



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113166729 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(21) 申请号 201980071846.5

凯特琳·罗 李乾彰

(22) 申请日 2019.10.29

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

(30) 优先权数据

代理人 马丛

62/752,000 2018.10.29 US

(51) Int.Cl.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 5/10 (2006.01)

2021.04.29

A61K 35/28 (2015.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 38/18 (2006.01)

PCT/CA2019/051526 2019.10.29

A61K 38/46 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61K 48/00 (2006.01)

W02020/087160 EN 2020.05.07

A61P 37/00 (2006.01)

(71) 申请人 渥太华医院研究院

C07K 14/475 (2006.01)

地址 加拿大安大略省渥太华

C07K 14/51 (2006.01)

申请人 联合治疗学有限公司

C12N 9/18 (2006.01)

(72) 发明人 迈克尔·卡拉汉 雪莉·H·J·梅

权利要求书2页 说明书19页

王琰 玛利亚·弗洛里安

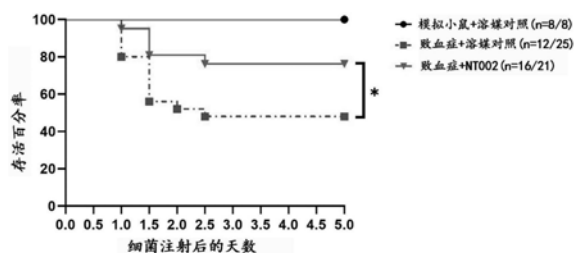
序列表17页 附图16页

(54) 发明名称

过表达AOAH的基因工程间充质干细胞及其用途

(57) 摘要

本公开描述了过表达酰基羧酸水解酶(AOAH)多肽的基因修饰的间充质干细胞(MSCs),例如包含编码AOAH多肽的重组核酸的MSCs。MSCs可能进一步过表达第二感兴趣的多肽,如血管生成素-1(ANGPT1)。本公开还描述了包含基因修饰的间充质干细胞的药物组合物。本公开还描述了所述基因修饰的MSCs和/或包含所述MSCs的药物组合物作为药物的用途,例如用于治疗系统性炎症性反应综合征(SIRS)或败血症。



1. 一种经基因修饰以过表达酰基羧酸水解酶(AOAH)多肽的间充质干细胞(MSC)。
2. 根据权利要求1所述的MSC,其中所述MSC表达重组的AOAH多肽。
3. 根据权利要求2所述的MSC,其中所述重组的AOAH多肽包含与SEQ ID NO:5中第35~575位残基的氨基酸序列至少70%相同的氨基酸序列。
4. 根据权利要求3所述的MSC,其中所述重组的AOAH多肽包含与SEQ ID NO:5中第35~575位残基的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
5. 根据权利要求4所述的MSC,其中所述重组的AOAH多肽包含SEQ ID NO:5中第35~575位残基的氨基酸序列。
6. 根据权利要求5所述的MSC,其中所述重组的AOAH多肽包含SEQ ID NO:5中第24~575位残基的氨基酸序列。
7. 根据权利要求2~6中任一项所述的MSC,其中所述MSC包含第一外源核酸,所述第一外源核酸包含与启动子或启动子/增强子组合可操作地连接的AOAH多肽编码区。
8. 根据权利要求7所述的MSC,其中所述启动子是巨细胞病毒(CMV)启动子或延伸因子-1(EF1)启动子。
9. 根据权利要求7所述的MSC,其中所述启动子/增强子组合是CMV启动子/增强子组合。
10. 根据权利要求7~9中任一项所述的MSC,其中所述AOAH多肽编码区包含与SEQ ID NO:1中第7~1734位核苷酸至少70%相同的核苷酸序列。
11. 根据权利要求10所述的MSC,其中所述AOAH多肽编码区包含与SEQ ID NO:1中第7~1734位核苷酸至少90%相同的核苷酸序列。
12. 根据权利要求11所述的MSC,其中所述AOAH多肽编码区包含SEQ ID NO:1中第7~1734位的核苷酸序列。
13. 根据权利要求1~12中任一项所述的MSC,其中所述MSC经基因修饰以过表达血管生成素-1(ANGPT1)多肽。
14. 根据权利要求13所述的MSC,其中所述MSC表达重组ANGPT1多肽。
15. 根据权利要求14所述的MSC,其中所述重组ANGPT1多肽包含与SEQ ID NO:7中第16~498位残基的氨基酸序列至少70%相同的氨基酸序列。
16. 根据权利要求15所述的MSC,其中所述重组ANGPT1多肽包含与SEQ ID NO:7中第16~498位残基的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
17. 根据权利要求16所述的MSC,其中所述重组ANGPT1多肽包含SEQ ID NO:7中第16~498位残基的氨基酸序列。
18. 根据权利要求13~17中任一项所述的MSC,其中所述MSC包含第二外源核酸,所述第二外源核酸包含与第二启动子或启动子/增强子组合可操作地连接的ANGPT1多肽编码区。
19. 根据权利要求18所述的MSC,其中所述第二启动子是CMV启动子或EF1启动子。
20. 根据权利要求18所述的MSC,其中所述第二启动子/增强子组合是CMV启动子/增强子组合。
21. 根据权利要求18~20中任一项所述的MSC,其中所述ANGPT1多肽编码区包含与SEQ ID NO:3中第7~1503位核苷酸至少70%相同的核苷酸序列。
22. 根据权利要求21所述的MSC,其中所述ANGPT1多肽编码区包含与SEQ ID NO:3中第7~1503位核苷酸至少90%相同的核苷酸序列。

23. 根据权利要求22所述的MSC, 其中所述A0AH多肽编码区包含SEQ ID NO:3中第7~1503位的核苷酸序列。

24. 根据权利要求7~23中任一项所述的MSC, 其中所述第一和/或第二外源核酸包含于载体或质粒中。

25. 根据权利要求24所述的MSC, 其中所述第一和第二外源核酸包含于相同的载体或质粒中。

26. 根据权利要求1~25中任一项所述的MSC的用途, 其中所述MSC用做药物。

27. 根据权利要求26所述的MSC的用途, 其中所述药物用于预防或治疗受试者的系统性炎症性反应综合征(SIRS)。

28. 根据权利要求27所述的MSC的用途, 其中所述SIRS是由败血症引起的。

29. 根据权利要求27或28所述的MSC的用途, 其中所述受试者是人。

30. 根据权利要求27~29中任一项所述的MSC的用途, 其中所述MSC相对于所述受试者是同种异体的。

31. 根据权利要求27~29中任一项所述的MSC的用途, 其中所述MSC相对于所述受试者是自体的。

32. 一种预防或治疗系统性炎症反应综合征(SIRS)的方法, 包括向有此需要的受试者施用有效剂量的权利要求1~25中任一项所述的MSC。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述SIRS由败血症引起。

34. 根据权利要求32或33所述的方法, 其中所述受试者是人。

35. 根据权利要求32~34中任一项所述的方法, 其中所述MSC相对于所述受试者是同种异体的。

36. 根据权利要求32~34中任一项所述的方法, 其中所述MSC相对于所述受试者是自体的。

37. 权利要求1~25中任一项所述的MSC在预防或治疗受试者的系统性炎症反应综合征(SIRS)中的用途。

38. 权利要求1~25中任一项所述的MSC在制备用于预防或治疗受试者的系统性炎症反应综合征(SIRS)的药物中的用途。

39. 根据权利要求37或38所述的用途, 其中所述SIRS由败血症引起。

40. 根据权利要求37~39中任一项所述的用途, 其中所述受试者是人。

41. 根据权利要求37~40中任一项所述的用途, 其中所述MSC相对于所述受试者是同种异体的。

42. 根据权利要求37~40中任一项所述的用途, 其中所述MSC相对于所述受试者是自体的。

过表达AOAH的基因工程间充质干细胞及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本发明请求要求2018年10月29日提交的申请序列号为No.62/752,000的美国临时申请的权益,其通过全部引用的方式包含于此。

技术领域

[0003] 本公开一般涉及炎症性疾病的治疗,例如系统性炎症反应综合征(SIRS)、多器官功能障碍症状(MODS)、败血性休克和败血症。

背景技术

[0004] 系统性炎症反应综合征(SIRS)是一种与全身炎症相关的严重疾病,其可导致多器官功能障碍。急性肺损伤(ALI)代表了最常见和最早的器官衰竭。SIRS可能是多种病源导致的结果,其中败血症综合征是最常见和最致命的原因。

[0005] 在美国,败血症每年影响超过100万人,其导致死亡的风险高达30%,严重的败血症高达50%,败血性休克高达80%。败血症治疗被列为美国医院治疗的最昂贵疾病,2011年的费用超过200亿美元(Torio等人,《医疗成本与利用项目(HCUP)统计简报》, #160, 2013, 1-12)。败血症每年导致超过258,000人死亡,是美国继心脏病和癌症之后的第三大死亡原因。随后,幸存者通常在败血症后面临长期影响,包括截肢、焦虑、记忆丧失、慢性疼痛和疲劳以及认知功能的恶化。

[0006] 败血症是由于免疫系统与细菌和细菌壁成分相互作用导致炎症性介质过度产生的结果。脂多糖(LPS)是已知引发不良免疫反应的致病因子之一,也被称为内毒素和革兰氏阴性菌的主要外膜成分。

[0007] 细菌在血液中的传播会导致细胞因子风暴,从而将通常用于控制血源性感染的健康免疫系统转化为患者的负担。

[0008] 尽管可以使用抗生素作为细菌败血症的控制策略,但近年来血流细菌分离株对抗生素耐药性的增加突出表明,迫切需要一种用于治疗和管理败血症及其症状和病理的新化合物、治疗方法和方案。

[0009] 本说明书涉及许多文献,其内容通过整体引用的方式结合于此。

发明内容

[0010] 本公开提供了下述1~42项技术方案:

[0011] 1. 一种经基因修饰以过表达酰基羧酸水解酶(AOAH)多肽的间充质干细胞(MSC)。

[0012] 2. 根据第1项所述的MSC,其中所述MSC表达重组的AOAH多肽。

[0013] 3. 根据第2项所述的MSC,其中所述重组的AOAH多肽包含与SEQ ID NO:5中第35~575位残基的氨基酸序列至少70%相同的氨基酸序列。

[0014] 4. 根据第3项所述的MSC,其中所述重组的AOAH多肽包含与SEQ ID NO:5中第35~575位残基的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

- [0015] 5. 根据第4项所述的MSC,其中所述重组的A0AH多肽包含SEQ ID NO:5中第35~575位残基的氨基酸序列。
- [0016] 6. 根据第5项所述的MSC,其中所述重组的A0AH多肽包含SEQ ID NO:5中第24~575位残基的氨基酸序列。
- [0017] 7. 根据第2~6项中任一项所述的MSC,其中所述MSC包含第一外源核酸,所述第一外源核酸包含与启动子或启动子/增强子组合可操作地连接的A0AH多肽编码区。
- [0018] 8. 根据第7项所述的MSC,其中所述启动子是巨细胞病毒 (CMV) 启动子或延伸因子-1 (EF1) 启动子。
- [0019] 9. 根据第7项所述的MSC,其中所述启动子/增强子组合是CMV启动子/增强子组合。
- [0020] 10. 根据第7~9项中任一项所述的MSC,其中所述A0AH多肽编码区包含与SEQ IDNO:1中第7~1734位核苷酸至少70%相同的核苷酸序列。
- [0021] 11. 根据第10项所述的MSC,其中所述A0AH多肽编码区包含与SEQ ID NO:1中第7~1734位核苷酸至少90%相同的核苷酸序列。
- [0022] 12. 根据第11项所述的MSC,其中所述A0AH多肽编码区包含SEQ ID NO:1中第7~1734位的核苷酸序列。
- [0023] 13. 根据第1~12项中任一项所述的MSC,其中所述MSC经基因修饰以过表达血管生成素-1 (ANGPT1) 多肽。
- [0024] 14. 根据第13项所述的MSC,其中所述MSC表达重组ANGPT1多肽。
- [0025] 15. 根据第14项所述的MSC,其中所述重组ANGPT1多肽包含与SEQ ID NO:7中第16~498位残基的氨基酸序列至少70%相同的氨基酸序列。
- [0026] 16. 根据第15项所述的MSC,其中所述重组ANGPT1多肽包含与SEQ ID NO:7中第16~498位残基的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
- [0027] 17. 根据第16项所述的MSC,其中所述重组ANGPT1多肽包含SEQ ID NO:7中第16~498位残基的氨基酸序列。
- [0028] 18. 根据第13~17项中任一项所述的MSC,其中所述MSC包含第二外源核酸,所述第二外源核酸包含与第二启动子或启动子/增强子组合可操作地连接的ANGPT1多肽编码区。
- [0029] 19. 根据第18项所述的MSC,其中所述第二启动子是CMV启动子或EF1启动子。
- [0030] 20. 根据第18项所述的MSC,其中所述第二启动子/增强子组合是CMV启动子/增强子组合。
- [0031] 21. 根据第18~20项中任一项所述的MSC,其中所述ANGPT1多肽编码区包含与SEQ ID NO:3中第7~1503位核苷酸至少70%相同的核苷酸序列。
- [0032] 22. 根据第21项所述的MSC,其中所述ANGPT1多肽编码区包含与SEQ ID NO:3中第7~1503位核苷酸至少90%相同的核苷酸序列。
- [0033] 23. 根据第22项所述的MSC,其中所述A0AH多肽编码区包含SEQ ID NO:3中第7~1503位的核苷酸序列。
- [0034] 24. 根据第7~23项中任一项所述的MSC,其中所述第一和/或第二外源核酸包含于载体或质粒中。
- [0035] 25. 根据第24项所述的MSC,其中所述第一和第二外源核酸包含于相同的载体或质粒中。

- [0036] 26. 根据第1~25项中任一项所述的MSC的用途,其中所述MSC用做药物。
- [0037] 27. 根据第26项所述的MSC的用途,其中所述药物用于预防或治疗受试者的系统性炎症性反应综合征(SIRS)。
- [0038] 28. 根据第27项所述的MSC的用途,其中所述SIRS是由败血症引起的。
- [0039] 29. 根据第27或28项所述的MSC的用途,其中所述受试者是人。
- [0040] 30. 根据第27~29项中任一项所述的MSC的用途,其中所述MSC相对于所述受试者是同种异体的。
- [0041] 31. 根据第27~29项中任一项所述的MSC的用途,其中所述MSC相对于所述受试者是自体的。
- [0042] 32. 一种预防或治疗系统性炎症反应综合征(SIRS)的方法,包括向有此需要的受试者施用有效剂量的第1~25项中任一项所述的MSC。
- [0043] 33. 根据第32项所述的方法,其中所述SIRS由败血症引起。
- [0044] 34. 根据第32或33项所述的方法,其中所述受试者是人。
- [0045] 35. 根据第32~34项中任一项所述的方法,其中所述MSC相对于所述受试者是同种异体的。
- [0046] 36. 根据第32~34项中任一项所述的方法,其中所述MSC相对于所述受试者是自体的。
- [0047] 37. 第1~25项中任一项所述的MSC在预防或治疗受试者的系统性炎症反应综合征(SIRS)中的用途。
- [0048] 38. 第1~25项中任一项所述的MSC在制备用于预防或治疗受试者的系统性炎症反应综合征(SIRS)的药物中的用途。
- [0049] 39. 根据第37或38项所述的用途,其中所述SIRS由败血症引起。
- [0050] 40. 根据第37~39项中任一项所述的用途,其中所述受试者是人。
- [0051] 41. 根据第37~40项中任一项所述的用途,其中所述MSC相对于所述受试者是同种异体的。
- [0052] 42. 根据第37~40项中任一项所述的用途,其中所述MSC相对于所述受试者是自体的。通过阅读下述特定实施方式的非限制性描述,本公开的其他目的、优点和特征将变得更加显而易见,这些描述仅通过参考附图的示例给出。

附图说明

- [0053] 在附图中:
- [0054] 图1A描述了在EF-1启动子控制下包含AOAH编码序列的质粒(#2)的构建。
- [0055] 图1B描述了在CMV启动子控制下包含AOAH编码序列的质粒(#3)的构建。
- [0056] 图1C描述了在CMV启动子和CMV增强子控制下包含的AOAH编码序列的质粒(#1)的构建。
- [0057] 图2示出了用(i)质粒#1(黑色柱)(ii)质粒#2(深灰色柱)和(iii)质粒#3(浅灰色柱)转染的MSC对AOAH的表达。所述表达通过Western Blot在细胞裂解物上进行测定,并根据β-肌动蛋白表达对所述表达进行标准化。
- [0058] 图3A和图3B示出了在MSC中总的内部AOAH表达量(图3A)以及成熟AOAH相对于总

AOAH表达量的比例(图3B),其中所述MSC用质粒#1转染并在转染后24h、48h和72h后收获。所述表达量通过WesternBlot在细胞裂解物上进行测定,并根据 β -肌动蛋白表达量对所述表达进行归一化。

[0059] 图3C示出了MSC培养基中AOAH的水平,其中所述MSC用质粒#1转染并在转染后24h、48h和72h后收获。所述表达量用ELISA法进行测定。

[0060] 图4A是本研究中使用的内毒素诱导的败血症动物模型的示意图。通过腹腔注射LPS诱导小鼠内毒素血症的产生,并在LPS注射后1h用AOAH转染的MSC(NT002)、未转染的MSC或溶媒(Vehicle)处理小鼠。LPS注射后20h,采集小鼠血浆,测定促炎细胞因子或趋化因子的血浆水平。

