [0078] 10ng/ml Human FGF2 (Joint Protein Central)
- [0079] 成纤维细胞培养基配方如下：
- [0080] DMEM 培养基 (Invitrogen, 11965118)，
- [0081] 15% 胎牛血清 (Invitrogen, 10091148)，
- [0082] 0.1mM 非必需氨基酸 (Invitrogen, 11140-050)，
- [0083] 1mM GlutaMAX™ 二肽 (Invitrogen, 35050-061)
- [0084] 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen, 15070-063)。
- [0085] 间充质干细胞培养基成分：
- [0086] α MEM 培养基 (Invitrogen, 12571071)，
- [0087] 10% 胎牛血清 (Invitrogen, 10091148)，
- [0088] 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen, 15070-063)，
- [0089] 10ng/ml 重组人成纤维细胞生长因子 (JPC, bFGF)，
- [0090] 5ng/ml TGF β (Humanzyme, HZ1131)。
- [0091] MSC 细胞成骨分化培养基：
- [0092] α MEM 培养基 (Invitrogen, 12571071)，
- [0093] 10% 胎牛血清 (Invitrogen, 10091148)，
- [0094] 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen, 15070-063)，
- [0095] 10M β-glycerolphosphate (Santa Cruz Biotech., CAS 13408-09-8), 0.2mM ascorbate-2-phosphate (Sigma, A4034)，
- [0096] 0.01mM dexamethasone (Sigma, D4902)。
- [0097] MSC 细胞软骨分化培养基：
- [0098] DMEM 培养基 (Invitrogen, 11965118)，
- [0099] 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen, 15070-063)，
- [0100] 10ng/ml TGF-β 3 (R&D Systems, AB-100-NA)
- [0101] 50mg/ml ITS+Premix (BD, 354351)
- [0102] 50g/ml proline (Sigma, P5607)
- [0103] 50g/ml ascorbate-2-phosphate (Sigma, A4034)
- [0104] 0.1M dexamethasone (Sigma, D4902)。
- [0105] MSC 脂肪分化培养基：
- [0106] α-MEM 培养基 (Invitrogen, 12571071)，
- [0107] 10% 胎牛血清 (Invitrogen, 10091148)，
- [0108] 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen, 15070-063)，
- [0109] 50 μM indomethacin (Sigma, I7378)
- [0110] 0.5mM IBMX (Sigma, I7018)

- [0111] 1 μ M dexamethasone (Sigma, D4902)
- [0112] 造血分化培养基 :
- [0113] 90% α -MEM 培养基 (Invitrogen, 12571071)
- [0114] 10% 胎牛血清 (Invitrogen, 10091148)
- [0115] 神经诱导分化培养基 -1 :
- [0116] 50%Advanced DMEM/F12 培养基 (Invitrogen, 12634)
- [0117] 50%Neurobasal 培养基添加剂 (Invitrogen, 21103049)
- [0118] 1%N-2 添加剂 (Invitrogen, 17502-048)
- [0119] 2%B-27 添加剂 (Invitrogen, 0080085-SA)
- [0120] 2mM GlutaMAX™ 二肽 (Invitrogen, 35050-061)
- [0121] 10ng/mL 重组人白血病抑制因子 (hLIF, Millipore, LIF1050)
- [0122] 4 μ M CHIR99021 (Cellagen tech, C2447)
- [0123] 3 μ M SB431542 (Cellagentech, C7243)
- [0124] 2 μ M Dorsomorphin (Sigma, P5499)
- [0125] 0.1 μ M Compound E (EMD Chemicals Inc., 565790)
- [0126] 神经诱导分化培养基 -2 :
- [0127] 50%Advanced DMEM/F12 培养基 (Invitrogen, 12634)
- [0128] 50%Neurobasal 培养基添加剂 (Invitrogen, 21103049)
- [0129] 1%N-2 添加剂 (Invitrogen, 17502-048)
- [0130] 2%B-27 添加剂 (Invitrogen, 0080085-SA)
- [0131] 2mM GlutaMAX™ 二肽 (Invitrogen, 35050-061)
- [0132] 10ng/mL 重组人白血病抑制因子 (hLIF, Millipore, LIF1050)
- [0133] 4 μ M CHIR99021 (Cellagen tech, C2447)
- [0134] 3 μ M SB431542 (Cellagentech, C7243)
- [0135] 0.1 μ M Compound E (EMD Chemicals Inc., 565790)
- [0136] NSMM 培养基 :
- [0137] 50%Advanced DMEM/F12 培养基 (Invitrogen, 12634)
- [0138] 50%Neurobasal 培养基添加剂 (Invitrogen, 21103049)
- [0139] 1%N-2 添加剂 (Invitrogen, 17502-048)
- [0140] 2%B-27 添加剂 (Invitrogen, 0080085-SA)
- [0141] 2mM GlutaMAX™ 二肽 (Invitrogen, 35050-061)
- [0142] 10ng/mL 重组人白血病抑制因子 (hLIF, Millipore, LIF1050)
- [0143] 4 μ M CHIR99021 (Cellagen tech, C2447)
- [0144] 3 μ M SB431542 (Cellagentech, C7243)
- [0145] 2 μ M Dorsomorphin (Sigma, P5499)
- [0146] 神经元自发分化培养基 SDNM :
- [0147] DMEM/F12 (Invitrogen, 11320-033)
- [0148] 1%N-2 添加剂 (Invitrogen, 17502-048)
- [0149] 2%B-27 添加剂 (Invitrogen, 0080085-SA)

[0150] 400 μ M N6, 2'-O-二丁酰基腺苷 3', 5'-环磷酸钠盐(dbcAMP, Sigma, D0260)

[0151] 200 μ M L-抗坏血酸(Ascorbic acid, Sigma, A5960)

[0152] 10ng/ml 重组人神经生长因子 BDNF (Peprotech, 450-20)

[0153] 10ng/ml 重组人神经生长因子 GDNF (Peprotech, 450-10)

[0154] 本发明涉及的细胞系：

[0155] 人范可尼成纤维细胞 (FA123) (来自携带 FANCA C295T 纯合子突变的 19 岁男性患者, 具体见 Callén E, et al., A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. Blood. 2005. 105 (5):1946-1949, 并由第一发明人所在实验室妥善保藏。

[0156] 人胚胎干细胞 H9 细胞系, 购自 WiCell 公司。

[0157] 实施例 1: FA 患者自体诱导多能干细胞系的建立及鉴定

[0158] 本发明涉及的 FA 患者成纤维细胞 FA123 可利用人类成纤维细胞培养基在 37 摄氏度和 5% 二氧化碳条件下进行培养。

[0159] 本发明针对基因组不稳定的 FA 患者体细胞优化了实现重编程条件。通过哺乳动物细胞电转仪将表达重编程因子的 Episomal 质粒载体 pCXLE-hOCT3/4-shp53-F (含重编程因子 OCT3/4 (其也被称为 OCT4), shp53 (针对人 p53 基因的 shRNA) 可以消除重编程过程中细胞死亡的障碍), pCXLE-hSK (含重编程因子 SOX2, KLF4), pCXLE-hUL (含重编程因子 cMyc 和 Lin28) 和 pCXLE-EGFP (含报告基因 EGFP) 各 1.5 μ g 共同电转导入 FA 患者体细胞。电转后将细胞在成纤维细胞培养基中培养 4 天。将细胞用胰蛋白酶 (美国 Invitrogen 公司, 货号: 25200056) 消化, 随后接种至预先培养了经过丝裂霉素 (购自美国 Sigma 公司, 货号: M0503) 灭活的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs, 购自美国 Invitrogen 公司, 货号: S1520-100) 的培养板中, 次日换用添加了丁酸钠 (NaBT, 为组蛋白去乙酰化抑制剂, 工作浓度为 50-200 μ M) 的 CDF12 培养基继续培养 4 天后, 将培养基更换为无 NaBT 的 CDF12 培养基继续培养至克隆样细胞出现。40 天后成功实现范可尼贫血症患者成纤维细胞 FA123 细胞的重编程, 获得 FA 患者自体来源的诱导多能干细胞系 (FA-iPSC) (图 2A-C)。如图 2 所示, 本发明对产生的克隆样细胞进行干细胞标志物 Nanog 染色鉴定, 证明 FA 成纤维细胞可以有效地被重编程成为表达干细胞标志物 Nanog 阳性的细胞, 即诱导多能干细胞。将范可尼诱导多能干细胞 FA-iPSC 进行连续传代后, 仍可保持良好的克隆样形态 (图 2A)。本发明确定只有通过导入 p53 基因的 shRNA 使 p53 基因沉默后, FA 体细胞才可实现高效重编程, 产生 FA-iPSC (图 2B), 同时重编程生成的 FA-iPSC 仍然携带体细胞突变 C253T (图 2C)。

[0160] 利用免疫荧光技术可以确认 FA-iPSC 能够表达干细胞特异性分子标记物 OCT4 和 NANOG (图 2D), 同时 FA-iPSC 已能够表现出 FA 信号通路缺陷的疾病特征, 例如 G2/M 周期停滞 (图 3C) 以及对 DNA 交联剂敏感和染色体的不稳定性等 (图 3D)。

[0161] 实施例 2: FA-iPSC 的基因矫正

[0162] 产生非基因组整合型 FA-iPSC 后, 本发明继续利用非整合型腺病毒载体介导的基因矫正技术, 原位修复了 FA-iPSC 基因组中的致病基因突变位点。本发明涉及的 FA 患者, 其致病基因突变为位于 FANCA4 号外显子的点突变 (图 2C)。本发明首先设计并通过分子克隆方法获得跨 FANCA 基因 1-8 号外显子的正常野生型基因片段, 然后将其构建成为非整合型腺病毒载体并感染 FA-iPSC, 利用同源重组原理将正常 FANCA 基因导入 FA-iPSC 中并替换

突变基因,从而完成原位修复。后续经过抗性筛选,最终获得经过基因矫正的 FA-iPSC,即 cFA-iPSC。具体方法如下:

[0163] 1、基因矫正辅助腺病毒载体构建:

[0164] 将 BAC 文库中的人 FANCA locus 克隆 (CTD-2327D14, Invitrogen) 通过同源重组构建入辅助腺病毒载体 pCIHDAgt8-4(关于该腺病毒载体,详见 An HSV amplicon-based helper system for helper-dependent adenoviral vectors. Shuji Kubo, et al. BBRC. 2003. 307(4):826-830),产生的 FANCA-c-HDAV 质粒用 PI-SceI (NEB) 酶切并纯化后,转染 116 细胞(人胚胎肾细胞(293 细胞)的衍生细胞系,既能贴壁生长也能悬浮生长,详见 Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. Palmer D. and Ng P. Molecular Therapy. 2003. 8(5):846-52.),同时用辅助病毒 AdHPBGF35(详见 Genome Size and Structure Determine Efficiency of Postinternalization Steps and Gene Transfer of Capsid-Modified Adenovirus Vectors in a Cell-Type-Specific Manner. Dmitry M. Shayakhmetov, et al., Journal of Virology. 2004. 78(18):10009-10022.) 感染细胞以便包装非基因组整合的辅助腺病毒载体 FANCA-c-HDAV。收集培养上清,并通过超高速离心纯化病毒颗粒。

[0165] 2、FA-iPSC 的原位基因矫正:

[0166] 利用 FANCA-c-HDAV 病毒载体感染 FA-iPSC(1×10^7 个细胞)。感染后第 2-4 天,加入 G418(25-450 μ g/ml, Invitrogen) 进行阳性筛选。感染后第 10-13 天,加入 4 μ M Ganciclovir (GANC, Invitrogen) 进行阴性筛选。将所得细胞克隆挑入 96 孔板备用,并进行基因组鉴定。

[0167] 基因组鉴定所需引物序列为:

[0168] P1, 5' -GGAACCCACTGGTCATGTTTCTTTGCCCCAT-3' ;

[0169] P2, 5' -CCCCAAAGGCCTACCCGCTTCCATTGCTCA-3' ;

[0170] P3, 5' -CTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATC-3' ;

[0171] P4, 5' -TACCAGTTATAGTAGCTCAGGAATGCTAAGTCGCTCA-3' ;

[0172] 构建成功克隆的测序引物为:

[0173] 5' -TTGCCCACCGTTTCTCACTTTATTGAATGCAGACC-3'

[0174] 5' -AGGCAACCATCCCGGCTGAGAGAATACCCA-3'

[0175] 3、移除基因组中用于筛选的 Neo 抗性基因表达盒:

[0176] 将 pCAG-Flpo-2A-puro 质粒(购自美国 Addgene 公司,货号:20733)用 FuGENE HD(美国 Promega 公司,货号:E2311)转染至 cFA-iPSC。因为该质粒携带表达 Flpo 重组酶,所以可将基因组中整合的外源片段携带的 Neo 基因切除。转染 2 天后,加入 Puromycin(1 μ g/ml; Invitrogen, 货号:1113803)进行筛选以富集阳性细胞。Puromycin 筛选两天后,加入未添加 Puromycin 的 CDF12 培养基继续培养 10 天。将细胞消化成单细胞后,接种至预先培养了经过丝裂霉素(购自美国 Sigma 公司,货号:M0503)灭活的小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs,购自美国 Invitrogen 公司,货号:S1520-100)的培养板中。继续培养 14 天后挑取单克隆并扩增培养,同时用 PCR 方法鉴定是否成功移除 Neo 抗性基因。

[0177] DNA 测序引物为:

[0178] 5' -GCCCACCGTTTCTCACTTTATTGAATGCAGACCA-3'

[0179] 5' -TGCCTCCATCCAGATCAACAGAACATTGCC-3' .

[0180] 经鉴定后发现,基因矫正不影响干细胞干性基因的表达和细胞的核型,同时并且基因矫正能够有效改善细胞在细胞周期、染色体 DNA 断裂和 DNA 损伤修复功能等方面的缺陷(图 3C-E)。

[0181] 实施例 3 :FA-iPSC 定向分化以及疾病表型模拟

[0182] 人类诱导多能干细胞已被证实可在体外定向分化为造血干细胞及前体细胞。本发明利用实施例 2 中获得的 FA-iPSC,进行了造血干细胞和前体细胞的体外定向分化,我们发现 FA-iPSC 定向分化形成的造血干细胞、神经干细胞以及间充质干细胞等都能够表现出典型的 FA 症状。

[0183] 1. FA-iPSC 的造血细胞定向分化及疾病模拟

[0184] 挑取 FA-iPSC 单克隆至 OP9 滋养层细胞(购自美国 ATCC 公司,货号 :CRL-2749)上,利用造血分化培养基诱导共培养 12-14 天。分化的细胞用 Accutase(购自美国 Innovative Cell Technologies 公司,货号 :01-0006)消化后经流式细胞术分选获得造血前体细胞,用于下一步实验分析。

[0185] 定向分化效率检测 :

[0186] 利用流式细胞术,我们发现 FA-iPSC 分化为造血前体细胞的效率大大低于野生型,尤其是可以产生粒细胞,B 细胞,NK 细胞以及 T 细胞等重要血液细胞的 CD34^{hi}/CD43^{low} 的细胞类群。而经过基因矫正的 cFA-iPSC 则有明显改善(图 4A-C)。

[0187] 克隆集落形成实验模拟 FA 血液疾病表型 :

[0188] 将分选的 CD34⁺ 细胞接种于半固体培养基 MethoCult GF+H4435(Stem Cell Technologies)。培养 15 天后即可见集落出现,并进行计数。选取相应集落,用 Wright stain(Millipore)染色鉴定细胞类型。