[0061] 图4B-4I示出了LPS注射后20h,用NT002(n=8)、未转染的MSC(n=8)或溶媒(n=7)处理的小鼠血浆中促炎细胞因子或趋化因子(IL-6(图4B)、IL-10(图4C)、IL-12(图4D)、MIP-1a(图4E)、嗜酸性粒细胞趋化因子(图4F)、G-CSF(图4G)、KC(图4H)和MCP-1(图4I))的水平。 $*P<0.05$ $**P<0.01$ (单因素方差分析)。

[0062] 图5A是本研究中使用的 E. coli 诱导的败血症动物模型的示意图。通过腹膜内注射在小鼠中诱导 E. coli ,并且在细菌注射1h后用NT002(或溶媒)处理小鼠。评估动物健康状况5天,以确定存活率。

[0063] 图5B示出了感染 E. coli 的小鼠和用NT002或溶媒处理的小鼠的存活率。模拟(sham)小鼠(无败血症)接受溶媒处理作为对照。 $*P<0.05$ (Log-rank检验)。

[0064] 图6A描述了包含AOAH编码序列和ANGPT1编码序列的质粒#4的构建。

[0065] 图6B示出了用于本文所述研究的编码人AOAH的核酸的密码子优化序列(SEQ ID NO:1)。编码序列用粗体显示,前6个核苷酸代表Kozak序列,最后3个核苷酸对应于终止密码子。

[0066] 图6C示出了用于本文所述研究的编码人ANGPT1的核酸序列(SEQ ID NO:3)。编码序列用粗体显示,前6个核苷酸代表Kozak序列,最后3个核苷酸对应于终止密码子。

[0067] 图6D示出了感染 E. coli 的小鼠和用NT003(AOAH/ANGPT1-转染的MSC)或溶媒处理的小鼠的存活率。

[0068] 图7A为本研究中使用的盲肠结扎穿刺(CLP)诱导的败血症动物模型示意图。诱导小鼠患有败血症后,在CLP后6h用NT003(AOAH/ANGPT1转染的MSCs)或溶媒处理小鼠。模拟小鼠(无败血症)接受溶媒处理作为对照。评估动物健康状况5天,以确定存活率。

[0069] 图7B示出了用NT003或溶媒处理的CLP小鼠的合并存活数据。

[0070] 图8A示出了人AOAH(同种型1,UniProtKB登录号:P28039,SEQ ID NO:5)的氨基酸序列,其中带下划线的是信号肽序列(第1-23位残基)、斜体的是前肽序列(第24-34位残基)和粗体的是成熟形式的序列(第35-575位残基)。

[0071] 图8B示出了编码人AOAH的cDNA的核苷酸序列(同种型1,NCBI参考序列:NM_001637.3,SEQ ID NO:6),其中粗体的是编码序列。

[0072] 图9A示出了人ANGPT1(同种型1,UniProtKB登录号:Q15389-1,SEQ ID NO:7)的氨基酸序列,其中带下划线的是信号肽序列(第1-15位残基)和粗体的是成熟形式的序列(第16-498位残基)。

[0073] 图9B和9C示出了编码人ANGPT1(同种型1,NCBI参考序列:NM_001146.4,SEQ ID

NO:8)的cDNA的核苷酸序列,其中粗体的是编码序列。

具体实施方式

[0074] 在描述技术的上下文中(特别是在下面的权利要求的上下文中),术语“一个(a)”和“一个(an)”和“所述”以及类似的指代物的使用应被解释为覆盖单数和复数,除非本文中另有说明或与上下文明显矛盾。

[0075] 术语“包括”、“具有”、“包含”和“含有”应被解释为开放式术语(即,意思是“包括,但不限于”),除非另有说明。

[0076] 本文中描述的所有方法都可以以任何合适的顺序进行,除非本文中另有说明或者上下文明显矛盾。

[0077] 任何和所有示例或示例性语言的使用(“例如,本文中提供的“例如”)仅旨在更好地说明所要求保护的技术的实施方式,并且除非另外要求保护,否则不对范围造成限制。

[0078] 说明书中的任何语言都不应被解释为指示任何未要求保护的要素对于要求保护的技术的实施方式的实施是必不可少的。

[0079] 在本文中,术语“大约”具有其通常的含义。术语“大约”用于表示一个值包括用于确定该值的设备或方法的误差的固有变化,或包含接近接近所述值的值,例如在所述值(或值的范围)的10%之内。

[0080] 除非本文中另有说明,否则本文中数值范围的叙述仅旨在用作分别指代落入该范围内的每个单独值的简写方法,并且每个单独值都被并入说明书中,如同其在本文中被单独叙述一样。范围内的值的所有子集也被并入说明书中,就好像它们在本文中被单独叙述一样。

[0081] 在本公开的特征或方面是按照马库什组或备选方案列表来描述的情况下,本领域技术人员将认识到,本公开也因此是按照马库什组或备选方案列表的任何单个成员或成员分组来描述的。

[0082] 除非另有特别定义,本文使用的所有技术和科学术语应被认为具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义(例如,在干细胞生物学、细胞培养、分子遗传学、免疫学、免疫组化、蛋白质化学和生物化学领域中)。

[0083] 除非另有说明,本公开中使用的重组蛋白、细胞培养和免疫技术是采用的本领域技术人员熟知的标准方法。这些技术在整个文献中都有描述和解释,例如:J.Perbal, APractical Guide to Molecular Cloning;John Wiley和Sons(1984),J.Sambrook等人, Molecular Cloning:A Laboratory Manual;Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989),T.A.Brown(主编),Essential Molecular Biology:A Practical Approach,第1-2卷;IRL Press(1991),D.M.Glover和B.D.Hames(主编),DNA Cloning: APracticalApproach,第1-4卷;IRL Press(1995and 1996),和F.M.Ausubel等人(主编), Current Protocols in Molecular Biology;Greene Pub.Associates和Wiley-Interscience(1988,包括到目前为止的所有更新);Ed Harlow和David Lane(主编) Antibodies:ALaboratory Manual;Cold Spring Harbour Laboratory,(1988),和J.E.Coligan等人(主编)Current Protocols in Immunology;John Wiley&Sons(包括到目前为止的所有更新)。

[0084] 在本文所述的研究中,描述了经基因修饰以过表达某些目的蛋白的间充质干细胞(MSCs)的制备。更具体地说,在SIRS/败血症小鼠模型中,经基因修饰过表达酰基羧酸水解酶(AOAH)多肽以及AOAH和血管生成素-1(ANGPT1)的MSCs显示出可减轻炎症并提高存活率。这些结果证明了经基因修饰过表达AOAH的MSCs单独或与ANGPT1联合应用可能有助于预防或治疗人类SIRS/败血症。

[0085] 在第一方面,本公开涉及经基因修饰以过表达酰基羧酸水解酶(AOAH)多肽的间充质干细胞(MSC)。

[0086] 酰基羧酸水解酶(AOAH, EC 3.1.1.77)是一种由575个氨基酸组成的人蛋白(UniProtKB登录号P28039,图8A,SEQ ID NO:5),其包括23个氨基酸的氨基末端信号肽以及11个氨基酸的前肽(第24-34位残基)。其包含两个二硫键连接的亚基:一个小亚基包含第35-156位残基,一个大亚基包含第157-575位残基。AOAH主要由单核细胞-巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞和肾皮质上皮细胞产生,并选择性地从革兰氏阴性细菌脂多糖(LPS)中存在的脂质A中去除二级(酰氧基酰基连接的)脂肪酰基。其活性位点是位于Gly-Asp-Ser-(Leu) [GDS(L)]基序中第263位的丝氨酸。已证明第61、173、345和379位残基的突变对酶活性没有影响,而第263、372和419位残基的突变会降低或丧失酶活性。

[0087] 在一个实施方式中,进一步对所述MSC进行基因修饰以过表达第二多肽,优选可用于治疗SIRS/败血症的多肽。在一个实施方式中,所述第二多肽是血管生成素-1(ANGPT1)多肽。

[0088] 血管生成素-1(ANGPT1)是一种由498个氨基酸组成的人蛋白(UniProtKB登录号Q15389,图9A,SEQ ID NO:7),其包括15个氨基酸的氨基末端信号肽。其包括一个包含第81-119位残基的超聚集结构域和一个包含第153-261位残基的中心螺旋结构域(参与ANGPT1寡聚化),以及一个包含第277-497位残基的纤维蛋白原C末端结构域(参与与其靶受体的结合)。这种分泌型糖蛋白通过诱导其二聚化和酪氨酸磷酸化,结合并激活几乎仅在内皮细胞中表达的TEK/TIE2受体酪氨酸激酶(CD202B)。第119位(A119S)的突变已显示会降低与其受体的结合能力。在患有原发性先天性青光眼(PCG)的受试者中检测到第249位(K249R)的突变(与ANGPT/TEK信号传导缺陷相关),并认为会降低其生物活性。五个C-末端氨基酸(R494*)的缺失预计会使蛋白质不稳定(Thomson等,J Clin Invest,2017年12月1日;127(12):4421-4436)。

[0089] 本文所用的术语“过表达”是指经基因修饰的MSC中的AOAH和/或第二多肽(例如,ANGPT1)的表达水平高于不包含经基因修饰的对应MSC中的AOAH和/或第二多肽(例如,ANGPT1)的表达水平。在一个实施方式中,经基因修饰的MSC中的AOAH和/或第二多肽(例如,ANGPT1)的表达水平比不包含经基因修饰的对应MSC中的AOAH和/或第二多肽的表达水平高至少20%、50%、100%(2倍)、200%(3倍)、300%(4倍)、400%(5倍)、900%(10倍)、20倍、50倍或100倍。

[0090] 在一个实施方式中,AOAH蛋白和/或第二多肽(例如,ANGPT1)的过表达是通过增加MSC中内源性AOAH基因和/或编码第二多肽(例如,ANGPT1)的基因的表达实现的。这可以通过例如引入与内源性AOAH基因和/或编码第二多肽(例如,ANGPT1)的基因有转录关系(即可操作地连接到)的合适的启动子和/或转录调节(例如,增强子)序列实现。可选的,其也可以通过切除/失活抑制内源性AOAH基因和/或编码第二多肽的基因表达的转录阻抑物序列

(例如,ANGPT1)来实现。启动子和/或转录调节(例如,增强子)序列的引入和转录抑制物序列的切除/失活用以诱导MSC中内源性AOAH基因的过表达可以使用基因组编辑技术来实现。基因组编辑技术可以通过使用人工工程改造的核酸酶在基因组中插入、替换或移除DNA来修改靶细胞中的基因表达。所述核酸酶的示例可以包括锌指核酸酶(ZPNs)(Gommans等人,J.Mol Biol,354(3):507-519(2005)),转录激活因子样效应核酸酶(TALENs)(Zhang等人,Nature Biotechnol,29:149-153(2011)),CRISPR/Cas系统(Cheng等人,细胞,Res.23:1163-71(2013))和工程巨核酸酶(Riviere等人,Gene Ther,21(5):529-32(2014))。核酸酶在基因组的靶位置产生特异性双链断裂(DSB),并利用细胞内的内源性机制通过同源重组(HR)和非同源末端连接(NHEJ)修复诱导的断裂。这样的技术可用于实现MSCs中内源性AOAH和/或编码第二多肽(例如,ANGPT1)的内源基因的过表达。

[0091] 当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列为“可操作地连接”。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子与编码序列可操作地连接。一般而言,可操作连接的DNA序列是连续的,并且在必要时连接阅读框中的两个蛋白质编码区。然而,由于例如增强子通常在与启动子分开(通过几千碱基(several kilobases))时起作用,并且内含子序列可以是可变长度的,一些核酸可以是可操作连接的,但不是连续的。“转录调节序列”或“转录调节元件”是指DNA序列的通用术语,例如起始和终止信号、增强子和启动子、剪接信号、聚腺苷酸化信号等,其可诱导或控制与其可操作连接的蛋白质编码序列的转录。

[0092] 在另一个实施方式中,AOAH蛋白和/或第二多肽(例如,ANGPT1)的过表达是通过诱导重组(即,外源的)AOAH多肽和/或重组第二多肽(例如,ANGPT1)完成的。因此,在另一方面,本公开涉及一种包含或过量表达重组的(即,外源的)AOAH多肽的基因修饰的MSC。在一个实施方式中,所述基因修饰的MSC进一步包含或过量表达重组的(即,外源的)第二多肽,优选ANGPT1。

[0093] 术语“重组的”是指某物已经被重组,因此当涉及核酸时,该术语是指由连接在一起或通过分子生物学技术产生的核酸序列组成的分子。当涉及蛋白质或多肽时,术语“重组”是指并非由细胞的天然基因组合成的蛋白质或多肽分子,例如,其由通过分子生物学技术产生的重组核酸构建体(无论该合成核酸构建体是否整合到细胞的基因组中)表达。重组核酸构建体可包括与天然未连接的核酸序列连接或被操作以与天然在不同位置连接的核酸序列连接的核苷酸序列。因此,将核酸构建体称为“重组的”表示核酸分子已经使用基因工程进行了操作,即,进行了人类的干预。重组核酸构建体可以例如通过转化(例如,转导或转染)。这种重组核酸构建体可包括来源于相同宿主细胞物种的序列或来源于不同宿主细胞物种的序列,这些序列已被分离并重新引入宿主物种的细胞中。重组核酸构建体序列可以由于宿主细胞的原始转化或者由于随后的重组和/或修复事件而被整合到宿主细胞基因组中。

[0094] 在一个实施方式中,所述重组(即,外源的)AOAH多肽包含或由与图8A/SEQ ID NO:5(第35-575位残基)中描述的成熟的天然人AOAH的氨基酸序列至少50%、60%或70%相同的序列组成,并且显示了天然人AOAH的酶活性。在一些实施方式中,所述重组(即,外源的)AOAH多肽包含或由与图8A/SEQ ID NO:5(第35-575位残基)中描述的成熟的天然人AOAH的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列组成,并

且显示了天然人AOAH的酶活性。在一个实施方式中,所述重组(即,外源的)AOAH多肽包含或由与图8A/SEQ ID NO:5(第24-575位残基)中描述的天然人AOAH前体的氨基酸序列至少50%、60%或70%相同的序列组成,显示了天然人AOAH的酶活性。在一些实施方式中,所述重组(即,外源的)AOAH多肽包含或由与图8A/SEQ ID NO:5(第24-575位残基)中描述的天然人AOAH前体的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列组成,并且显示了天然人AOAH的酶活性。在一个实施方式中,所述重组(即,外源的)AOAH多肽包含或由与图8A/SEQ ID NO:5(第1-575位残基)所示全长天然人AOAH的氨基酸序列至少50%、60%或70%相同的序列组成,并且显示了天然人AOAH的酶活性。在一些实施方式中,所述重组的(即,外源的)AOAH多肽包含或由与图8A/SEQ ID NO:5(第1-575位残基)所示全长天然人AOAH的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列组成,并且显示了天然人AOAH的酶活性。

[0095] 因此,所述重组(即,外源的)AOAH多肽可以是天然的人AOAH蛋白(全长、前体或成熟形式)或其酶活性变体,其包含不显著干扰酶活性的氨基酸的缺失、取代和/或添加。在一个实施方式中,变体表现出的酶活性是天然人AOAH活性的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。在一个实施方式中,变体不包含Gly-Asp-Ser-(Leu)[GDS(L)]基序中的突变。在一个实施方式中,所述变体不包含在对应于全长天然人AOAH的第263、372或419位残基位置的突变。在一个实施方式中,所述变体包含一个或多个保守取代。保守氨基酸取代在本领域中是已知的,并且包括氨基酸的取代,即具有某些物理和/或化学性质的氨基酸被具有相同化学或物理性质的另一个氨基酸替换。例如,保守氨基酸取代可以是酸性氨基酸取代另一个酸性氨基酸(例如,Asp对Glu的替换或反之亦然),具有非极性侧链的氨基酸取代了具有非极性侧链的另一个氨基酸(例如,Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val等),碱性氨基酸取代另一种碱性氨基酸(Lys、Arg等),带有极性侧链的氨基酸取代了另一个带有极性侧链的氨基酸(Asn、Cys、Gln、Ser、Thr、Tyr等。在另一个实施方式中,变体可以包含具有至少一个非保守氨基酸取代的天然AOAH蛋白或多肽的氨基酸序列。优选地,非保守氨基酸的取代增强了变体的酶活性,使得变体的酶活性相对于天然AOAH蛋白或多肽而言增加。

[0096] 在一个实施方式中,所述MSC被编码重组(即,外源的)AOAH多肽的重组核酸转化。因此,在另一方面,本公开涉及一种经基因修饰的包含编码AOAH多肽的重组的(即,外源的)核酸的MSC。