[0189] FA-iPSC 分化的造血干细胞只能产生 CFU-GM(粒细胞,巨噬细胞的前体细胞),却不能产生红系细胞和巨核细胞。而经过基因矫正的 cFA-iPSC 分化的造血干细胞则能产生全部类型的细胞(图 4D, E)。

[0190] 体内移植实验检验基因矫正 FA 细胞用于移植治疗 :

[0191] 将 5×10^5 个造血前体细胞注射入半致死剂量(325cGy)照射的 NSG 小鼠(NOD scid gamma(NSG)小鼠,购自美国 Jackson Lab 公司,货号 :005557)股骨,分别在注射 4 周和 7 周后通过眼眶采血检测干细胞的体内分化情况,并于 7 周后处死小鼠,收集其骨髓样品用于移植效率的杂合性分析。

[0192] 移植效率杂合性分析 :

[0193] 分离小鼠的骨髓细胞,用 Qiagen DNeasy blood and tissue kit 提取 DNA 样品。利用 qPCR 鉴定其中的人基因组比例。

[0194] 经过基因矫正的 cFA-iPSC 分化的造血干细胞可以用于移植治疗,将细胞移植进入辐射照射过的免疫缺陷鼠,细胞可以成功定植,并开始发挥正常的造血分化功能,提示以此细胞类群进行对 FA 进行造血干细胞治疗的可能性(图 4F)。

[0195] 2. 利用间充质干细胞模拟范可尼病中胚层缺陷

[0196] 研究表明 FA 患者中普遍存在中胚层细胞缺陷,本发明可以利用 FA-iPSC 定向分化模拟中胚层的病理损伤 :

[0197] 1) 间充质干细胞的产生和鉴定。

[0198] 首先将 FA-iPSC 进行拟胚体 (EB) 分化, 分化 14 天, 将 EB 接种于 matrigel 包被的 6 孔板中进行培养, 继续培养 2 周至纤维状细胞出现。再经过一次传代后, 利用流式细胞术分选其中的 CD73, CD90, CD105 阳性细胞类群, 即为间充质干细胞 (图 5A), 继续传代培养。FA-iPSC 可定向分化为间充质干细胞, 并发现其在分化效率上与野生型 iPSC 存在明显的差异。

[0199] 2) FA 间充质干细胞表现提前衰老症状。

[0200] FA-iPSC 衍生的间充质干细胞提前出现了衰老症状。利用细胞计数发现 FA-iPSC 衍生的间充质细胞只能在体外扩增 3 代 (图 5B); 利用 Beta-gal 染色显示 FA-iPSC 衍生的间充质细胞严重衰老 (图 5C); 利用 qPCR 检测到细胞提前表达衰老基因 p16 和 p21 (图 5D)。

[0201] 3) FA-iPSC 衍生的间充质干细胞模拟 FA 患者的间充质干细胞分化能力的缺陷

[0202] FA-iPSC 衍生的间充质干细胞丧失了分化的能力, 无法进一步分化为脂肪、成骨、和软骨细胞。

[0203] 成骨分化: MSC 细胞培养于成骨分化培养基中, von Kossa (IHC world) 染色鉴定

[0204] 软骨分化: MSC 细胞培养与软骨分化培养基中, Alcian blue (IHC world) 染色鉴定。

[0205] 脂肪分化: MSC 加入脂肪分化培养基, Oil red O (IHC world) 染色鉴定。

[0206] 4) 经过基因矫正的 cFA-iPSC 细胞可消除上述由于 FA 通路缺陷带来的间充质干细胞损伤 (图 5B-E)。提示基因矫正的 FA 间充质干细胞可用于移植间充质细胞治疗。

[0207] 3. 定向分化模拟 FA 患者神经系统疾病症状

[0208] 研究表明 FA 患者会并发神经系统异常, 例如脑围过小和智力障碍等。然而由于神经组织取材技术的限制, 针对 FA 对于神经系统的影响机制无法开展。本发明创造的 FA-iPSC 体外定向分化技术, 首次建立了范可尼神经系统疾病模拟体系:

[0209] 1) FA-iPSC 衍生神经干细胞的产生和鉴定:

[0210] 将 FA-iPSC 接种于 MEF 滋养层细胞, 加入“神经诱导分化培养基 -1”培养 2 天, 再换用“神经诱导分化培养基 -2”继续培养 5 天。将细胞消化为单细胞后接种于 Matrigel 包被的平板上, 培养于 NSMM 培养基中。经过鉴定发现: FA-iPSC 可成功定向分化为神经干细胞, 并且与基因矫正的 cFA-iPSC 细胞相比, 其神经干细胞标志物表达无明显差异。然而 FA-iPSC 衍生神经干细胞能够明显表现出 FA 信号通路的缺陷, 如招募 FANCD 因子能力 (图 6C) 以及对 MMC 敏感性 (图 6D, E) 等疾病相关表型。

[0211] 2) FA-iPSC 衍生神经干细胞的定向分化:

[0212] 将 FA-iPSC 衍生神经干细胞接种于 Matrigel 包被的 6 孔板中, 用神经干细胞培养基 NSMM 维持培养 3-5 天。换为自发分化培养基 SDNM 继续培养 14 天后, 进行神经元特异标记物 Tu j1 的染色鉴定, 发现 FA-iPSC 衍生神经干细胞分化为神经元的能力大幅降低 (图 6F)。

[0213] 3) FA-iPSC 衍生神经干细胞显示明显的肿瘤发生倾向, 通过 microarray 和 qPCR 检测发现 FA-iPSC 衍生神经干细胞中的抑癌基因和神经分化基因大幅下调, 而原癌基因的表达则大幅上调 (图 6G, I)。

[0214] 4) cFA-iPSC 衍生神经干细胞的基因表达和细胞表型均得到一定程度的纠正 (图

6)。

[0215] 实施例 4 :针对 FA 的个性化药物筛选平台的建立以及备选药物的筛选

[0216] 目前市场上还没有针对 FA 的特效药物。本发明首创的高效 FA-iPSC 产生技术以及 FA-iPSC 定向分化产生的各种衍生细胞为针对 FA 的个性化药物筛选提供了最佳的细胞模型。基于此平台,本发明筛选了多种信号通路的作用分子,如 Sirt1 通路激动剂、P38 激酶抑制剂、抗炎性分子以及激素受体激动剂等涉及造血机能的小分子化合物库。

[0217] FA-iPSC 进行造血定向分化的第 6 天,向培养基中分别添加待筛选小分子:1 μ M 白藜芦醇(购自美国 Sigma 公司,货号:R5010-100MG),50ng/ml Danazol(购自美国 Sigma 公司,货号:D8399-100MG),5 μ M Doramapimod(分别购自美国 BIRB 公司,货号:796 以及美国 LC Laboratories 公司,货号:D-2444),5 μ M Dasatinib(美国 LC Laboratories 公司,货号:D-3307)和 5nM tremulacin(购自美国 Santa Cruz Biotech 公司,货号:sc-237233)。隔天换液。分化完成后,对产生的细胞进行流式细胞术分析(荧光素 PE 标记的抗人细胞表面抗原分子 CD34 抗体,荧光素 FITC 标记的抗人细胞表面抗原分子 CD43 抗体以及荧光素 APC 标记的抗人细胞表面抗原分子 Tra-1-85 抗体),比较其分化效率。

[0218] 对于集落形成实验,将分选的 CD34+ 细胞接种于含待测药物(相同体积待测药物的工作浓度分别为:50ng/ml danazol,5 μ M doramapimod,5 μ M dasatinib,5nM tremulacin,并以相同体积的 DMSO 作为处理对照组)的 Methocult (Stem Cell Technologies, H4435) 培养基上,培养至集落出现。比较小分子处理组与对照组的差异。