[0097] 在一个实施方式中,所述重组(即,外源的)ANGPT1多肽包含或由与图9A/SEQ ID NO:7(第16-498位残基)中描述的成熟天然人ANGPT1的氨基酸序列至少50%、60%或70%相同的序列组成,并且显示天然人ANGPT1的生物活性,例如,结合和激活TEK/TIE2受体的能力。在一些实施方式中,所述重组(即,外源的)ANGPT1多肽包含或由与图9A/SEQ ID NO:7(第16-498位残基)中描述的成熟天然人ANGPT1的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列组成,并且显示了天然人ANGPT1的生物活性。在一个实施方式中,所述重组(即,外源的)ANGPT1多肽包含或由与图9A/SEQ ID NO:7(第1-498位残基)所示全长天然人ANGPT1的氨基酸序列至少70%相同的序列组成,并且显示了天然人ANGPT1的生物活性。在一些实施方式中,所述重组(即,外源的)ANGPT1多肽包含或由与图9A/SEQ ID NO:7(第位残基1-498)所示全长天然人ANGPT1的氨基酸序列至少75%、80%、

85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列组成,并且显示了天然人ANGPT1的生物活性。

[0098] 因此,所述重组(即,外源的)ANGPT1多肽可以是天然的人ANGPT1蛋白(全长或成熟形式)或其生物活性变体,其包含不显著干扰生物活性的氨基酸的缺失、取代和/或添加。在一个实施方式中,所述变体表现出的生物活性是天然人ANGPT1活性的至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。在一个实施方式中,所述变体不包含参与ANGPT1寡聚化的区域中的突变,例如超聚集结构域(第81-119位残基)或中心螺旋结构域(第153-261位残基)中的突变。在另一个实施方式中,所述变体不包含纤维蛋白原C-末端结构域中的突变(第277-497位残基)。在进一步的实施方式中,所述变体不包含第119位(例如,A119S)和/或第249位(例如,K249R)的突变。在另一个实施方式中,所述变体不包含五个C-末端氨基酸的缺失。

[0099] 在一个实施方式中,所述变体包含一个或多个保守取代,如上文针对AOAH的定义。优选地,非保守氨基酸的取代可以增强变体的生物活性,使得变体的生物活性相对于天然ANGPT1蛋白或多肽而言增加。

[0100] 在一个实施方式中,所述MSC被编码重组(即,外源的)ANGPT1多肽的重组核酸转化。因此,在另一方面,本公开涉及一种经基因修饰的包含编码ANGPT1多肽的重组(即,外源的)核酸的MSC。

[0101] 如本文所用,“核酸”应指任何核酸分子,包括但不限于DNA、RNA及其杂交体或修饰的变体。“外源(的)”或“重组(的)”核酸涉及导入细胞的任何核酸,其不是细胞“原始的”或“天然的”基因组的组分。外源核酸可以是整合的或非整合的,或与稳定转染的核酸相关。

[0102] 重组核酸可以是包含编码重组(即,外源的)AOAH多肽和/或第二多肽(例如,ANGPT1)的DNA或RNA分子。将重组核酸导入细胞的方法是本领域熟知的。此类方法的示例包括但不限于使用脂质、蛋白质、颗粒或其他能够促进核酸的细胞转化、电穿孔的分子。然而,MSC也可以与编码AOAH和/或第二多肽(例如,ANGPT1)的核酸在体内进行接触,比如通过基因枪。

[0103] 在一个实施方式中,编码AOAH的重组核酸包含与编码图8B/SEQ ID NO:6所示的人AOAH的全长、前体或成熟形式的核苷酸序列至少70%相同的核苷酸序列。在一些实施方式中,编码AOAH的重组核酸包含与图8B/SEQ ID NO:6中描述的编码人AOAH的全长、前体或成熟形式的核苷酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的核苷酸序列。在另一个实施方式中,编码AOAH的重组核酸包含编码图8B/SEQ ID NO:6所示的人AOAH的全长、前体或成熟形式的核苷酸序列。

[0104] 在一个实施方式中,编码AOAH的核酸包含编码人AOAH的密码子优化的核苷酸序列。在不受任何特定理论或机制的束缚的情况下,核苷酸序列的密码子优化可以提高mRNA转录物的翻译效率。核苷酸序列的密码子优化可能涉及用一个天然密码子替换编码相同氨基酸的另一个密码子,但可以通过细胞内更容易获得的tRNA翻译,从而提高翻译效率。核苷酸序列的优化也可以减少干扰翻译的二级mRNA结构的产生,从而提高翻译效率。在这点上,编码AOAH的核酸可以包含与图6B/SEQ ID NO:1(第7-1734位核苷酸)中描述的密码子优化的核苷酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的序列。

[0105] 在一个实施方式中,所述编码ANGPT1的重组核酸包含与图9B-9C/SEQ ID NO:8中

描述的编码人ANGPT1的全长、前体或成熟形式的核苷酸序列至少70%相同的核苷酸序列。在一些实施方式中,所述重组核酸包含与图9B-9C/SEQ ID NO:8中描述的编码人ANGPT1的全长、前体或成熟形式的核苷酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的核苷酸序列。

[0106] 在一个实施方式中,所述编码ANGPT1的核酸包含编码人ANGPT1的密码子优化的核苷酸序列。

[0107] 合成所述优化密码子核酸的方法、工具、平台和服务在本领域是公知的,例如GenScript的OptimumGene™平台,Integrated DNA Technologies的密码子优化工具,ThermoFisher Scientific的GeneOptimizer™平台,NCBI的OPTIMIZER (Nucleic Acids Res.2007年7月;35 (Web Server issue):W126-W131)、线上密码子优化(COOL) (《生物信息学》,第30卷,第15期,2014年8月1日,第2210-2212页)等。

[0108] 在一个实施方式中,所述重组核酸存在于载体或质粒中,即,是一种重组表达载体或质粒。因此,在另一方面,本公开涉及包含重组表达载体的基因修饰的MSC,所述重组表达载体包含编码本文所述A0AH多肽的核酸。在一个实施方式中,所述基因修饰的MSC还包含重组表达载体,所述重组表达载体包含编码本文所述的ANGPT1多肽的核酸。在一个实施方式中,所述编码A0AH和ANGPT1的核酸存在于不同的重组表达载体中。在另一个实施方式中,所述编码A0AH和ANGPT1的核酸存在于相同的重组表达载体中。

[0109] 重组表达载体或质粒可以是包含上述重组核酸的任何合适的重组表达载体或质粒。合适的载体包括设计用于在MCS中表达目的基因的载体,其是本领域熟知的。在一个实施方式中,所述重组表达载体或质粒是小质粒(miniplasmid)。所述小质粒是小的(~4kb)环状质粒衍生物,已从所有原核载体部分(即,它们不含细菌DNA序列)中解放出来,这些原核部分被用作转基因载体,用于哺乳动物细胞的基因修饰。本公开还记载了小质粒及其应用,例如,用作微环或小质粒DNA载体:非病毒基因和病毒基因转移的未来,Martin Schleef博士(主编),2013年5月,Wiley-Blackwell,258页。

[0110] 在一些实施方式中,所述重组表达载体是病毒载体。转基因病毒已被广泛应用于将基因传递到包括MSCs在内的干细胞中。本文所述用于MSCs基因修饰的优选病毒载体涉及逆转录病毒载体,特别是 γ 逆转录病毒载体。 γ 逆转录病毒(有时称为哺乳动物C型逆转录病毒)是慢病毒分支的姐妹属,也是逆转录病毒家族的正逆转录病毒亚科的成员。鼠白血病病毒(MLV或MuLV)、猫白血病病毒(FeLV)、异嗜性鼠白血病病毒(XMRV)相关病毒和长臂猿白血病病毒(GALV)都属于 γ 逆转录病毒属。本领域技术人员知晓在MSCs的基因修饰中使用 γ 逆转录病毒所需的技术。例如,Maetzig等人(γ 逆转录病毒载体:生物学、技术和应用,2001,Viruses 3(6):677-713)描述的载体或类似的可以使用的载体。例如,鼠白血病病毒(MLV),一种简单的 γ -逆转录病毒,在产生 γ -逆转录病毒修饰的MSCs和在将所述MSC施用给受试者后产生的治疗性转基因的表达的背景下,可被转化为遗传治疗的有效载体。转基因病毒已被广泛应用于将基因传递到干细胞中,可使用的病毒包括腺病毒,或RNA病毒如慢病毒,或其他逆转录病毒。腺病毒已经被用来产生一系列用于基因转移细胞工程的载体。最初的腺病毒载体是通过删除E1基因(病毒复制所需)产生的,其是具有4kb克隆能力的载体。额外删除E3(负责宿主免疫反应)使得该载体具有8kb的克隆能力。其他产物还包含E2和/或E4缺失的后代。慢病毒是逆转录病毒科病毒(M.Scherr等人,Curr Gene Ther.2002年2月;2

(1):45-55)。慢病毒载体是通过删除除LTRs和顺式作用包装信号之外的整个病毒序列产生的。所得载体的克隆能力约为8kb。这些载体与逆转录病毒载体的一个区别特征是它们转导分裂和非分裂细胞以及终末分化细胞的能力。

[0111] 重组表达载体或质粒可包含调控序列,例如转录和翻译起始密码子和终止密码子,这些序列对适当引入载体的宿主(例如动物,例如人)的类型具有特异性,并考虑该载体是基于DNA还是RNA的。重组表达载体或质粒可以包括一个或多个标记基因,其允许对转化或转染的宿主进行选择。标记基因包括杀生物剂抗性,例如,对抗生素、重金属等的耐药性,在营养缺陷型宿主中互补以提供原养型等。用于重组表达载体的合适的标记基因包括:例如新霉素G418抗性基因、潮霉素抗性基因、四环素抗性基因和氨苄青霉素抗性基因等。重组表达载体或质粒可以包含天然或标准启动子,其可操作地连接到编码AOAH的核酸和/或第二多肽(例如,ANGPT1),并在MSCs中具有功能。启动子的选择,例如,强壮的、虚弱的、可诱导的、组织特异性的和发育特异性的,在本领域技术人员的普通技能范围内。类似地,核苷酸序列与启动子的结合也在本领域技术人员的普通技能范围内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,例如,巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子或在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。启动子可以包含增强转录因子结合的各种基序,例如起始基序(INR)、十基序元件(MTE)和下游启动子元件(DPE)基序(参见,例如,Martinez, Transcription.2012;3(6):295-299)。重组表达载体可被设计用于瞬时表达、稳定表达或两者兼有。此外,重组表达载体可被制备用于组成型表达或诱导型表达。在本公开的上下文中有用的载体可以是“裸”核酸载体(即,具有很少或没有包封它们的蛋白质、糖和/或脂质的载体),或与其他分子复合的载体。可以适当地与载体结合的其他分子包括但不限于病毒外壳、阳离子脂质、脂质体、多胺、金颗粒和靶向部分,例如靶向细胞分子的配体、受体或抗体。

[0112] 本公开包括任何给定的基因递送方法,并且优选涉及如上所述的病毒或非病毒载体,以及生物或化学转染方法。这些方法可以在所用系统中产生稳定或瞬时的基因表达。如上所述,非病毒方法包括常规质粒转移和通过使用基因组编辑技术进行靶向基因整合的应用。这些载体转化的代表性方法具有既高效又在整合中经常具有位置特异性的优点。将载体引入细胞的物理方法是本领域技术人员公知的。一个示例涉及电穿孔,其依赖于使用短暂的高压电脉冲,通过克服电容从而在膜中产生瞬时孔。这种方法的一个优点是,它可用于大多数细胞类型中的稳定和瞬时基因表达。可选的方法还涉及使用脂质体、蛋白转导结构域或其他合适的试剂促进核酸进入细胞。适当的方法是本领域技术人员已知的,并且不旨在限制本公开的实施方式。

[0113] 间充质干细胞(MSCs,也称为间充质基质细胞)是在骨髓、血液、牙髓细胞、脂肪组织、皮肤、脾脏、胰腺、脑、肾、肝、心脏、视网膜、脑、毛囊、肠、肺、淋巴结、胸腺、骨、韧带、肌腱、骨骼肌、真皮和骨膜中发现的细胞。MSC能够分化为中胚层、内胚层和外胚层等不同的生殖系。因此,MSCs能够分化为大量细胞类型,包括但不限于脂肪、骨、软骨、弹性、肌肉和纤维结缔组织。MSCs进入的特定谱系承诺和分化途径取决于各种影响,包括机械影响和/或内源性生物活性因子,如生长因子、细胞因子和/或宿主组织建立的局部微环境条件。因此,骨髓间充质干细胞是非造血祖细胞,其分裂产生子细胞,所述子细胞或者是干细胞,或者是前体细胞,所述前体细胞随时间将不可逆地分化产生表型细胞。MSCs的示例包括间充质前体细

胞 (MPCs)。

[0114] 已知在给药MSCs后患者表现出免疫逃避特性。本研究显示,在同种异体供体材料移植的情况下,MSCs表现出有益的免疫调节效应(Le Blanc等人,Lancet,2004:363,第1439页),从而减少潜在致病的同种异体反应性和排斥。MSCs的治疗性递送可通过全身注射进行,然后MSC归巢(homing)并植入损伤部位(Kidd等人,Stem Cells,2009:27,第2614页)。

[0115] 在一些方面,MSCs可以是子代细胞(也可以称为扩增细胞)。子代细胞可以由干细胞的体外培养产生。根据培养条件(包括培养基中刺激因子的数量和/或类型)、传代次数等,本公开的扩增细胞可以具有多种表型。在某些实施方式中,子代细胞在来自亲代群体的约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9或约10次传代后获得。然而,子代细胞可在来自亲代群体的任何数目的传代后获得。并且子代细胞可以通过在合适的培养基中培养获得。

[0116] 在一个实施方式中,子代细胞是如WO 2006/032092中所述的多能扩增的MSC子代(MEMPs)。WO 01/04268和WO 2004/085630中描述了制备可衍生后代的MSC富集群体的方法。在体外环境中,MSCs很少以绝对纯制剂的形式存在,通常与组织特异性定型细胞(TSCCs)等其他细胞一起存在。WO 01/04268涉及以约0.1%~90%的纯度水平从骨髓收获这样的细胞。包含衍生子代的MSC的群体可从组织来源直接收获,或者可选择地,其可以是已经离体扩增的群体。

[0117] 例如,子代可以从收获的、未扩增的、基本纯化的MSC群体获得,其包含至少约0.1%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80或95%的它们存在的群体的总细胞。例如,可通过选择对通常在MSCs上表达的至少一种标志物如CD29、CD44、CD90、CD49a-f、CD51、CD73(SH3)、CD105(SH2)、CD106、CD166和Stro-1呈阳性和/或对标志物如CD45、CD34、CD14或CD11b、CD79a或CD19和HLA-DR呈阴性的细胞来达到该水平。

[0118] 例如,子代可以从收获的、未扩增的、基本纯化的MSC群体获得,其包含至少约0.1%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80或95%的它们存在的群体的总细胞。例如,可通过选择对至少一种选自CD29、CD44、CD90、CD49a-f、CD51、CD73(SH3)、CD105(SH2)、CD106、CD166和Stro-1的标志物呈阳性的细胞来达到该水平。

[0119] MSC起始群体可以来源于WO 01/04268或WO 2004/085630中所述的任何一种或多种组织类型,即骨髓、牙髓细胞、脂肪组织和皮肤,或者可能更广泛地来源于脂肪组织、牙齿、牙髓、皮肤、肝、肾、心脏、视网膜、脑、毛囊、肠、肺、脾、淋巴结、胸腺、胰腺、骨、韧带、骨髓、腱和骨骼肌。

[0120] MEMPs与新收获的MSCs的区别在于它们对Stro-1标志物呈阳性,对碱性磷酸酶(ALP)标志物呈阴性。相反,新鲜分离的MSCs对Stro-1和ALP均呈阳性。在本公开的优选实施方式中,至少15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的施用的细胞具有表型Stro-1⁺,ALP⁻。

[0121] 细胞“阳性”(也称“+”)的给定标记物是指其可以是该标记物的低(lo或暗)或高(亮,bri)表达物,这取决于该标记物在细胞表面上存在的程度,其中这些术语与细胞颜色分选过程中使用的荧光或其他颜色的强度相关。lo(或暗淡或阴暗)和bri的区别将通过上下文中的用于正在分选中的特定细胞群的标记进行理解。细胞“阴性”(或“-”)的给定标记物并不意味着该标记不被该细胞表达。其意味着该标记由该细胞以相对非常低的水平表达,并且当被可检测地标记时可以产生非常低的信号。

[0122] 在一个实施方式中,所述细胞取自患有SIRS或败血症的患者,或未患有SIRS或败血症的受试者,经基因修饰以过表达AOAH(和任选的第二多肽,例如ANGPT1),且任选地使用标准技术在体外培养,并作为自体或同种异体移植物施用于需要治疗的患者。在另一个实施方式中,可以使用一种或多种建立的人细胞系的细胞。在本公开的另一个有用的实施方式中,使可以用非人动物(或如果患者不是人,则来自另一物种)的细胞。

[0123] 本技术可以使用来自任何非人动物物种的细胞来实施,包括但不限于非人类灵长类细胞、有蹄类、犬科、猫科、兔形目、啮齿类、鸟类和鱼类细胞。可进行本公开的灵长类动物细胞包括但不限于黑猩猩、狒狒、食蟹猴和任何其他新大陆或旧大陆猴的细胞。可进行本公开的有蹄类细胞包括但不限于牛、猪、绵羊、山羊、马、水牛和野牛的细胞。可进行本公开的啮齿动物细胞包括但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠和沙鼠细胞。可进行本公开的兔形目物种的示例包括家养兔、长腿大野兔、野兔、白尾灰兔、白靴兔和鼠兔。鸡(*Gallus gattus*)是本公开可使用的鸟类的一个示例。