[0219] 本发明通过在 FA-iPSC 造血分化的过程中分别添加各种小分子,并且利用流式细胞术检测分化形成的造血前体细胞中 CD34 和 CD43 双阳性细胞的比例,来衡量小分子待测药物对携带致病基因突变的 FA-iPSC 造血分化过程的治疗效果(如图 7A, B 所示)。研究发现:1) 参与 Sirt 信号通路的白藜芦醇对造血干细胞生成没有促进作用;2) 一种用于血液病广谱治疗的一线药物, Danazol, 针对 FA-iPSC 衍生细胞, cFA-iPSC 衍生细胞以及正常的血液细胞均能够表现出一定的改善作用,说明其对 FA 没有特异性的治疗效果;3) 一种特异性 p38 抑制剂, Doramapimod, 能够显著提高 FA-iPSC 衍生细胞中 CD34+/CD43+ 细胞类群分化效率,尤其是对于提高 CD34^{high}/CD43^{low} 类群的细胞分化效率的作用更为突出。更重要的是,由 Doramapimod 处理的 FA-iPSC 细胞分化形成的 CD34+ 造血前体细胞,开始具有进一步分化为 CFU-GM 的能力,说明对 Doramapimod 对 FA 疾病表型的明显的治疗效果(图 7C)。此外,发明人利用该药筛平台还筛选出一种新型抗炎性天然小分子化合物, tremulacin, 该分子能够通过抑制 INF γ 、TNF 和 IL6 等细胞因子,特异性提高 FA-iPSC 衍生的造血干细胞进一步分化的能力(图 7D)。

[0001]

序列表

- <110> 中国科学院生物物理研究所
- <120> 制备范可尼贫血症患者自体诱导多能干细胞的方法及其应用
- <130> IB131403
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 1083
- <212> DNA
- <213> 人
- <400> 1
- atggcggggac acctggettc ggatttegcc ttctcgeccc ctccaggtgg tggaggtgat 60
- gggccagggg ggccggagcc gggetgggtt gatcctcgga cctggetaag cttccaagge 120
- cctcctggag ggccaggaat cgggccgggg gttgggccag getctgaggt gtgggggatt 180
- ccccatgcc ccccgccgta tgagttctgt ggggggatgg cgtactgtgg gccccaggtt 240
- ggagtggggc tagtgcccca aggcggcttg gagacctctc agcctgaggg cgaagcagga 300
- gtcgggggtg agagcaactc cgatggggcc tccccggage cctgcacct caccctgtgt 360
- gccgtgaagc tggagaagga gaagctggag caaaaccgg aggagtccca ggacatcaaa 420
- gctctgcaga aagaactcga gcaatttgcc aagetctga agcagaagag gatcacctgt 480

[0002]

ggatatacac aggccgatgt ggggetcacc ctgggggttc tatttgggaa ggtatteage	540
caaacgacca tctgcegett tgaggetctg cagetttagct tcaagaacat gtgtaagetg	600
cggeccittgc tgcagaagtg ggtggaggaa gctgacaaca atgaaaatct tcaggagata	660
tgcaaagcag aaaccctegt gcaggcccga aagagaaage gaaccagtat cgagaaccga	720
gtgagaggca acctggagaa tttgttctctg cagtgccega aacceacact gcagcagatc	780
agccacatcg cccagcagct tgggetcgag aaggatgtgg tccgagtgtg gttctgtaac	840
eggccccaga agggcaagcg atcaagcagc gactatgcaac aacgagagga ttttgaggct	900
gctgggtctc ctttctcagg gggaccagtg tccittctctc tggecccagg gcccattttt	960
ggtaccccag getatgggag cctcacttc actgcactgt actcctcggt cctttccct	1020
gagggggaag cetttceccc tgtctcctgc accactctgg getctcccat gcattcaaac	1080
tga	1083

<210> 2

<211> 954

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

atgtacaaca tgatggagac ggagctgaag ccgccgggcc cgcagcaaac ttcggggggc	60
---	----

[0003]

ggcggcggca actecaccgc ggcggcggcc ggcggcaacc agaaaaacag cecggaccgc	120
gteaageggc ccatgaatgc ettcattggtg tggctccgcg ggcageggcg caagatggcc	180
caggagaacc ccaagatgca caactcggag atcagcaage gectgggcgc cgagtggaaa	240
cttttgctcg agacggagaa gcgcccttc atcgacgagg ctaageggct gcgagcctg	300
cacatgaagg agcaccggga ttataaatac eggeccccgc ggaaaacca gacgetcatg	360
aagaaggata agtacacgt gcccggcggg ctgctggecc ccggcggcaa tagcatggcg	420
agcggggtcg gggctgggcgc cggcctgggc gcgggcgtga accagegcat ggacagttac	480
gcgcacatga acggctggag caacggcagc tacagcatga tgcaggacca gctgggetac	540
ccgcagcacc cgggcctcaa tgcgcacggc gcagegcaga tgcageccat gcaccgetac	600
gacgtgagcg cctgcagta caactccatg accagetgce agacctacat gaacggetcg	660
cccactaca gcatgtctta ctgcagcag ggcaccctg gcatggetct tggetccatg	720
ggttcggtgg tcaagtcga ggccagctcc agccccctg tggttacctc ttctccccac	780
tccagggcgc cctgccagge cggggacctc cgggacatga tcagcatgta tctccccgc	840
gccgaggtgc cggaaccgc cgccccagc agacttcaca tgteccagca ctaccagagc	900
ggccccgtgc ccggcaeggc cattaacggc acaetgcccc tctcacacat gtga	954

[0004]

<210> 3

<211> 1440

<212> DNA

<213> 人

<400> 3

atgaggcagc cacctggega gtctgacatg gctgtcagcg acgcgctgct cccatcttcc 60

tccacgttcg cgtctggccc ggcgggaagg gagaagacac tgcgtcaage aggtgcccgc 120

aataaccgct ggcgggagga gctctccac atgaagcgac tcccccaagt gcttcccgc 180

cgcccctatg acctggcggc ggcgaccgtg gccacagacc tggagagcgg cggagccggt 240

gcggtttgcg gcggtagcaa cctggcgccc ctacctegga gagagaccga ggagttcaac 300

gatctctgga acctggactt tattctctcc aattcgctga cccatctccc ggagtcagtg 360

ggcgccaccg tgtctctegtc agcgtcagcc tctctctctgt cgtcgccgtc gacgagcggc 420

cctgccagcg cgcctccac ctgcagcttc acctatccga tccgggcggg gaacgaccgc 480

ggcgtggcgc cgggcggcac ggcgggaggc ctctctatg gcaggagtc cgtccccct 540

ccgaagcttc cttcaacct ggcggacatc aaegacgtga gccctcggg cggtctctgt 600

ggcagctcc tggggcaga attggaccgc gtgtacatcc cgcgcagca gccgcagccg 660

ccaggtggcg ggctgatggg caagtctgtg ctgaaggcgt cgtgagcgc ccctggcagc 720

[0005]

gagtaaggca gcccgtcggc catcagegtc agcaaaggca gcectgacgg cagccacccg	780
gtggtggtgg cgeectacaa cggegggccc cegegcacgt gecccaagat caagcaggag	840
gcggtctctt cgtgcaccca cttgggctgt ggaccacctc teageaatgg ccaccggccc	900
gctgcacacg acttccccct ggggcggcag ctccccagea ggactacccc gaccctgggt	960
cttgaggaag tgetgagcag cagggactgt caccctgccc tgecgettcc tcccggcttc	1020
catccccacc cggggcccaa ttaccatccc ttctgcccc atcagatgca gccgcaagtc	1080
cegecgtcc attaccaaga gctcatgcca cccggttctc gatgcccaga ggagcccaag	1140
ccaaagaggg gaagacgac gtggccccgg aaaaggaccg ccaccacac ttgtgattac	1200
gcgggtctgc gcaaaccta cacaaagagt tccatctca aggcacacct gcgaaccac	1260
acaggtgaga aacctacca ctgtgactgg gacggctgtg gatgaaatt cgcctgctca	1320
gatgaactga ccaggeacta ccgtaaacac acggggcacc gcccttcca gtgccaaaaa	1380
tgcgaccgag catttccag gtcggaccac ctgccttac acatgaagag gcatttttaa	1440