[0124] MSCs可储存储存。用于保存和储存真核细胞,特别是哺乳动物细胞的方法和方案是本领域公知的(参见,例如,Pollard,J.W.and Walker和Walker,J.M. (1997)《基本细胞培养方案》,第二版,Humana出版社,Totowa,N.J;Freshney,R.I. (2000)《动物细胞培养》,第四版,Wiley-Liss,Hoboken,N.J)。保持分离的干细胞(如间充质干细胞/祖细胞或其后代)的生物活性的任何方法可与本公开内容结合使用。在一个优选的实施方式中,通过使用低温保存来维持和储存细胞。

[0125] MSCs可通过多种技术获得。例如,可以使用多种细胞分选技术,通过这些技术,参考与细胞-抗体复合物相关的性质或附着于抗体的标记,将细胞物理分离。该标签可以是磁性粒子或荧光分子。抗体可以交联,使得它们形成多个细胞的聚集体,这些细胞可以通过它们的密度而分离。或者,抗体可附着于所需细胞所附着的固定基质。

[0126] 本文所用的“培养基”既包括(a)含有用于培养MSC的典型组分如氨基酸、葡萄糖和各种盐的培养基,含有或不含MSC,也包括(b)从培养基中分离的组合物,包括包含培养期间从MSC释放的组分的组合物。培养基可以包含固体、液体、气体或相和材料的混合物的组分。所述培养基成分包括但不限于琼脂、琼脂糖、明胶和胶原基质。“培养基”包括用于细胞培养的材料,即使其尚未与细胞接触。例如,制备用于细菌培养的富营养液体可以是培养基。

[0127] 在一个实施方式中,在培养/扩增期间或之后(和在给受试者施用/使用之前),使MSCs与一种或多种试剂接触或暴露于一种或多种试剂,以赋予它们所需的性质,例如,以诱导抗炎介质的表达/分泌和/或抑制促炎介质的表达/分泌。例如,暴露于低浓度前列环素的MSCs(例如,曲前列环素),例如约10 μ g/mL的曲前列环素,已经展现出更多的某些抗炎介质(例如IL-10、IL-13、IDO、iNOS、HLA和TGF β)的分泌以及减少的促炎介质(例如TNF α 和IL-4)的分泌(参见,例如,WO 2018/080990)。这种暴露于一种或多种药物的时间可以是诱导所需效果的任何合适的时间,例如至少6h、12h、18h、24h、36h或48h。

[0128] 另一方面,本公开涉及本文所述的基因修饰的MSC,或包含所述MSC的药物组合物在药物中的应用。在一个实施方式中,所述药物用于预防或治疗受试者的SIRS,例如由败血症引起的SIRS。本公开还涉及预防或治疗系统性炎症反应综合征(SIRS)的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用有效剂量的本文所述的基因修饰的MSC或包含所述MSC的药物组合物。本公开还涉及本文所述的基因修饰的MSC或包含所述MSC的药物组合物在预防或

治疗受试者的SIRS中的用途。本公开还涉及本文所述的基因修饰的MSC或包含所述MSC的药物组合物在制备用于预防或治疗受试者的SIRS的药物中的用途。

[0129] 如本文所用,术语“治疗(treating)”、“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”包括消除、改善、缓解或减轻疾病或病症或其一种或多种症状,无论所述疾病或病症是否被认为是“治愈”或“痊愈”的,也无论所有症状是否被解决。该术语还包括减少或预防疾病或病症或其一种或多种症状的进展,阻碍或预防疾病或病症或其一种或多种症状的潜在机制,以及实现任何治疗和/或预防益处。

[0130] 如本文所用,术语“预防(preventing)”、“预防(prevent)”或“预防(prevention)”包括减少受试者中疾病或病症或其一种或多种症状的发生和/或严重程度(例如,有患SIRS/败血症风险的受试者),或延迟受试者中疾病或病症的一种或多种症状的发作(例如,有患SIRS/败血症风险的受试者)。

[0131] 术语“系统性炎症反应综合征”或“SIRS”是指对诸如感染、创伤、烧伤、胰腺炎或各种其他损伤的损伤有反应的全身性炎症相关的病症,并且导致多器官功能障碍;急性肺损伤(ALI)代表了最常见和最早的器官衰竭。SIRS可能是各种致病事件的结果,其中败血症是最常见和最致命的原因。SIRS可通过两种或两种以上的下述症状进行识别,包括症状发热或体温过低、心动过速、呼吸急促和白细胞计数变化等。

[0132] 在一个实施方式中,SIRS与败血症相关或由败血症引发。术语“败血症”用于许多可能具有感染性(例如病毒、细菌和/或真菌)病因的疾病、病症和/或综合征。它包括败血症(通常被定义为对感染过程有反应的“SIRS”)、严重败血症(即伴随着败血症诱导的器官功能障碍或组织灌注不足的败血症,其本身可能表现为低血压、乳酸升高或尿量减少)和败血性休克(严重败血症加持续低血压,尽管例如给予静脉内液体)。

[0133] 术语“败血症”最常用于由“细菌败血症”引起的疾病、病症和/或综合征。细菌败血症可能由血液中的细菌引起,有时也称为“菌血症”或“败血症(septicemia)”。术语“败血症”还可包括由血液中细菌组分如LPS、毒素和/或膜片段的存在引起或促成的疾病和/或病症。这类成分可能源于其他组织和/或器官中存在的原发性感染,例如肺、脑、皮肤、尿路、骨盆和/或腹部存在的感染。败血症是一种非常严重的疾病,偶尔会导致多器官衰竭和死亡。可能存在许多与每种类型的败血症相关的病理学和/或症状,并且这些在下文中将被统称为“败血症相关病理学”。例如,败血症相关病理可包括例如发热、心率增加、呼吸率增加和/或低血压。败血症病理基础和许多相关症状和结果的主要机制是加剧的、扩大的和/或不适当的宿主免疫应答。这种加剧的免疫反应(即机体对感染的反应)会导致宿主组织损伤和/或器官损伤/衰竭。加重的或不适当的免疫应答可能包括先天性免疫应答的失调以及某些促凝血细胞因子(包括,例如,肿瘤坏死因子、白细胞介素-1(IL-1)和白细胞介素-6(IL-6))的产生和/或过度产生。

[0134] 在一个实施方式中,所述治疗可以减少SIRS或败血症的一种或多种症状。在一个实施方式中,所述治疗降低了受试者中一种或多种促炎细胞因子,如IL-6、IL-10、IL-12、MIP-1 α (CCL3)、嗜酸性粒细胞趋化因子、G-CSF、KC和/或MCP-1的水平(例如,血浆水平)。在另一个实施方式中,所述治疗降低了IL-10、MIP-1 α 和MCP-1中的至少一种细胞因子的水平(例如,血浆水平),并且优选地,所述治疗降低了IL-10、MIP-1 α 和MCP-1的水平(例如,血浆水平)。

[0135] 如本文所用,术语“受试者”(本文也称为“患者”)包括温血动物,优选哺乳动物,包括人。在一个优选的实施方式中,所述受试者是灵长类动物。在更优选的实施方式中,所述受试者是人。在一个实施方式中,所述受试者患有SIRS或败血症的一种或多种症状。在另一个实施方式中,所述受试者有发生SIRS或败血症的风险。

[0136] 在一个实施方式中,本文所述的遗传工程化MSCs存在于组合物中,优选药物组合物。因此,在另一方面,本公开提供了包含本文所述的遗传工程化MSCs的药物组合物。在一个实施方式中,所述药物组合物包含治疗有效剂量的本文所述的遗传工程化MSCs。

[0137] 在一些实施方式中,所述药物组合物还包含至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断的范围内,适合用于与人和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。本文所用的短语“药学上可接受的载体或赋形剂”是指药学上可接受的材料、组合物或载体,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料。

[0138] 药学上可接受的载体或赋形剂包括盐水、水性缓冲溶液、溶剂和/或分散介质。这种载体或赋形剂的使用是本领域公知的。溶液优选是无菌的流体,并且以易于注射的状态存在。优选地,所述溶液在生产和储存条件下是稳定的,并且通过使用防腐剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)进行保存以抵抗微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。

[0139] 可用作药学上可接受的载体或赋形剂的材料和溶液的一些示例包括:糖(如乳糖、葡萄糖和蔗糖)、淀粉(例如玉米淀粉和马铃薯淀粉)、纤维素及其衍生物(如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素)、粉状黄蓍胶、麦芽、明胶、滑石、润滑剂(如可可脂和栓剂蜡)、油类(如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油)、二醇(如丙二醇、多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇)、酯(如油酸乙酯和月桂酸乙酯)、琼脂、缓冲剂(例如氢氧化镁和氢氧化铝)、海藻酸、无热原的水、等渗盐水、林格氏溶液、乙醇、pH缓冲溶液、聚酯(聚碳酸酯和/或聚酐)、抗氧化剂、抗菌剂和其他用于药物制剂的无毒相容物质。

[0140] 可用于本发明方法的药物组合物可包含聚合物载体或细胞外基质。多种生物或合成固体基质材料(例如,固体支持物基质、生物粘合剂或敷料剂和生物/医疗支架)适用于本发明。所述基质材料优选为医学上可接受的用于体内应用的材料。这种医学上可接受和/或生物学上或生理学上可接受或相容的材料非限制性示例包括但不限于可吸收和/或不可吸收的固体基质材料,例如小肠粘膜下层(SIS),例如猪源(和其他SIS来源);交联或非交联的藻酸盐、水胶体、泡沫、胶原凝胶、胶原海绵、聚乙醇酸(PGA)网、聚肌动蛋白(PGL)网、羊毛、泡沫敷料、生物粘合剂(例如,纤维蛋白胶和纤维蛋白凝胶)和在一层或多层中的死区表皮皮肤等价物。

[0141] 合适的聚合物载体包括由合成物或天然聚合物以及聚合物溶液形成的多孔网或海绵。基质的一种形式是聚合物网或海绵,另一种是聚合物水凝胶。可使用的天然聚合物包括蛋白质,如胶原蛋白、白蛋白和纤维蛋白,和多糖(如藻酸盐)和透明质酸的聚合物。合成聚合物包括可生物降解和不可生物降解的聚合物。生物可降解聚合物的示例包括羟基酸的聚合物,如聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)和聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)、聚原酸酯、聚酐、聚膦腈(polyphosphazenes)及其组合。不可生物降解的聚合物包括聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸

酯、乙烯醋酸乙烯酯和聚乙烯醇。

[0142] 可形成具有延展性的离子或共价交联水凝胶的聚合物用于包封细胞。水凝胶是一种当有机聚合物(天然或合成)通过共价键、离子键或氢键交联,形成三维开放晶格结构,截留水分子形成凝胶时形成的物质。

[0143] 可用于形成水凝胶的材料示例包括多糖(如藻酸盐)、聚膦腈和聚丙烯酸酯,它们是离子交联的或嵌段的共聚物如PluronicTM或TetronicsTM,聚环氧乙烷-聚丙二醇嵌段共聚物,它们分别是通过温度或pH交联。其他材料包括蛋白质(如纤维蛋白)、聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮)、透明质酸和胶原。

[0144] 通常,这些聚合物至少部分可溶于水溶液,例如水、缓冲盐溶液或具有带电侧基的含水醇溶液或其单价离子盐。具有可与阳离子反应的酸性侧基的聚合物的示例是聚(膦腈)、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、丙烯酸和甲基丙烯酸的共聚物、聚(乙酸乙烯酯)和磺化聚合物,例如磺化聚苯乙烯。也可以使用具有通过丙烯酸或甲基丙烯酸与乙烯基醚单体或聚合物反应形成的酸性侧基的共聚物。酸性基团的示例有羧酸基团、磺酸基团、卤代(优选氟化的)醇基团、酚羟基和酸性羟基。具有可与阴离子反应的碱性侧基的聚合物的示例有聚(乙烯基胺)、聚(乙烯基吡啶)、聚(乙烯基咪唑)和一些亚氨基取代的聚膦腈。聚合物的铵盐或季铵盐也可以由主链氮或侧链亚氨基形成。碱性侧基的示例是氨基和亚氨基。

[0145] 在一些实施方式中,所述药物组合物可以包含至少一种另外的治疗剂。例如,所述组合物可包含有助于治疗炎症或疼痛的止痛剂,或防止用所述组合物治疗的部位感染的抗感染剂。更具体地,有用的治疗剂的非限制性示例包括以下治疗类别:镇痛药,例如非甾体抗炎药、阿片样物质激动剂和水杨酸盐;抗感染药物,如抗真菌药物、抗过氧化物酶药物、抗生素、氨基糖苷类抗生素、抗真菌药物、头孢菌素类抗生素、大环内酯类抗生素、杂类β-内酰胺类抗生素、青霉素类抗生素、喹诺酮类抗生素、磺胺类抗生素、四环素类抗生素、抗分枝杆菌药物、抗结核抗分枝杆菌药物、抗原生动物、抗疟疾抗原生动物、抗病毒剂、抗逆转录病毒剂、结痂剂、抗炎剂、皮质类固醇抗炎剂、止痒剂/局部麻醉剂、局部抗感染药物、抗真菌局部抗感染药物、抗病毒局部抗感染药物;电解质和肾脏药物,例如酸化剂、碱化剂、利尿剂、碳酸酐酶抑制剂利尿剂、袢利尿剂、渗透利尿剂、保钾利尿剂、噻嗪类利尿剂、电解质替代物和尿酸类药物;酶,例如胰酶和溶血栓酶;胃肠药物,例如止泻剂、胃肠抗炎剂、胃肠抗炎剂、解酸抗溃疡剂、胃酸泵抑制剂抗溃疡剂、胃粘膜抗溃疡剂、H2阻断剂抗溃疡剂、溶胆剂、消化剂、催吐剂、泻药和粪便软化剂和促动力剂;全身麻醉药,如吸入麻醉药、卤代吸入麻醉药、静脉麻醉药、巴比妥类静脉麻醉药、苯二氮卓类静脉麻醉药和阿片激动剂静脉麻醉药;激素和激素调节剂,如堕胎药、肾上腺剂、皮质类固醇肾上腺剂、雄激素、抗雄激素、免疫生物剂,如免疫球蛋白、免疫抑制剂、类毒素和疫苗;局部麻醉剂,例如酰胺局部麻醉剂和酯局部麻醉剂;抗炎剂包括皮质类固醇抗炎剂、金化合物抗炎剂、免疫抑制抗炎剂、非甾体抗炎药(NSAIDs)、水杨酸盐抗炎剂、矿物质;和维生素,如维生素A、维生素B、维生素C、维生素D、维生素E和维生素K。

[0146] 根据本公开的一个实施方式,所述组合物可以与至少一种用于SIRS或败血症的其他药物共同给药。例如,所述药物组合物可以与例如抗生素、静脉注射液、皮质类固醇、胰岛素、止痛药、镇静剂和/或血管升压类药物共同给药。本公开的预防/治疗剂和/或组合物的组合可以施用或共同施用(例如,连续地、同时地、在不同的时间)以任何常规剂型给药。在

本公开的上下文中,所述共同施用是指在协同治疗的过程中施用一种以上的治疗剂以改善临床结果。这种共同给药也可以是同延的,即在重叠的时间段内发生。例如,第一种药物可以在给予第二种活性药物之前、同时、之前和之后、或之后给予患者。在一个实施方式中,所述药物可以组合/配制成单一组合物,然后同时给药。

[0147] 可用于本公开中方法的组合物可包括细胞培养组分,例如,包括氨基酸、金属、辅酶因子以及其他细胞小群体的培养基,例如,其中一些可能由干细胞的后续分化产生。

[0148] 可用于本发明方法的组合物可通过例如从培养基中沉淀出受试细胞并将其重新悬浮在所需溶液或材料中来制备。所述细胞可以通过例如离心、过滤、超滤等步骤从培养基中沉淀和/或排出。

[0149] 本领域技术人员可以容易地确定组合物中的MSCs和任选的载体的量以及在本公开中的方法中施用的MSCs和任选的载体的量。当然,对于施用给动物或人的任何组合物,以及对于任何特定的施用方法,优选进行毒性测定,例如通过在合适的动物模型中确定致死剂量(LD)和LD₅₀,所述动物可以是啮齿动物,例如小鼠;以及引起适当反应的组合物的剂量、其中的组分浓度和组合物的施用时间。根据本领域技术人员的知识、本公开和本文引用的文献,上述测定过程并不需要过度的实验来确定。并且,连续给药的时间无需过多实验即可确定。

[0150] 在一个实施方式中,给予受试者下列剂量和剂量范围的MSCs):约 1×10^2 ~约 1×10^8 细胞/千克体重;(ii)约 1×10^3 ~约 1×10^7 个细胞/千克体重;(iii)约 1×10^4 ~约 1×10^6 个细胞/千克体重;(iv)约 1×10^4 ~约 1×10^5 个细胞/千克体重;(v)约 1×10^5 ~约 1×10^6 个细胞/千克体重;(vi)约 5×10^4 ~约 0.5×10^5 个细胞/千克体重;(vii)约 1×10^3 个细胞/千克体重;(viii)约 1×10^4 个细胞/千克体重;(ix)约 5×10^4 个细胞/千克体重;(x)约 1×10^5 个细胞/千克体重;(xi)约 5×10^5 个细胞/千克体重;(xii)约 1×10^6 个细胞/千克体重;和(xiii)约 1×10^7 个细胞/千克体重。设想的人体重量包括但不限于约5千克、10千克、15千克、30千克、50千克、约60千克、约70千克、约80千克、约90千克、约100千克、约120千克和约150千克。所述MSCs可以以丸剂形式给药,即在短时间内注射所有细胞,或者可以通过连续给药(例如,输注)在长时间内输注少量细胞,或者在一段时间内多次给予有限大小的丸剂。

[0151] 可用于本发明方法的组合物尤其可通过局部注射进行给药,包括导管给药、全身注射、局部注射、静脉内注射、子宫内注射或胃肠外给药。当施用本文所述的治疗组合物(例如,药物组合物),它通常被配制成单位剂量的可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0152] 实施例

[0153] 通过以下非限制性实施例对本公开进行更详细的说明。

[0154] 实施例1:在MSC中AOAH表达质粒的构建

[0155] 材料:AOAH基因由GenScript合成,限制性内切酶NheI、SalI、BamHI、EcoRI购自New England Biolabs,T4 DNA连接酶购自New England Biolabs。

[0156] 方法:AOAH基因合成后,通过基因测序对基因序列进行检测。然后用限制性内切酶在37℃切割目标基因2h,并将切割后的目的基因用T4 DNA连接酶插入亲本克隆载体中,在16℃孵育过夜。将亲本AOAH质粒转化到感受态大肠杆菌中用于扩增和小质粒的制备。

[0157] 构建了三种不同的质粒并测定了AOAH在MSC中的表达,即包含EF-1启动子控制下的AOAH编码序列的质粒(质粒#2,图1A),包含在CMV启动子控制下的AOAH编码序列的质粒

(质粒#3,图1B),和另一种在CMV启动子/增强子控制下包含AOAH编码序列的质粒(质粒#1,图1C)。MCS用不同质粒进行转染,并用Western Blot法检测细胞裂解液中AOAH的细胞内表达水平。结果如图2所示,其中显示用质粒#1转染的MCS表达AOAH的水平比分别用质粒#2和质粒#3转染的MCS高3.6和6.2倍。因此选择质粒#1进行后续实验。

[0158] 实施例2:MSC中AOAH的表达和分泌

[0159] 材料:抗AOAH抗体购自ThermoFisher,抗AOAH ELISA试剂盒购自MyBioSource。

[0160] 方法:将MSC以10000/cm²的密度接种于T75培养瓶中。接种后16~20h,用质粒#1(~1μg/100,000个细胞)转染细胞。转染后,将细胞培养24h。使用40μg细胞裂解物进行Western Blot检测。收获培养基,采用ELISA法进行检测。

[0161] 为了确定AOAH在MSC中过表达的持续时间,将#1质粒转染到MSC中,并对转染后24h、48h和72h收获的细胞裂解物进行Western Blot检测。结果发现与转染后24h相比,72h时细胞内AOAH(前体和成熟形式)的总水平略低(图3A)。然而,相对于转染后24h,成熟形式的AOAH的比例(相对于总AOAH)在72h较高(~45%对~24%,图3B)。因此,用质粒#1转染MSC将使得这些细胞中成熟AOAH的持续表达。结果如图3C所示,其中显示在用质粒#1转染的MSC的培养基中AOAH的水平从24h到72h逐渐增加。

[0162] 实施例3:在败血症的小鼠模型中施用用编码AOAH的质粒#1转染的MSC的效果

[0163] 材料:10周龄C57BL/6雌性小鼠购自Charles River。LPS购自Sigma,Plasma-Lyte A购自Baxter,人白蛋白购自Sigma,小鼠细胞因子Bio-Plex试剂盒购自Bio-Rad。Bio-Plex™200System和Bio-Plex Pro™^{II}Wash Station均购自Bio-Rad。

[0164] 方法:败血症由内毒素(LPS)或致病性大肠杆菌引起。LPS用无菌生理盐水稀释,以15mg/kg的剂量给小鼠腹腔注射。冷冻保存的致病性大肠杆菌用无菌盐水溶液进行稀释,并以每只小鼠 1.2×10^6 CFU的剂量腹膜内(IP)注射到小鼠体内。IP注射后1h,通过颈静脉内注射递送细胞,剂量为每只小鼠250,000个细胞。在内毒素诱导的败血症研究中,LPS注射后20h,用预装有50μl 50mM EDTA的注射器从每只小鼠中抽取500μl血液。将针头从注射器中取出,并将血液轻轻倒入一个微量离心管中。血液在4℃下以1700×g的转速离心10min。将上层血浆层转移到新的微量离心管中,并在4℃下以11,000μg离心5min,以去除任何残留的污染碎片/血小板。离心后将血浆转移到新的微量离心管中,并在-80℃冷冻用以保存或测定细胞因子水平。根据Bio-Plex的使用说明测定细胞因子水平。

[0165] 在LPS诱导的内毒素血症(败血症的小鼠模型)中,检测了质粒#1转染的MSC是否能减轻炎症。腹腔注射LPS诱导内毒素血症,LPS注射后1h用NT002、未转染的MSC或生理盐水溶媒对照处理小鼠。在LPS注射后20h评估几种促炎细胞因子和趋化因子的血浆水平。结果如图4B-4I所示,其中NT002的施用可减弱由于LPS注射诱导的某些促炎细胞因子和趋化因子导致的血浆水平升高,因此提供了MSC过表达AOAH可用于治疗败血症诱导的系统性炎症反应综合征(SIRS)或降低其严重程度的证据。

[0166] 在致病性大肠杆菌诱导的败血症研究中,在细菌接种后观察动物5天以测定存活率(图5A)。结果如图5B所示,其中NT002的施用保护小鼠免于致病性大肠杆菌接种诱导的高死亡率(~50%)。

[0167] 实施例4:在败血症的小鼠模型中施用过量表达AOAH和ANGPT1的MSC的效果

[0168] 用质粒#4转染MSCs(图6A),其包含编码hAOAH的密码子优化序列(图6B)和编码

hANGPT1的序列(图6C)用以诱导AOAH和ANGPT1的过表达。上述大肠杆菌诱导的败血症模型,以及在盲肠结扎穿刺(CLP)诱导的败血症模型中(图7A)评估了这些超量表达AOAH和ANGPT1(NT003)的MSCs的作用。CLP后6h用NT003或溶媒对照处理小鼠,并在CLP后5天测量存活率。结果如图6D所示,其中用NT003而非溶媒对照处理的小鼠被保护免于由致病性大肠杆菌引起的死亡。如图7B所示,与溶媒对照相比,NT003处理组显示出在CLP诱导的败血症模型中更高的存活率。

[0169] 本技术不受本申请中描述的特定实施例的限制,这些特定实施例旨在作为本技术的各个方面的单个说明。如本领域技术人员将显而易见的,可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下对本技术进行许多修改和变化。除本文列举的试剂和方法之外,根据前述说明,本领域技术人员可以理解本发明技术范围内的功能等效的试剂和方法。这样的修改和变化旨在落入本技术的范围内。应当理解的是,本技术不限于可以变化的特定的方法、试剂、化合物组成或生物系统。还应理解的是,本文所使用的术语仅出于描述特定实施方式的目的,而无意于进行限制。

序列表

<110> 渥太华医院研究院;联合治疗学有限公司

<120> 过表达A0AH的基因工程间充质干细胞及其用途

<130> G17018-00007

<150> US 62/752,000

<151> 2018-10-29

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1734

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (7) .. (1734)

<400> 1

gccacc atg cag tcc ccc tgg aag att ctg acc gtg gca ccc ctg ttt 48

Met Gln Ser Pro Trp Lys Ile Leu Thr Val Ala Pro Leu Phe

1

5

10

ctg ctg ctg tcc ctg cag tcc tcc gca agc ccc gca aat gat gat cag 96

Leu Leu Leu Ser Leu Gln Ser Ser Ala Ser Pro Ala Asn Asp Asp Gln

15

20

25

30

tcc agg cct tcc ctg tct aac gga cac acc tgc gtg gga tgc gtg ctg 144

Ser Arg Pro Ser Leu Ser Asn Gly His Thr Cys Val Gly Cys Val Leu

35

40

45

gtg gtg tct gtg atc gag cag ctg gcc cag gtg cac aat tct aca gtg 192

Val Val Ser Val Ile Glu Gln Leu Ala Gln Val His Asn Ser Thr Val

50

55

60

cag gcc agc atg gag cgc ctg tgc tcc tac ctg cca gag aag ctg ttt 240

Gln Ala Ser Met Glu Arg Leu Cys Ser Tyr Leu Pro Glu Lys Leu Phe

65

70

75

ctg aag acc aca tgt tac ctg gtc atc gat aag ttc ggc agc gac atc 288

Leu Lys Thr Thr Cys Tyr Leu Val Ile Asp Lys Phe Gly Ser Asp Ile

80

85

90

atc aag ctg ctg tcc gcc gac atg aac gcc gac gtg gtg tgc cac acc 336

Ile Lys Leu Leu Ser Ala Asp Met Asn Ala Asp Val Val Cys His Thr

95

100

105

110

ctg gag ttt tgt aag cag aat aca ggc cag cct ctg tgc cac ctg tac 384

```

Leu Glu Phe Cys Lys Gln Asn Thr Gly Gln Pro Leu Cys His Leu Tyr
      115                      120                      125
ccc ctg cct aag gag aca tgg aag ttc aca ctg cag aag gcc agg cag 432
Pro Leu Pro Lys Glu Thr Trp Lys Phe Thr Leu Gln Lys Ala Arg Gln
      130                      135                      140
atc gtg aag aag tct cca atc ctg aag tat agc cgc tcc gcc tct gat 480
Ile Val Lys Lys Ser Pro Ile Leu Lys Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Asp
      145                      150                      155
atc tgc agc ctg ccc gtg ctg gcc aag att tgc cag aag atc aag ctg 528
Ile Cys Ser Leu Pro Val Leu Ala Lys Ile Cys Gln Lys Ile Lys Leu
      160                      165                      170
gcc atg gag cag agc gtg ccc ttt aag gac gtg gat agc gac aag tac 576
Ala Met Glu Gln Ser Val Pro Phe Lys Asp Val Asp Ser Asp Lys Tyr
      175                      180                      185                      190
tcc gtg ttc cct acc ctg agg gga tat cac tgg agg gga agg gac tgt 624
Ser Val Phe Pro Thr Leu Arg Gly Tyr His Trp Arg Gly Arg Asp Cys
      195                      200                      205
aac gat tct gac gag agc gtg tac cct ggc aga cgg ccc aac aat tgg 672
Asn Asp Ser Asp Glu Ser Val Tyr Pro Gly Arg Arg Pro Asn Asn Trp
      210                      215                      220
gat gtg cac cag gac agc aac tgc aat ggc atc tgg gga gtg gat cca 720
Asp Val His Gln Asp Ser Asn Cys Asn Gly Ile Trp Gly Val Asp Pro
      225                      230                      235
aag gac gga gtg cct tat gag aag aag ttt tgt gag ggc tcc cag cct 768
Lys Asp Gly Val Pro Tyr Glu Lys Lys Phe Cys Glu Gly Ser Gln Pro
      240                      245                      250
aga ggc atc atc ctg ctg ggc gac tcc gcc gga gca cac ttt cac atc 816
Arg Gly Ile Ile Leu Leu Gly Asp Ser Ala Gly Ala His Phe His Ile
      255                      260                      265                      270
tct cca gag tgg atc acc gcc tcc cag atg tct ctg aac agc ttc atc 864
Ser Pro Glu Trp Ile Thr Ala Ser Gln Met Ser Leu Asn Ser Phe Ile
      275                      280                      285
aat ctg cca acc gcc ctg aca aat gag ctg gat tgg cca cag ctg agc 912
Asn Leu Pro Thr Ala Leu Thr Asn Glu Leu Asp Trp Pro Gln Leu Ser
      290                      295                      300
gga gca acc ggc ttt ctg gac tcc aca gtg ggc atc aag gag aag tct 960
Gly Ala Thr Gly Phe Leu Asp Ser Thr Val Gly Ile Lys Glu Lys Ser
      305                      310                      315
atc tac ctg cgg ctg tgg aag aga aac cac tgc aat cac cgg gat tat 1008

```

```

Ile Tyr Leu Arg Leu Trp Lys Arg Asn His Cys Asn His Arg Asp Tyr
  320                               325                               330
cag aac atc tct agg aat ggc gcc agc tcc cgc aac ctg aag aag ttc 1056
Gln Asn Ile Ser Arg Asn Gly Ala Ser Ser Arg Asn Leu Lys Lys Phe
  335                               340                               345                               350
atc gag agc ctg tcc aga aat aag gtg ctg gac tac cca gcc atc gtg 1104
Ile Glu Ser Leu Ser Arg Asn Lys Val Leu Asp Tyr Pro Ala Ile Val
                               355                               360                               365
atc tat gcc atg atc ggc aac gac gtg tgc tcc ggc aag tct gac cca 1152
Ile Tyr Ala Met Ile Gly Asn Asp Val Cys Ser Gly Lys Ser Asp Pro
                               370                               375                               380
gtg ccc gcc atg acc aca ccc gag aag ctg tac agc aat gtg atg cag 1200
Val Pro Ala Met Thr Thr Pro Glu Lys Leu Tyr Ser Asn Val Met Gln
                               385                               390                               395
acc ctg aag cac ctg aac tcc cac ctg cct aat ggc tct cac gtg atc 1248
Thr Leu Lys His Leu Asn Ser His Leu Pro Asn Gly Ser His Val Ile
                               400                               405                               410
ctg tac ggc ctg cca gat ggc acc ttt ctg tgg gac aac ctg cac aat 1296
Leu Tyr Gly Leu Pro Asp Gly Thr Phe Leu Trp Asp Asn Leu His Asn
  415                               420                               425                               430
agg tat cac ccc ctg ggc cag ctg aac aag gat atg aca tac gcc cag 1344
Arg Tyr His Pro Leu Gly Gln Leu Asn Lys Asp Met Thr Tyr Ala Gln
                               435                               440                               445
ctg tat agc ttc ctg aat tgc ctg cag gtg tcc cct tgt cac ggc tgg 1392
Leu Tyr Ser Phe Leu Asn Cys Leu Gln Val Ser Pro Cys His Gly Trp
                               450                               455                               460
atg tct agc aac aag aca ctg cgg acc ctg aca tct gag aga gcc gag 1440
Met Ser Ser Asn Lys Thr Leu Arg Thr Leu Thr Ser Glu Arg Ala Glu
                               465                               470                               475
cag ctg agc aat acc ctg aag aag atc gcc gcc tcc gag aag ttc aca 1488
Gln Leu Ser Asn Thr Leu Lys Lys Ile Ala Ala Ser Glu Lys Phe Thr
  480                               485                               490
aac ttt aat ctg ttc tac atg gac ttc gcc ttt cac gag atc atc cag 1536
Asn Phe Asn Leu Phe Tyr Met Asp Phe Ala Phe His Glu Ile Ile Gln
  495                               500                               505                               510
gag tgg cag aag aga gga gga cag cca tgg cag ctg atc gag cca gtg 1584
Glu Trp Gln Lys Arg Gly Gly Gln Pro Trp Gln Leu Ile Glu Pro Val
                               515                               520                               525
gat ggc ttt cac cct aac gag gtg gcc ctg ctg ctg ctg gcc gac cac 1632

```

Asp Gly Phe His Pro Asn Glu Val Ala Leu Leu Leu Leu Ala Asp His
 530 535 540
 ttc tgg aag aag gtg cag ctg cag tgg ccc cag atc ctg ggg aaa gaa 1680
 Phe Trp Lys Lys Val Gln Leu Gln Trp Pro Gln Ile Leu Gly Lys Glu
 545 550 555
 aac cca ttc aac cca cag att aag cag gtg ttc ggg gac cag ggc ggg 1728
 Asn Pro Phe Asn Pro Gln Ile Lys Gln Val Phe Gly Asp Gln Gly Gly
 560 565 570
 cac tag 1734
 His
 575
 <210> 2
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 2
 Met Gln Ser Pro Trp Lys Ile Leu Thr Val Ala Pro Leu Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Gln Ser Ser Ala Ser Pro Ala Asn Asp Asp Gln Ser Arg
 20 25 30
 Pro Ser Leu Ser Asn Gly His Thr Cys Val Gly Cys Val Leu Val Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Glu Gln Leu Ala Gln Val His Asn Ser Thr Val Gln Ala
 50 55 60
 Ser Met Glu Arg Leu Cys Ser Tyr Leu Pro Glu Lys Leu Phe Leu Lys
 65 70 75 80
 Thr Thr Cys Tyr Leu Val Ile Asp Lys Phe Gly Ser Asp Ile Ile Lys
 85 90 95
 Leu Leu Ser Ala Asp Met Asn Ala Asp Val Val Cys His Thr Leu Glu
 100 105 110
 Phe Cys Lys Gln Asn Thr Gly Gln Pro Leu Cys His Leu Tyr Pro Leu
 115 120 125
 Pro Lys Glu Thr Trp Lys Phe Thr Leu Gln Lys Ala Arg Gln Ile Val
 130 135 140
 Lys Lys Ser Pro Ile Leu Lys Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Asp Ile Cys
 145 150 155 160
 Ser Leu Pro Val Leu Ala Lys Ile Cys Gln Lys Ile Lys Leu Ala Met
 165 170 175
 Glu Gln Ser Val Pro Phe Lys Asp Val Asp Ser Asp Lys Tyr Ser Val