<210> 4

<211> 1095

<212> DNA

<213> 人

<400> 4

[0006]

atggactacg actcgtacca gcaactatttc tacgactatg actgcgggga ggattttetac	60
cgctccacgg cgcccagega ggacatctgg aagaaattcg agctggtgcc ategcecccc	120
acgtegcegc cctggggctt gggctccggc gcaggggacc cggeccccgg gatttggtccc	180
ccggagccgt ggcccggagg gtgcaccgga gacgaagcgg aatcccgggg ccaactcgaaa	240
ggctggggca ggaactacgc ctccatcata cgccgtgact gcatgtggag cggettctcg	300
gcccgggaac ggctggagag agctgtgagc gaccggctcg ctcttggcgc gcccggggg	360
aaccgcecca aggcgtecgc cgccccggac tgcactceca gcctcgaage eggcaaccgc	420
gcgcccgcg cccctgtcc gctgggcgaa cccaagaccc aggcctgctc egggtccgag	480
agcccaagcg actcggagaa tgaagaaatt gatgttgtga cagtagagaa gaggcagtct	540
ctgggtattc ggaagccggt caccatcacg gtgcgagcag accccctgga tccctgcatg	600
aagcatttcc acatctecat ccateageaa cagcacaact atgctgcccg ttttctctca	660
gaaagctgct cccaagaaga ggcttcagag aggggtcccc aagaagaggt tctggagaga	720
gatgctgcag gggaaaagga agatgaggag gatgaagaga ttgtgagtcc cccacctgta	780
gaaagtgagg ctgcccagtc ctgccacccc aaacctgtca gttctgatac tgaggatgtg	840
accaagagga agaatecaaa ctctctggag cgcaagagge ggaatgacct gcgttcgcca	900

[0007]

ttcttggcgc tgagggacca ggtgeccace ctggccagct getccaagge ccccaaagta	960
gtgatectaa gcaaggcett ggaatacttg caagccctgg tgggggctga gaagaggatg	1020
gctacagaga aaagacagct ccgatgcegg cagcagcagt tgcagaaaag aattgcatac	1080
ctcaactggct actaa	1095

<210> 5

<211> 630

<212> DNA

<213> 人

<400> 5

atgggctcgc tgtccaacca gcagtttgca ggtggetgcg ccaaggcggc agaagaggcg	60
cccgaggagg cgccggagga cgcggcccgg gcggcggacg agcctcagct gctgcacggt	120
gcggeatct gtaagtggtt caacgtgccc atggggttcg gcttctgtc catgaaccgc	180
cgcgcegggg tegcgetega cccccagtg gatgtctttg tgcaccagag taagctgca	240
atggaagggt tccggagctt gaaggagggt gaggcagtgg agttcacctt taagaagtea	300
gccaagggtc tggaatccat ccgtgtcacc ggacctggtg gactattctg tattgggagt	360
gagagcggc caaaaggaaa gagcatgcag aagcgcagat caaaaggaga caggtgctac	420
aactgtggag gtctagatca tcatgccaag gaatgcaage tgccacceca gccaagaag	480

[0008]

tgccaattct gccagagcat cagccatatg gtagectcat gtcegctgaa ggcccageag	540
ggcctagtg cacagggaaa gccaacctac tttegagagg aagaagaaga aatecacagc	600
cctacctgc tccggaggc acagaattga	630
<210> 6	
<211> 78	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 6	
ggcggactcc agtggtaate tacttcaaga gagtagatta ccaactggagt cttttttgga	60
attectgeag cccggggg	78