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

```

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

```

<210> 3

<211> 1503

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (7) .. (1503)

<400> 3

```

gccacc atg aca gtt ttc ctt tcc ttt gct ttc ctc gct gcc att ctg 48
      Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu
      1                      5                      10
act cac ata ggg tgc agc aat cag cgc cga agt cca gaa aac agt ggg 96
      Thr His Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly
      15                      20                      25                      30
aga aga tat aac cgg att caa cat ggg caa tgt gcc tac act ttc att 144
      Arg Arg Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile
      35                      40                      45
ctt cca gaa cac gat ggc aac tgt cgt gag agt acg aca gac cag tac 192
      Leu Pro Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr
      50                      55                      60
aac aca aac gct ctg cag aga gat gct cca cac gtg gaa ccg gat ttc 240
      Asn Thr Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe
      65                      70                      75
tct tcc cag aaa ctt caa cat ctg gaa cat gtg atg gaa aat tat act 288
      Ser Ser Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr
      80                      85                      90
cag tgg ctg caa aaa ctt gag aat tac att gtg gaa aac atg aag tcg 336
      Gln Trp Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser
      95                      100                      105                      110

```

```

gag atg gcc cag ata cag cag aat gca gtt cag aac cac acg gct acc 384
Glu Met Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr
      115                      120                      125
atg ctg gag ata gga acc agc ctc ctc tct cag act gca gag cag acc 432
Met Leu Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr
      130                      135                      140
aga aag ctg aca gat gtt gag acc cag gta cta aat caa act tct cga 480
Arg Lys Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg
      145                      150                      155
ctt gag ata cag ctg ctg gag aat tca tta tcc acc tac aag cta gag 528
Leu Glu Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu
      160                      165                      170
aag caa ctt ctt caa cag aca aat gaa atc ttg aag atc cat gaa aaa 576
Lys Gln Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys
      175                      180                      185                      190
aac agt tta tta gaa cat aaa atc tta gaa atg gaa gga aaa cac aag 624
Asn Ser Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys
      195                      200                      205
gaa gag ttg gac acc tta aag gaa gag aaa gag aac ctt caa ggc ttg 672
Glu Glu Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu
      210                      215                      220
gtt act cgt caa aca tat ata atc cag gag ctg gaa aag caa tta aac 720
Val Thr Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn
      225                      230                      235
aga gct acc acc aac aac agt gtc ctt cag aag cag caa ctg gag ctg 768
Arg Ala Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu
      240                      245                      250
atg gac aca gtc cac aac ctt gtc aat ctt tgc act aaa gaa ggt gtt 816
Met Asp Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val
      255                      260                      265                      270
tta cta aag gga gga aaa aga gag gaa gag aaa cca ttt aga gac tgt 864
Leu Leu Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys
      275                      280                      285
gca gat gta tat caa gct ggt ttt aat aaa agt gga atc tac act att 912
Ala Asp Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile
      290                      295                      300
tat att aat aat atg cca gaa ccc aaa aag gtg ttt tgc aat atg gat 960
Tyr Ile Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp
      305                      310                      315

```

```

gtc aat ggg gga ggt tgg act gta ata caa cat cgt gaa gat gga agt 1008
Val Asn Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser
      320                      325                      330
cta gat ttc caa aga ggc tgg aag gaa tat aaa atg ggt ttt gga aat 1056
Leu Asp Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn
335                      340                      345                      350
ccc tcc ggt gaa tat tgg ctg ggg aat gag ttt att ttt gcc att acc 1104
Pro Ser Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr
      355                      360                      365
agt cag agg cag tac atg cta aga att gag tta atg gac tgg gaa ggg 1152
Ser Gln Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly
      370                      375                      380
aac cga gcc tat tca cag tat gac aga ttc cac ata gga aat gaa aag 1200
Asn Arg Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys
      385                      390                      395
caa aac tat agg ttg tat tta aaa ggt cac act ggg aca gca gga aaa 1248
Gln Asn Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys
      400                      405                      410
cag agc agc ctg atc tta cac ggt gct gat ttc agc act aaa gat gct 1296
Gln Ser Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala
415                      420                      425                      430
gat aat gac aac tgt atg tgc aaa tgt gcc ctc atg tta aca gga gga 1344
Asp Asn Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly
      435                      440                      445
tgg tgg ttt gat gct tgt ggc ccc tcc aat cta aat gga atg ttc tat 1392
Trp Trp Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr
      450                      455                      460
act gcg gga caa aac cat gga aaa ctg aat ggg ata aag tgg cac tac 1440
Thr Ala Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr
      465                      470                      475
ttc aaa ggg ccc agt tac tcc tta cgt tcc aca act atg atg att cga 1488
Phe Lys Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg
      480                      485                      490
cct tta gat ttt tag 1503
Pro Leu Asp Phe
495
<210> 4
<211> 498
<212> PRT

```

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

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

290	295	300
Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn		
305	310	315
Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp		
	325	330
Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser		
	340	345
Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln		
	355	360
Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg		
370	375	380
Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn		
385	390	395
Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser		
	405	410
Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn		
	420	425
Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp		
	435	440
Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala		
	450	455
Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys		
465	470	475
Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu		
	485	490
		495
Asp Phe		
<210> 5		
<211> 575		
<212> PRT		
<213> 智人 (Homo sapiens)		
<220>		
<221> 信号肽		
<222> (1) .. (23)		
<220>		
<221> 前肽		
<222> (24) .. (34)		
<400> 5		
Met Gln Ser Pro Trp Lys Ile Leu Thr Val Ala Pro Leu Phe Leu Leu		
1	5	10
		15

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

	325		330		335
Ile Ser Arg Asn Gly Ala Ser Ser Arg Asn Leu Lys Lys Phe Ile Glu					
	340		345		350
Ser Leu Ser Arg Asn Lys Val Leu Asp Tyr Pro Ala Ile Val Ile Tyr					
	355		360		365
Ala Met Ile Gly Asn Asp Val Cys Ser Gly Lys Ser Asp Pro Val Pro					
	370		375		380
Ala Met Thr Thr Pro Glu Lys Leu Tyr Ser Asn Val Met Gln Thr Leu					
385		390		395	400
Lys His Leu Asn Ser His Leu Pro Asn Gly Ser His Val Ile Leu Tyr					
	405		410		415
Gly Leu Pro Asp Gly Thr Phe Leu Trp Asp Asn Leu His Asn Arg Tyr					
	420		425		430
His Pro Leu Gly Gln Leu Asn Lys Asp Met Thr Tyr Ala Gln Leu Tyr					
	435		440		445
Ser Phe Leu Asn Cys Leu Gln Val Ser Pro Cys His Gly Trp Met Ser					
	450		455		460
Ser Asn Lys Thr Leu Arg Thr Leu Thr Ser Glu Arg Ala Glu Gln Leu					
465		470		475	480
Ser Asn Thr Leu Lys Lys Ile Ala Ala Ser Glu Lys Phe Thr Asn Phe					
	485		490		495
Asn Leu Phe Tyr Met Asp Phe Ala Phe His Glu Ile Ile Gln Glu Trp					
	500		505		510
Gln Lys Arg Gly Gly Gln Pro Trp Gln Leu Ile Glu Pro Val Asp Gly					
	515		520		525
Phe His Pro Asn Glu Val Ala Leu Leu Leu Leu Ala Asp His Phe Trp					
	530		535		540
Lys Lys Val Gln Leu Gln Trp Pro Gln Ile Leu Gly Lys Glu Asn Pro					
545		550		555	560
Phe Asn Pro Gln Ile Lys Gln Val Phe Gly Asp Gln Gly Gly His					
	565		570		575

<210> 6

<211> 2440

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6

aacagatcag ttccggcaag cctcgaggct cacgggggttt atgcacacta acttcactga 60
 gccaggggagc acggaagttg tgccactgtg caacttgggt tttctttatc ctgcagtctt 120
 tacctcagca gaaccgcaca ccacagactc cctccagctc tttgtgtgtg gctctctcag 180

```

ggtccaacaa gagcaagctg tgggtctgtg agtgtttatg tgtgctttta ttcacttcac 240
acttattgaa aagtgtgtat gtgagagggt ggggtgtgtg tgtcaaagag agtgaggaag 300
agaaggagag agagatcaat tgattctgca gcctcagctc cagcatccct cagttgggag 360
cttccaaagc cgggtgatca cttgggggtgc atagctcgga gatgcagtcc ccctggaaaa 420
tccttacggg ggcgccctcta ttcttgctcc tgtctcttca gtcctcggcc tctccagcca 480
acgatgacca gtccaggccc agcctctcga atgggcacac ctgtgtaggg tgtgtgctgg 540
tggtgtctgt aatagaacag cttgtctcaag ttcacaactc gacgggccag gcctcgatgg 600
agagactgtg cagctacctg cctgaaaaac tgttcttgaa aaccacctgc tatttagtca 660
ttgacaagtt tggatcagac atcataaaac tgcttagcgc agatatgaat gctgatgtgg 720
tatgtcacac tctggagttt tgtaaacaga aactggcca accattgtgt catctctacc 780
ctcttcccaa ggagacatgg aaatttacac tacagaaggc aagacaaatt gtcaagaagt 840
ccccgattct gaaaatattct agaagtgggt ctgacatttg ttcactcccg gttttggcca 900
agatctgcca gaaaattaaa ttagctatgg aacagtctgt gccattcaaa gatgtggatt 960
cagacaaata cagcgttttc ccaacactgc ggggctatca ctggcggggg agagactgta 1020
atgacagcga cgagtcagtg taccaggtg gaaggccgaa caactgggat gtccatcagg 1080
attcaaactg taatggcatt tgggtgtctg atccaaaaga tggagttcca tatgagaaga 1140
aattctgtga aggttcacag ccaggggaa tcattttgct gggagactca gctggggctc 1200
attttcacat ctctcctgaa tggatcacag cgtcgcagat gtctttgaac tctttcatca 1260
atctaccaac agcccttacc aacgagcttg actggcccca actctctggt gctacaggat 1320
ttctggactc cactgttga attaaagaaa aatctattta ctttcgctta tggaaaagaa 1380
accactgtaa tcacaggac taccagaata tttcaagaaa tgggtgcatc tcccgaacc 1440
tgaagaaatt tatagaaagc ttgtctagaa acaaggtgtt ggactatccc gccatcgta 1500
tatatgccat gattggaaat gatgtctgca gtgggaagag tgaccagtc ccagccatga 1560
ccactcctga gaaactctac tccaacgtca tgcagactct gaagcatcta aattcccacc 1620
tgcccaatgg cagccatgtt atttgtatg gcttaccaga tggaaccttt ctctgggata 1680
atttgcacaa cagatatcat cctctcggcc agctaaataa agacatgacc tatgctcagt 1740
tgtactcctt cctgaactgc ctccaggtca gccctgcca cggctggatg tcttccaaca 1800
agacgttgcg gactctcact tcagagagag cagagcaact ctccaacaca ctgaaaaaaa 1860
ttgcagccag tgagaaattt acaaacttca atcttttcta catggatttt gccttccatg 1920
aaatcataca ggagtggcag aagagaggcg gacagccctg gcagctcatc gagcccgagg 1980
atggattcca cccaacgag gtggctttgc tgttgttggc ggatcatttc tggaaaaagg 2040
tgcagctcca gtggcccaa atcctgggaa aggagaatcc gttcaacccc cagattaaac 2100
aggtgtttgg agaccaaggc gggcactgag cctctcagga gcatgcaccc ctggggagca 2160
cagggaggca gaggttggg taaactcatt ccacaaaccc tatgggggct gccacgtcac 2220
aggcccaaag gactcttctt cagcagcatc tttgcaaaat gtctttctct caatgaagag 2280
catatctgga cgactgtgca atgtgtgtg ctcccgggat cagtaacct tccgtgttcc 2340
ctgaaataac ctttcataaa gtgctttggg tgccattcca aacaagagag tatctgtgcc 2400
ctttacagct aattgttcta aaaggagttt ctaaaaacac 2440

```

<210> 7

<211> 498

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> 信号肽

<222> (1) .. (15)

<400> 7

```

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

```

Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu		
260	265	270
Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp		
275	280	285
Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile		
290	295	300
Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn		
305	310	315
Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp		
325	330	335
Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser		
340	345	350
Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln		
355	360	365
Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg		
370	375	380
Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn		
385	390	395
Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser		
405	410	415
Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn		
420	425	430
Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp		
435	440	445
Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala		
450	455	460
Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys		
465	470	475
Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu		
485	490	495

Asp Phe

<210> 8

<211> 4367

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 8

gccctaagcc atcagcaatc cttagtatag gggcacactc atgcattcct gtcaagtcac 60
 cttgtgaaag gctgcctgct tccagcttgg cttggatgtg caaccttaat aaaactcact 120
 gaggtctggg agaaaatagc agatctgcag cagatagggt agaggaaagg gtctagaata 180

```

tgtacacgca gctgactcag gcaggctcca tgctgaacgg tcacacagag aggaaacaat 240
aaatctcagc tactatgcaa taaatatctc aagttttaac gaagaaaaac atcattgcag 300
tgaaataaaa aatttttaaaa ttttagaaca aagctaaca atggctagtt ttctatgatt 360
cttcttcaaa cgctttcttt gagggggaaa gagtcaaaca aacaagcagt tttacctgaa 420
ataaagaact agtttttagag gtcagaagaa aggagcaagt tttgcgagag gcacggaagg 480
agtgtgctgg cagtacaatg acagttttcc tttcctttgc tttcctcgct gccattctga 540
ctcacatagg gtgcagcaat cagcgccgaa gtccagaaaa cagtgggaga agatataacc 600
ggattcaaca tgggcaatgt gcctacactt tcattcttcc agaacacgat ggcaactgtc 660
gtgagagtac gacagaccag tacaacacaa acgctctgca gagagatgct ccacacgtgg 720
aaccggattt ctcttcccag aaacttcaac atctggaaca tgtgatggaa aattatactc 780
agtggctgca aaaacttgag aattacattg tggaaaacat gaagtcggag atggcccaga 840
tacagcagaa tgcagttcag aaccacacgg ctaccatgct ggagatagga accagcctcc 900
tctctcagac tgcagagcag accagaaagc tgacagatgt tgagaccag gtactaaatc 960
aaacttctcg acttgagata cagctgctgg agaattcatt atccacctac aagctagaga 1020
agcaacttct tcaacagaca aatgaaatct tgaagatcca tgaaaaaac agttttattag 1080
aacataaaat cttagaaatg gaaggaaaac acaaggaaga gttggacacc ttaaaggaag 1140
agaaagagaa ccttcaaggc ttggttactc gtcaaacata tataatccag gagctggaaa 1200
agcaattaaa cagagctacc accaacaaca gtgtccttca gaagcagcaa ctggagctga 1260
tggaacacagt ccacaacctt gtcaatcttt gcactaaaga aggtgtttta ctaaagggag 1320
gaaaaagaga ggaagagaaa ccatttagag actgtgcaga tgtatatcaa gctggtttta 1380
ataaaagtgg aatctacact atttatatta ataatatgcc agaaccctaa aaggtgtttt 1440
gcaatatgga tgtcaatggg ggaggttgga ctgtaataca acatcgtgaa gatggaagtc 1500
tagattttcca aagaggctgg aaggaatata aaatgggttt tggaaatccc tccggtgaat 1560
attggctggg gaatgagttt atttttgcca ttaccagtca gaggcagtac atgctaagaa 1620
ttgagttaat ggactgggaa gggaaccgag cctattcaca gtatgacaga ttccacatag 1680
gaaatgaaaa gcaaaactat aggttgtatt taaaaggtca cactgggaca gcaggaaaac 1740
agagcagcct gatcttacac ggtgctgatt tcagcactaa agatgctgat aatgacaact 1800
gtatgtgcaa atgtgccctc atgttaacag gaggatgggt gtttgatgct tgtggcccct 1860
ccaatctaaa tggaatgttc tatactgcgg gacaaaacca tggaaaactg aatgggataa 1920
agtggcacta cttcaaaggg cccagttact cttacgttc cacaactatg atgattcgac 1980
ctttagattt ttgaaagcgc aatgtcagaa gcgattatga aagcaacaaa gaaatccgga 2040
gaagctgcca ggtgagaaac tgtttgaaaa cttcagaagc aaacaatatt gtctcccttc 2100
cagcaataag tggtagttat gtgaagtcac caaggttctt gaccgtgaat ctggagccgt 2160
ttgagttcac aagagtctct acttggggtg acagtgtcga cgtggctcga ctatagaaaa 2220
ctccactgac tgtcgggctt taaaaaggga agaaactgct gagcttgctg tgcttcaaac 2280
tactactgga ccttattttg gaactatggt agccagatga taaatatggt taatttcatt 2340
taaaacagaa aaaaagagtg aaaaagagaa tatacatgaa gaatagaaac aagcctgcca 2400
taatcctttg gaaaagatgt attataccag tgaaaaggtg ttatatctat gcaaacctac 2460
taacaaatta tactgttgca caattttgat aaaaatttag aacagcattg tcctctgagt 2520