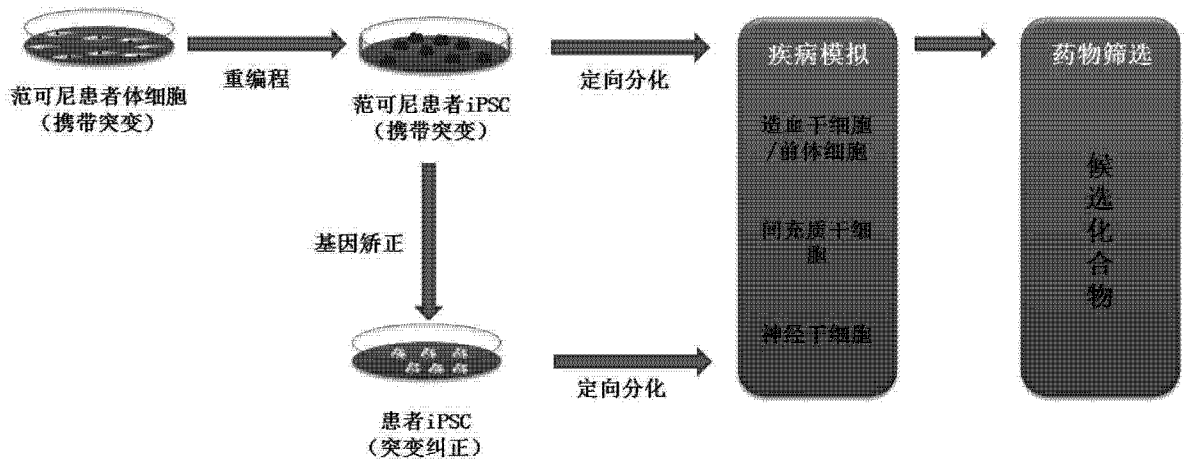


图 1

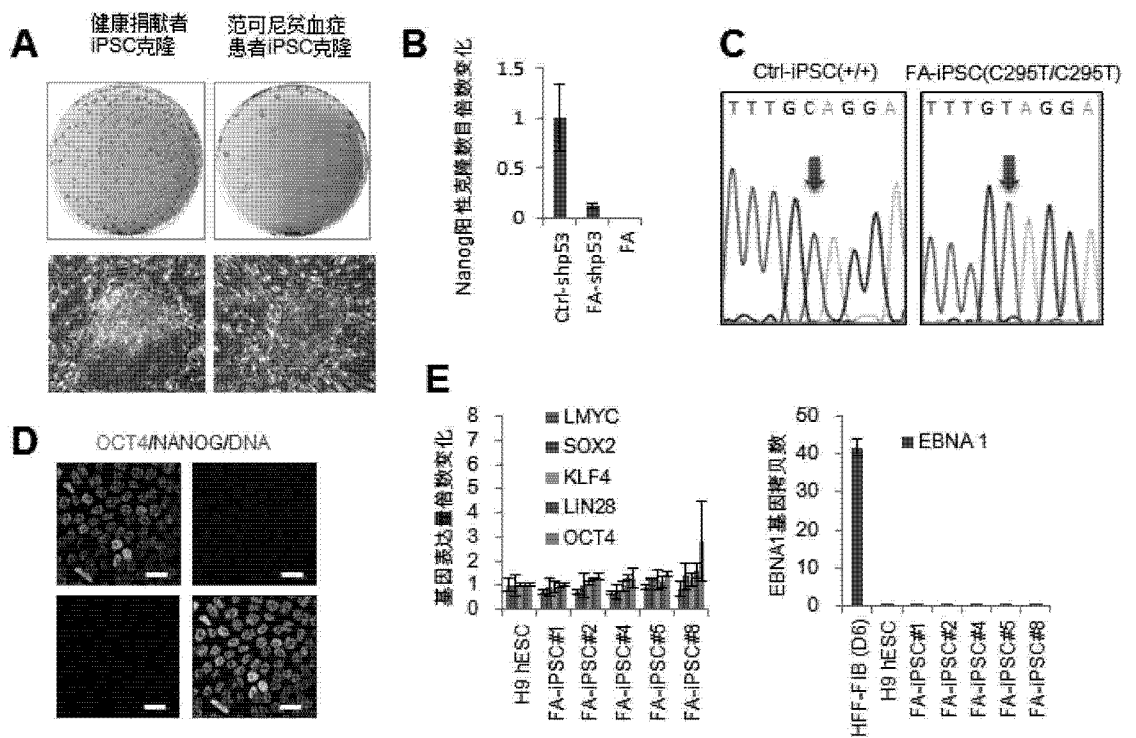


图 2

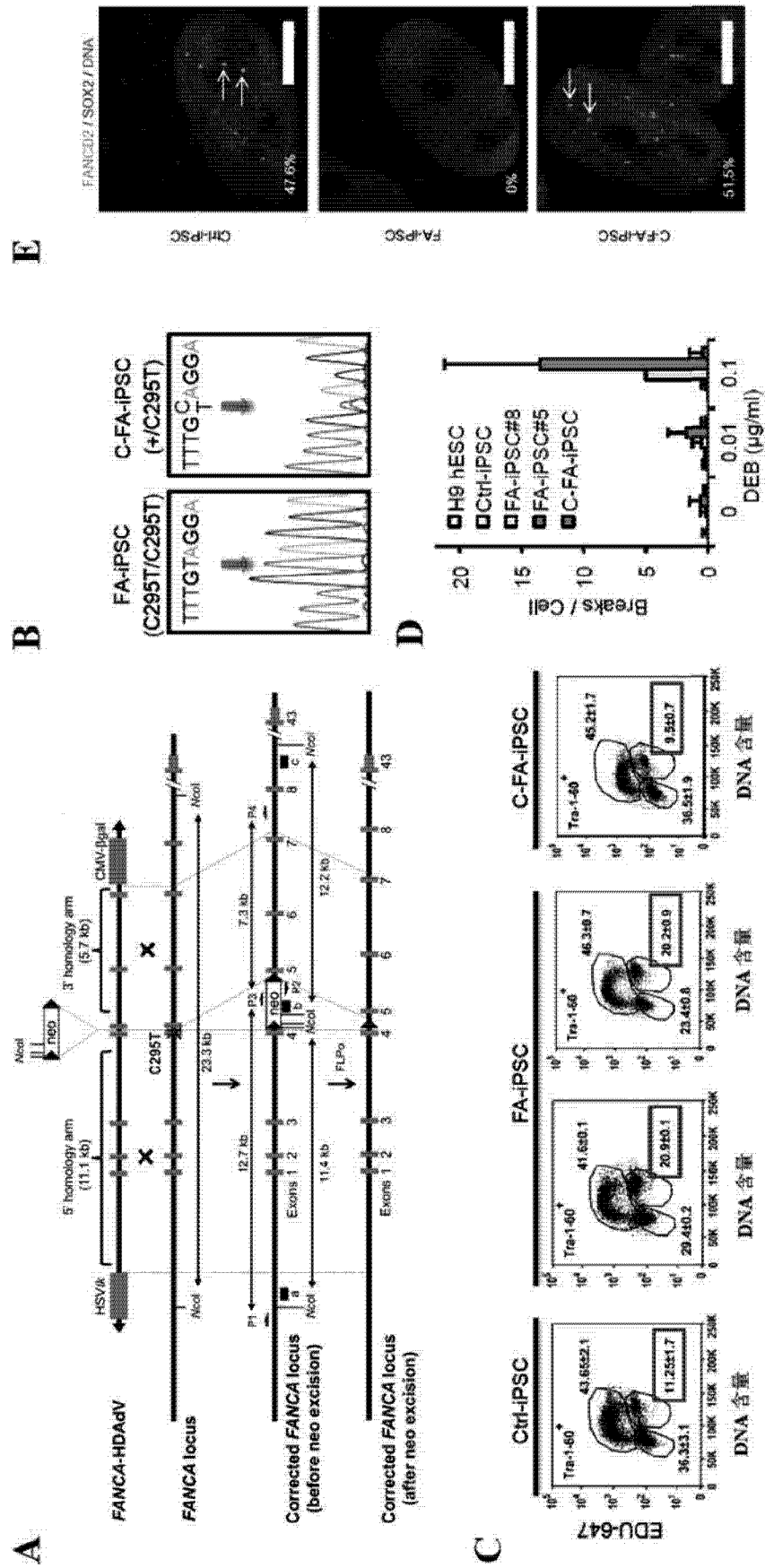


图 3

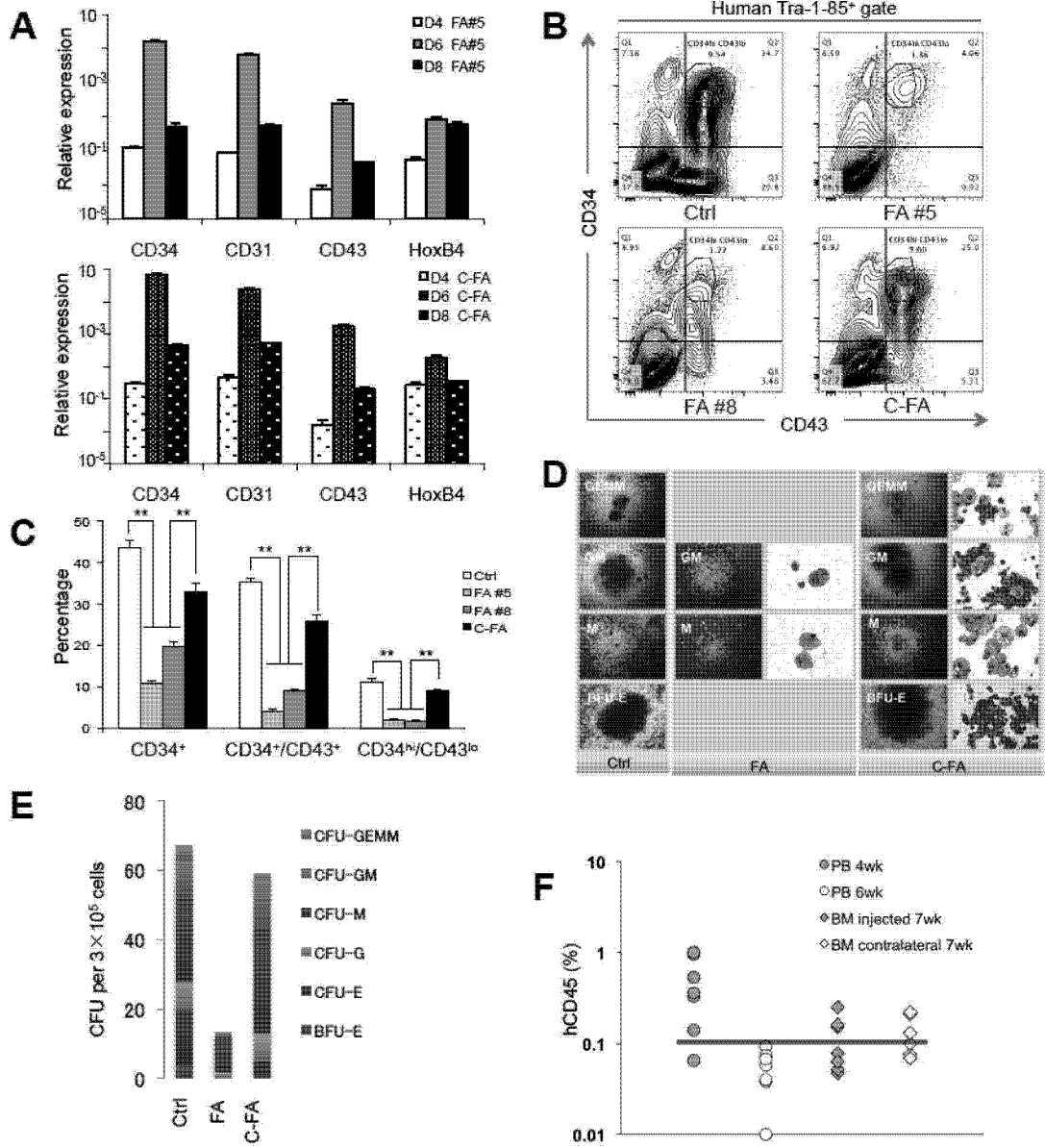
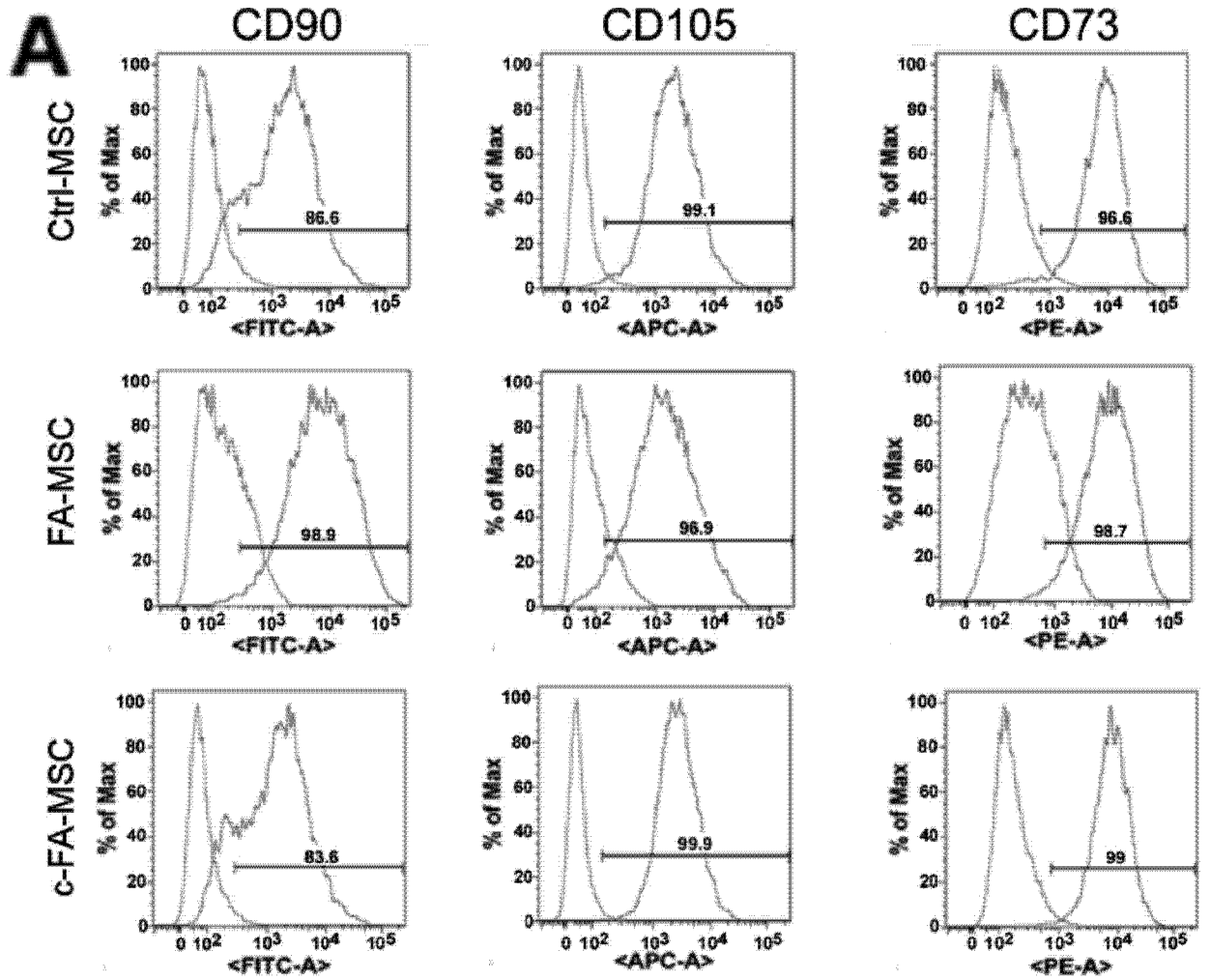