```

tggttaaatg ttaatggatt tcagaagcct aattccagta tcatacttac tagttgattt 2580
ctgcttaccc atcttcaa at gaaaattcca tttttgtaag ccataatgaa ctgtagtaca 2640
tggacaataa gtgtgtggta gaaacaaact ccattactct gatttttgat acagttttca 2700
gaaaaagaaa tgaacataat caagtaagga tgtatgtggt gaaaacttac caccgccata 2760
ctatgggtttt catttactct aaaaactgat tgaatgatat ataaatatat ttatagcctg 2820
agtaaagtta aaagaatgta aaatatatca tcaagttctt aaaataatat acatgcattt 2880
aatatttcct ttgatattat acaggaaagc aatattttgg agtatgttaa gttgaagtaa 2940
aagcaagtac tctggagcag ttcattttac agtatctact tgcattgtgta tacatacatg 3000
taacttcatt attttaaaaa tttttttaga actccaatac tcaccctgtt atgtcttgct 3060
aatttaaatt ttgctaatta actgaaacat gcttaccaga ttcacactgt tccagtgtct 3120
ataaaagaaa cactttgaag tctataaaaa ataaaataat tataaatatc attgtacata 3180
gcatgtttat atctgcaaaa aacctaatac ctaattaatc tggaatatgc aacattgtcc 3240
ttaattgatg caaataaacac aaatgctcaa agaaatctac tatatccctt aatgaaatac 3300
atcattcttc atatatctt ccttcagtcc attcccttag gcaattttta atttttaaaa 3360
attattatca ggggagaaaa attggcaaaa ctattatatg taagggaat atatacaaaa 3420
agaaaattaa tcatagtcac ctgactaaga aattctgact gctagttgcc ataaataact 3480
caatggaaat attcctatgg gataatgtat tttaagttaa tttttgggtt gcttgaagtt 3540
actgcattat tttatcaaga agtcttctct gcctgtaagt gtccaaggtt atgacagtaa 3600
acagttttta ttaaaacatg agtcactatg ggatgagaaa attgaaataa agctactggg 3660
cctcctctca taaaagagac agttgttggc aaggtagcaa taccagtttc aaacttggtg 3720
acttgatcca ctatgcctta atggtttcct ccatttgaga aaataaagct attcacattg 3780
ttaagaaaaa tactttttaa agtttaccat caagtctttt ttatatttat gtgtctgtat 3840
tctacccctt tttgccttac aagtgatatt tgcaggtatt ataccatttt tctattcttg 3900
gtggcttctt catagcaggt aagcctctcc ttctaaaaac ttctcaactg ttttcattta 3960
agggaaagaa aatgagtatt ttgtcctttt gtgttcctac agacactttc ttaaaccagt 4020
ttttggataa agaatactat ttccaaactc atattacaaa aacaaaataa aataataaaa 4080
aaagaaagca tgatatttac tgttttgtt tctgggtttg agaaatgaaa tattgtttcc 4140
aattattttat aataaatcag tataaaatgt tttatgattg ttatgtgtat tatgtaatac 4200
gtacatgttt atggcaattt aacatgtgta ttctttta at tgtttcagaa taggataatt 4260
aggtattcga attttgtctt taaaattcat gtggtttcta tgcaaagttc ttcatatcat 4320
cacaacatta tttgatttaa ataaaattga aagtaattatt tgtgcaa 4367