图 4



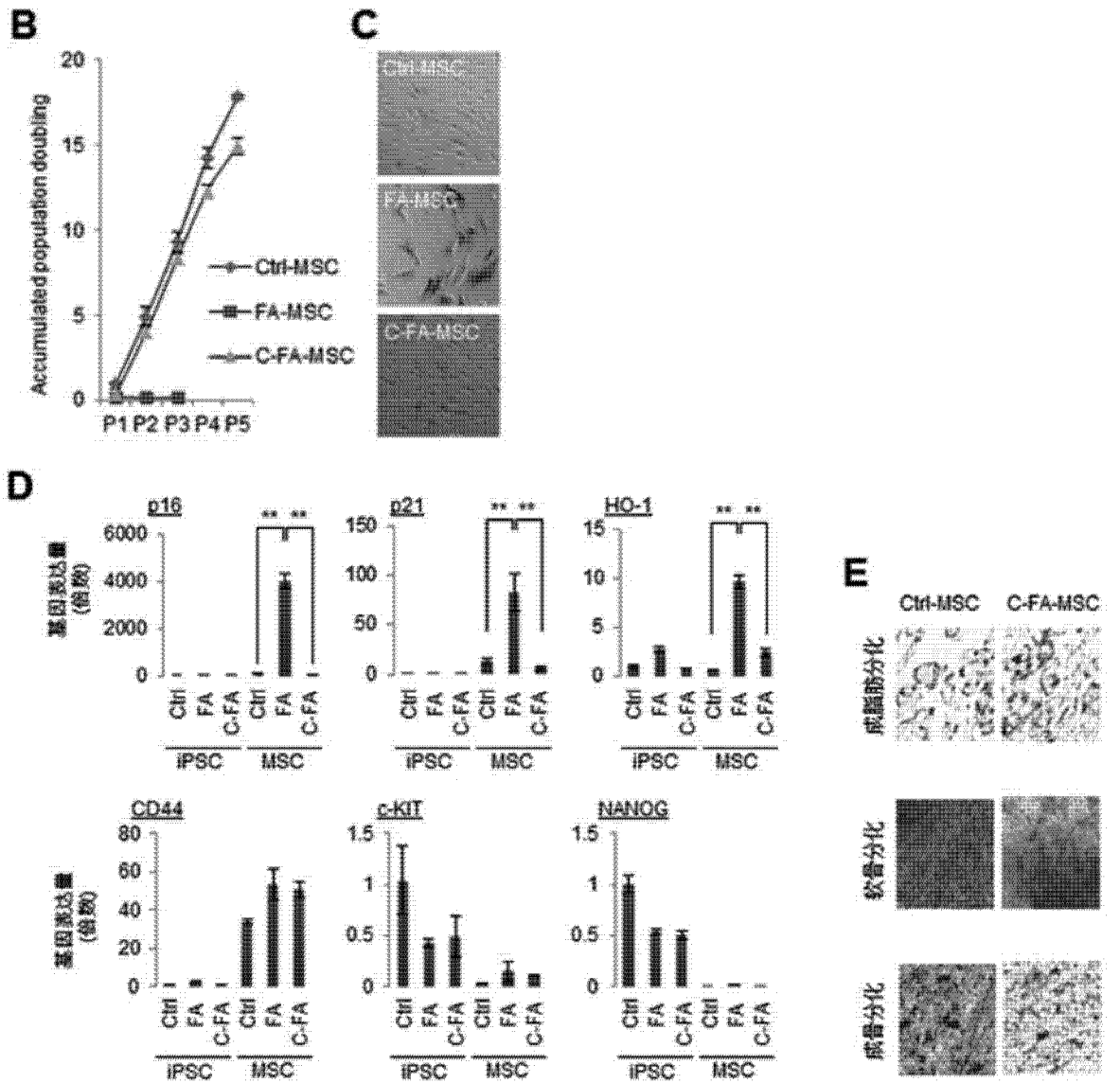


图 5

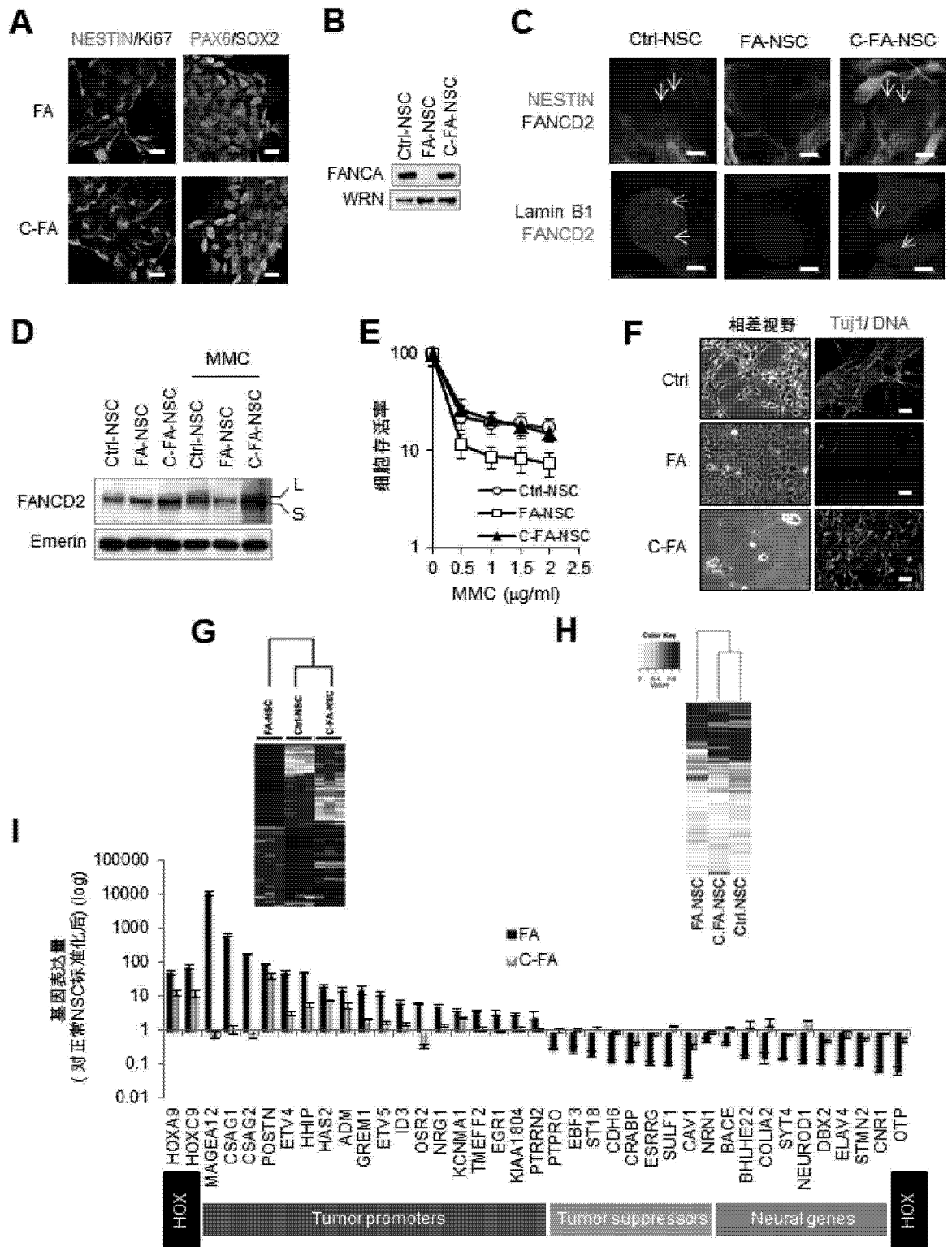


图 6

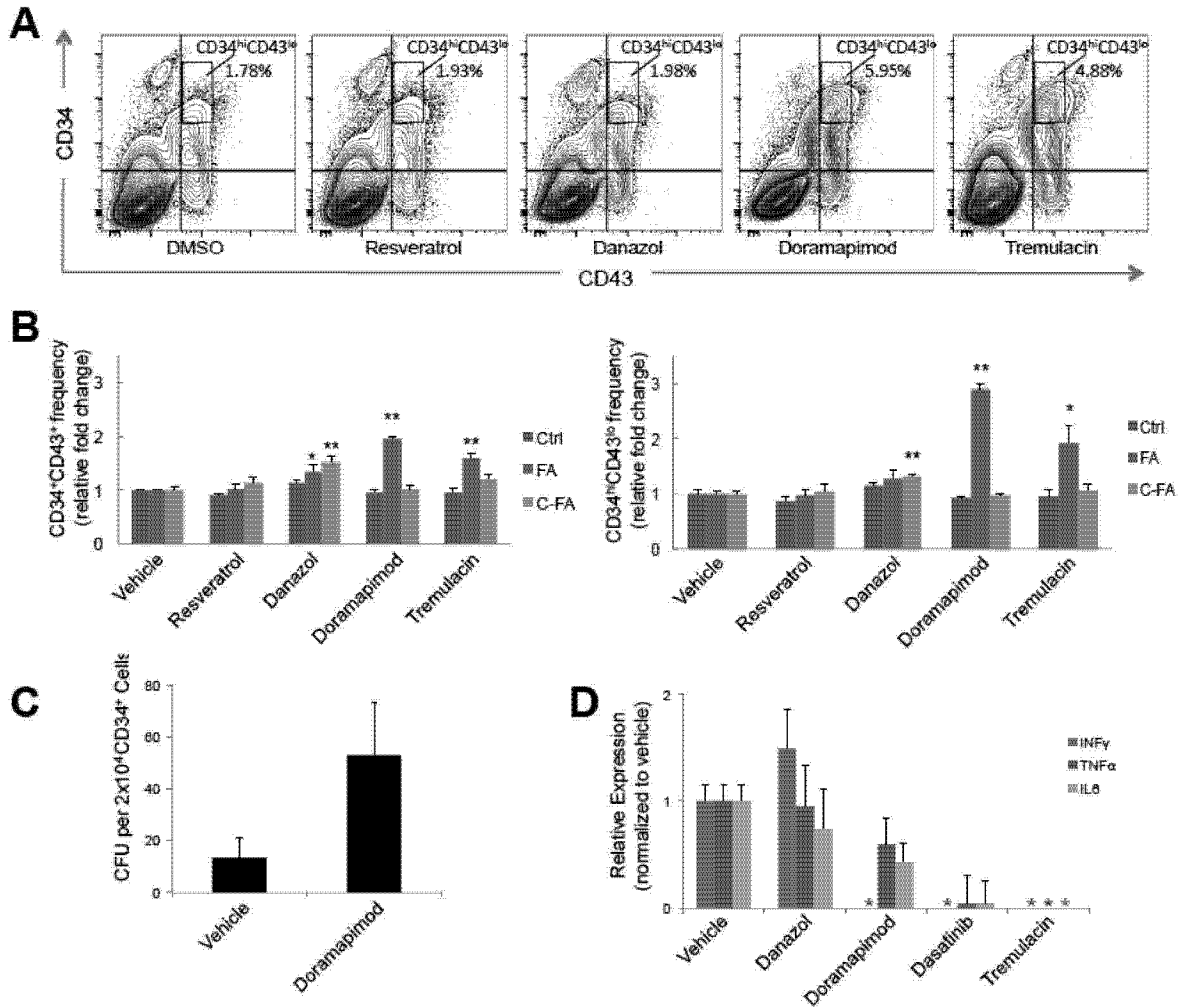


图 7