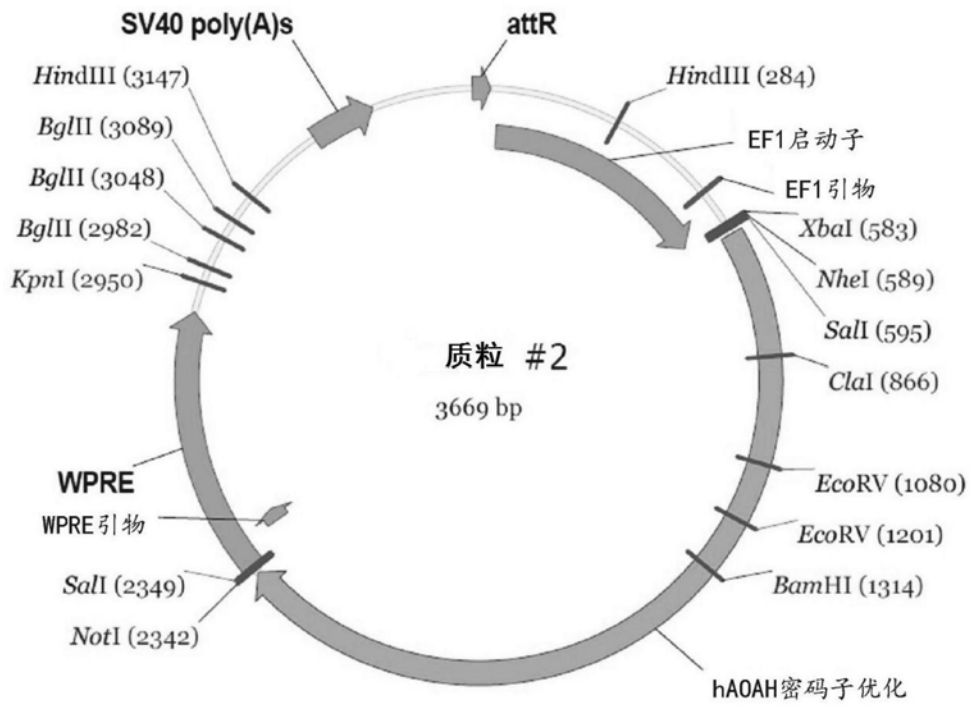


图1A

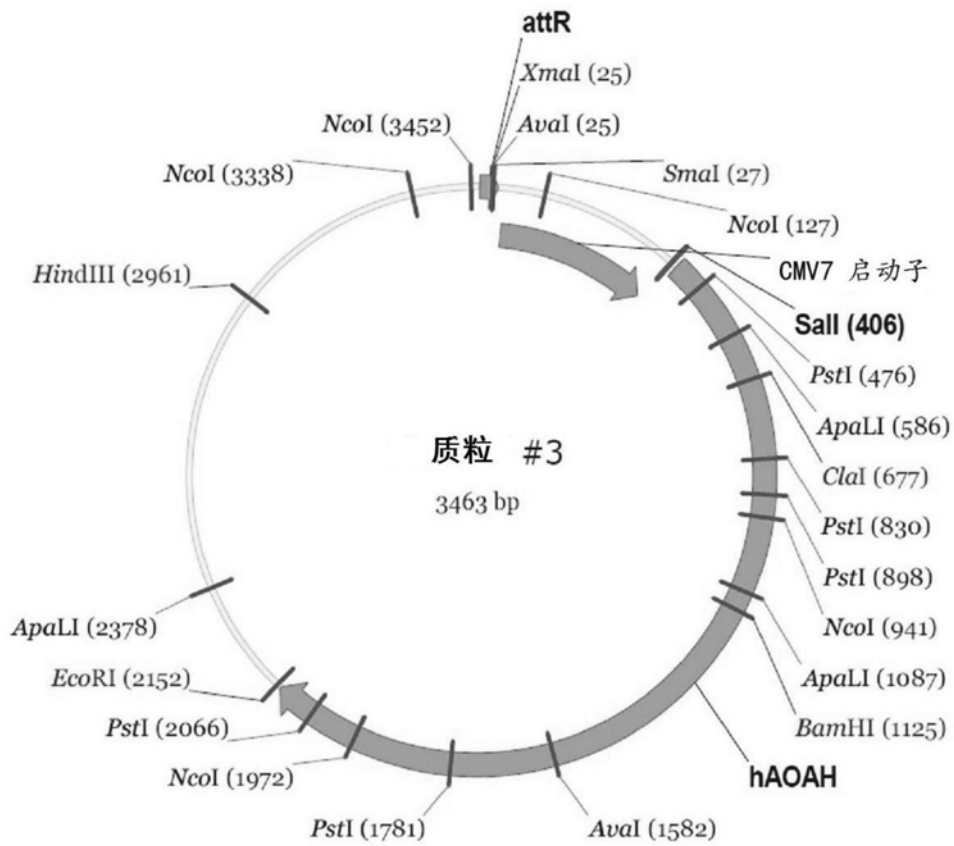


图1B

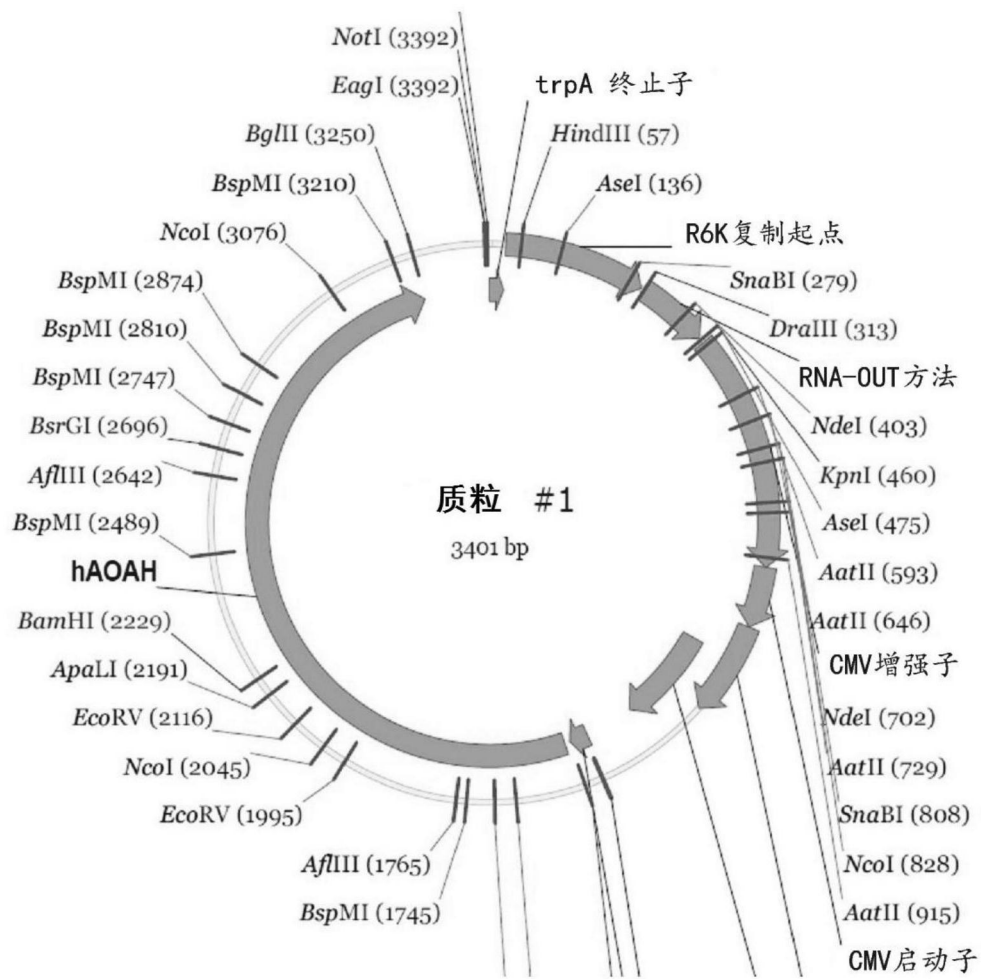


图1C

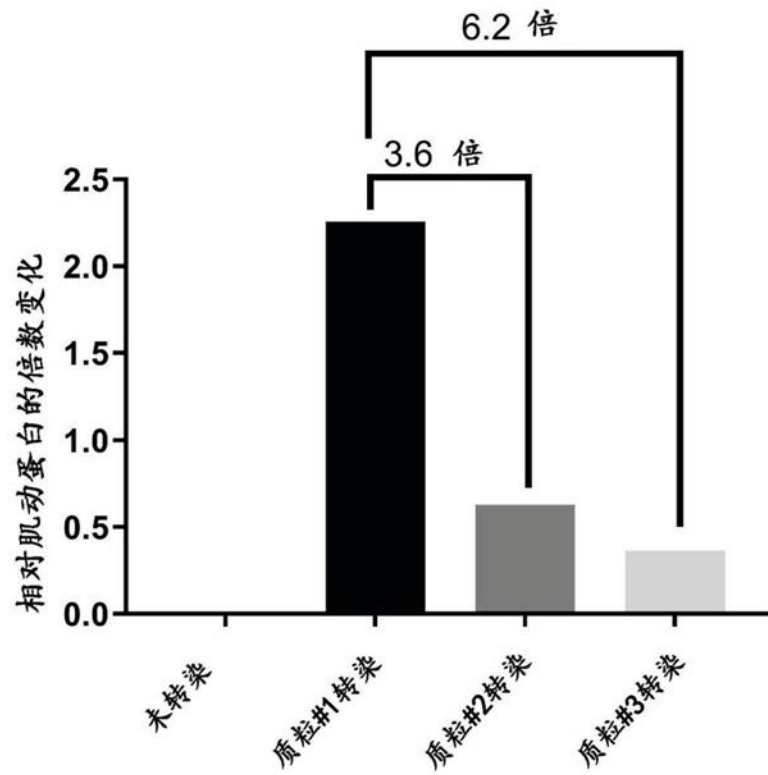


图2

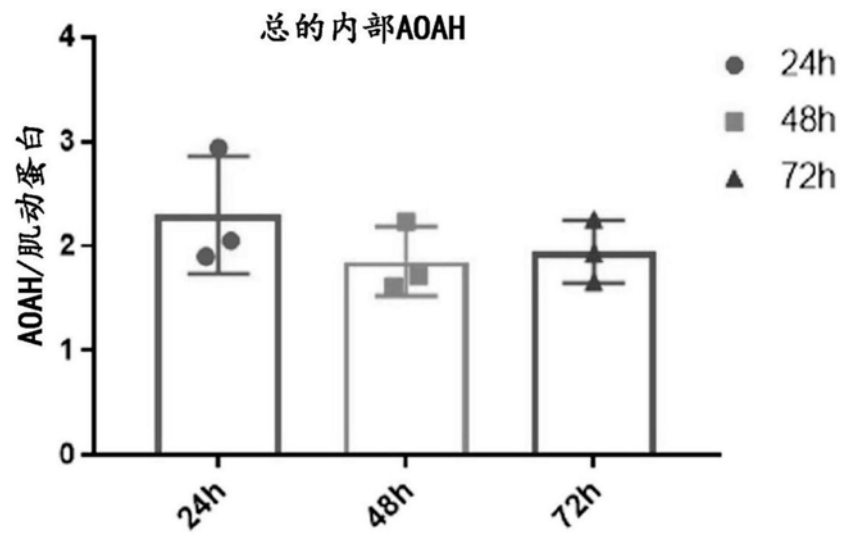


图3A

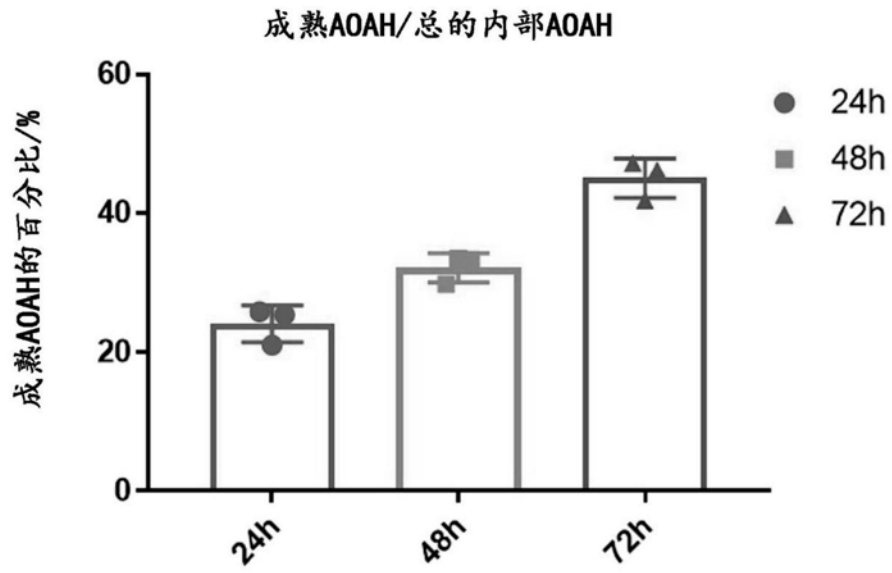


图3B

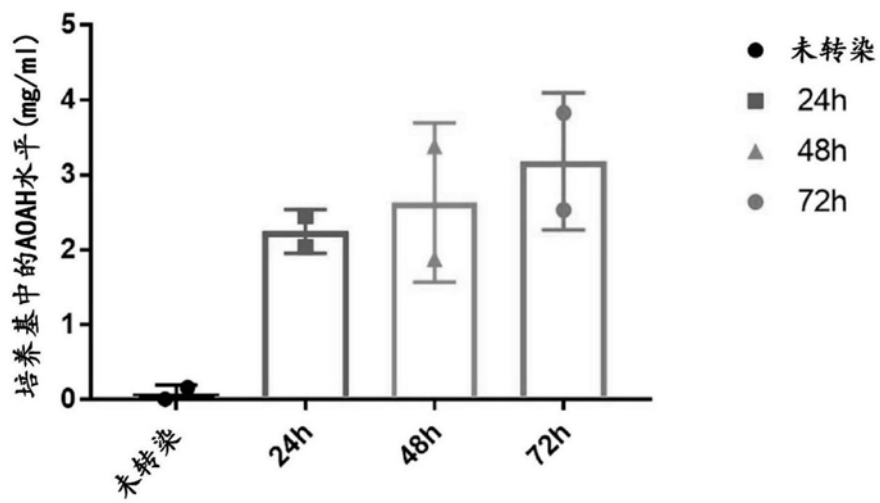


图3C

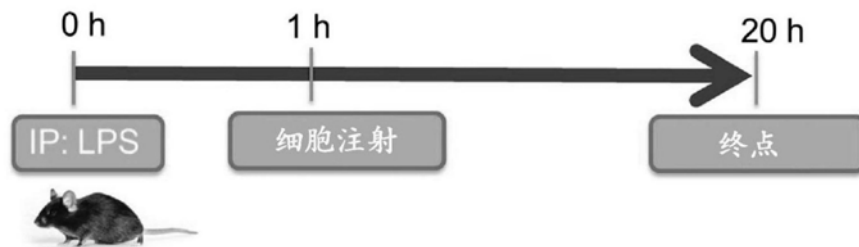


图4A

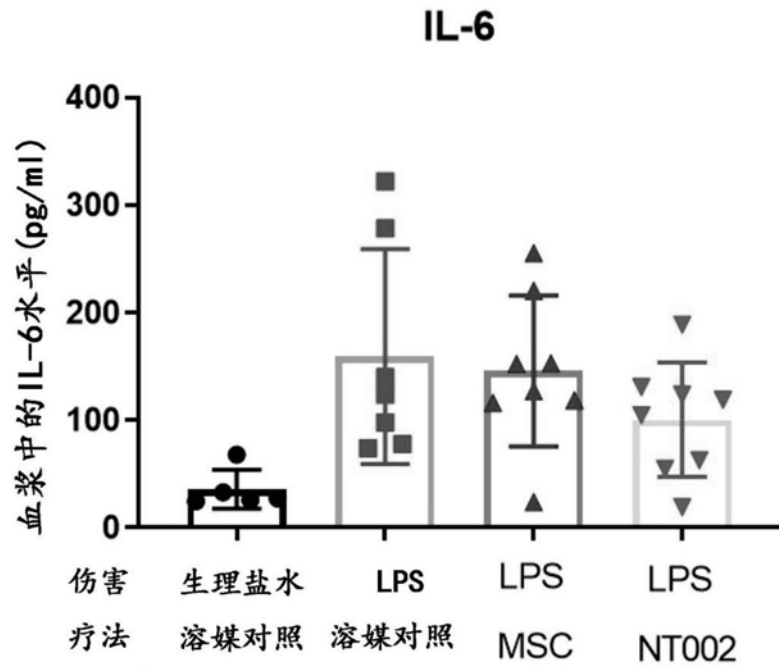


图4B

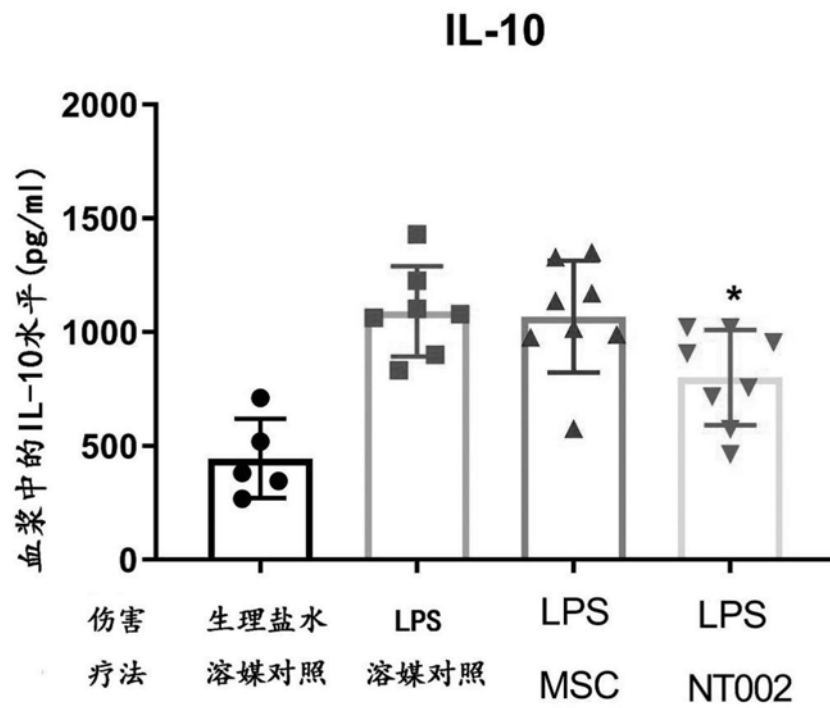


图4C

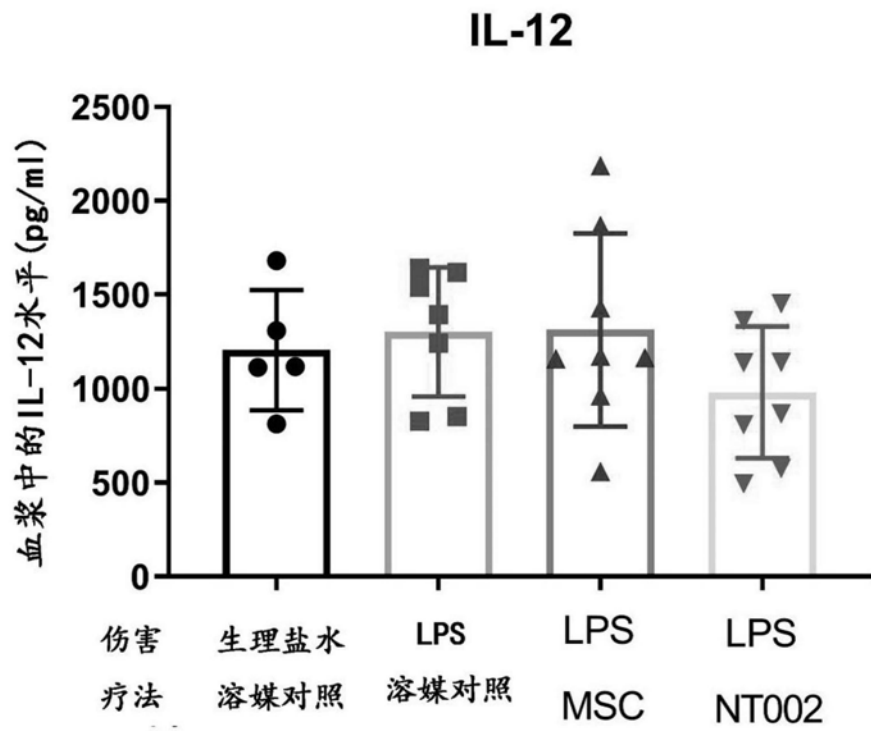


图4D

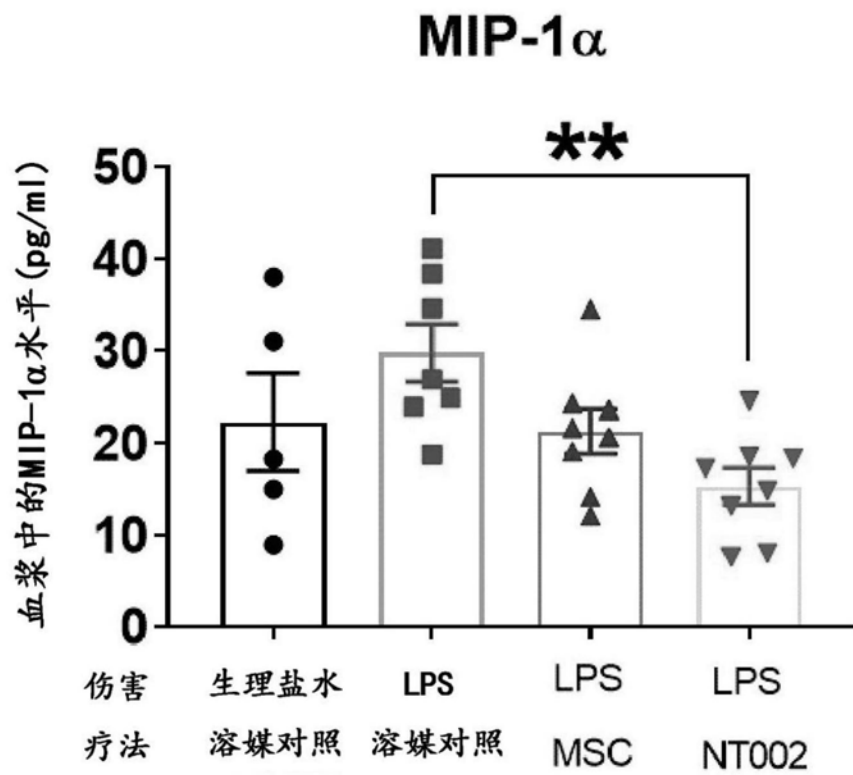
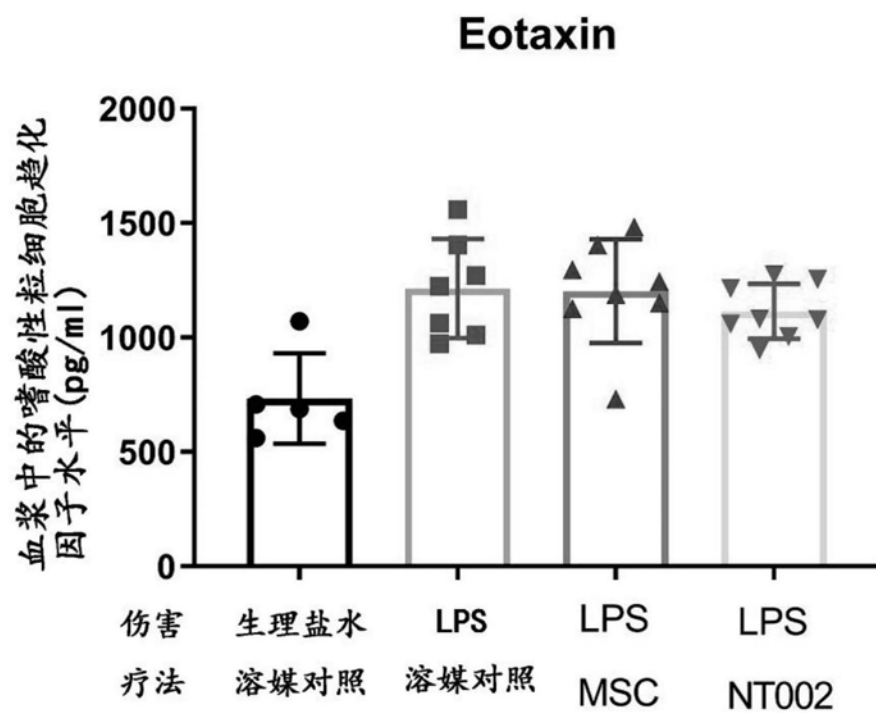


图4E



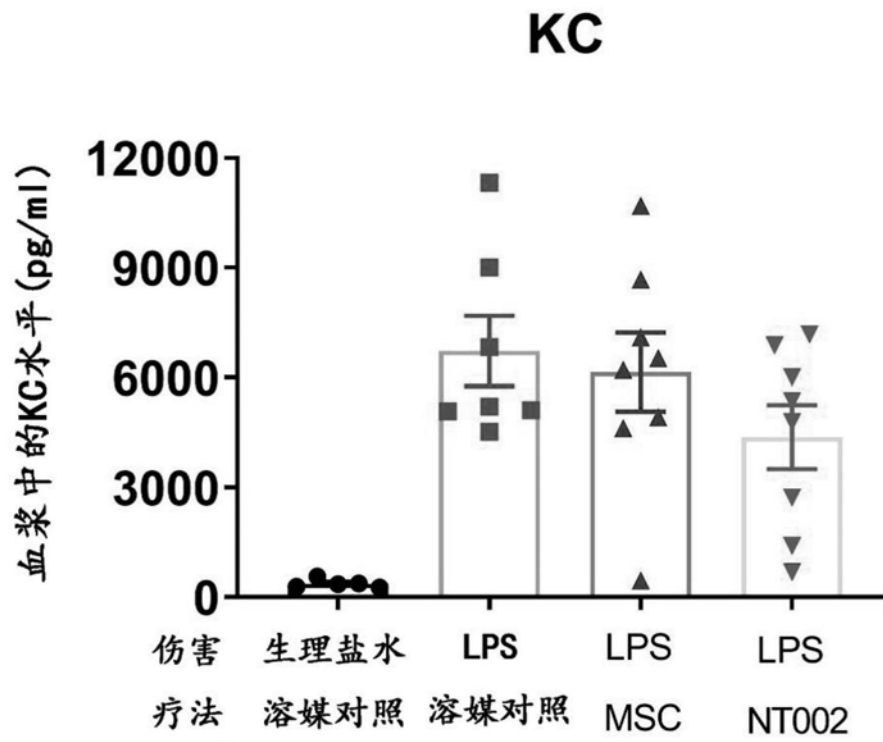


图4H

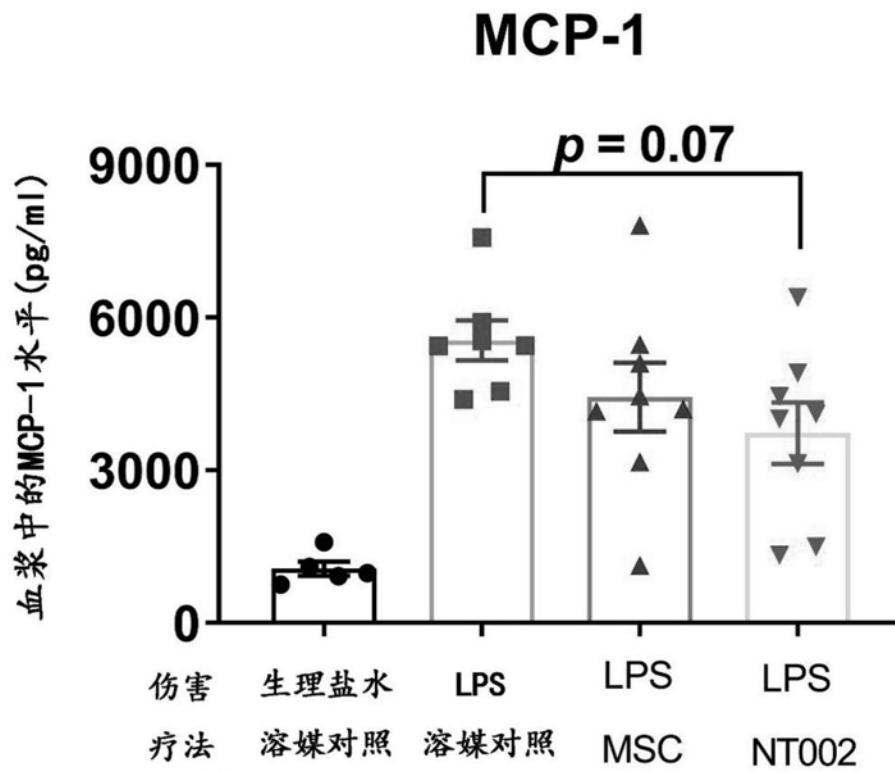


图4I

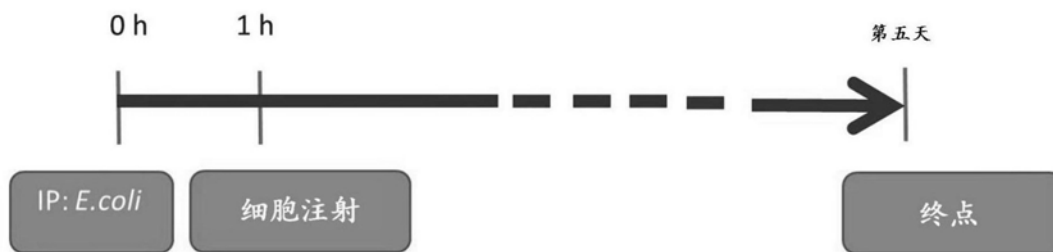


图5A

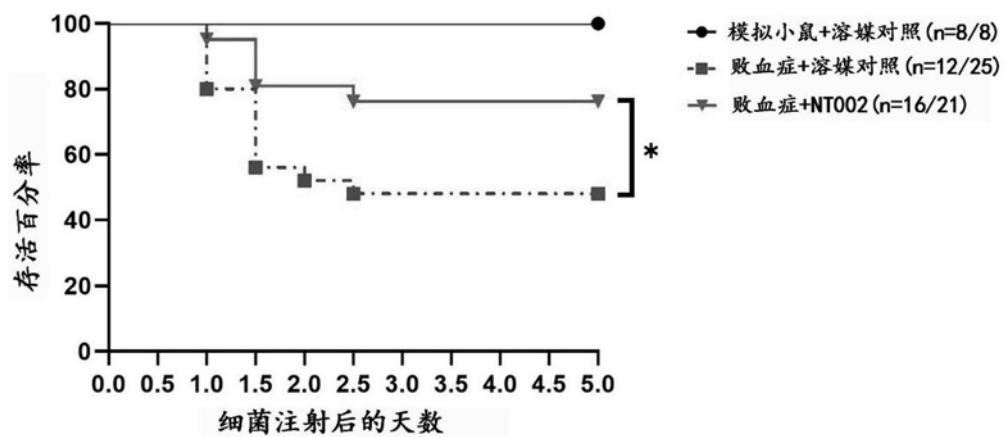


图5B

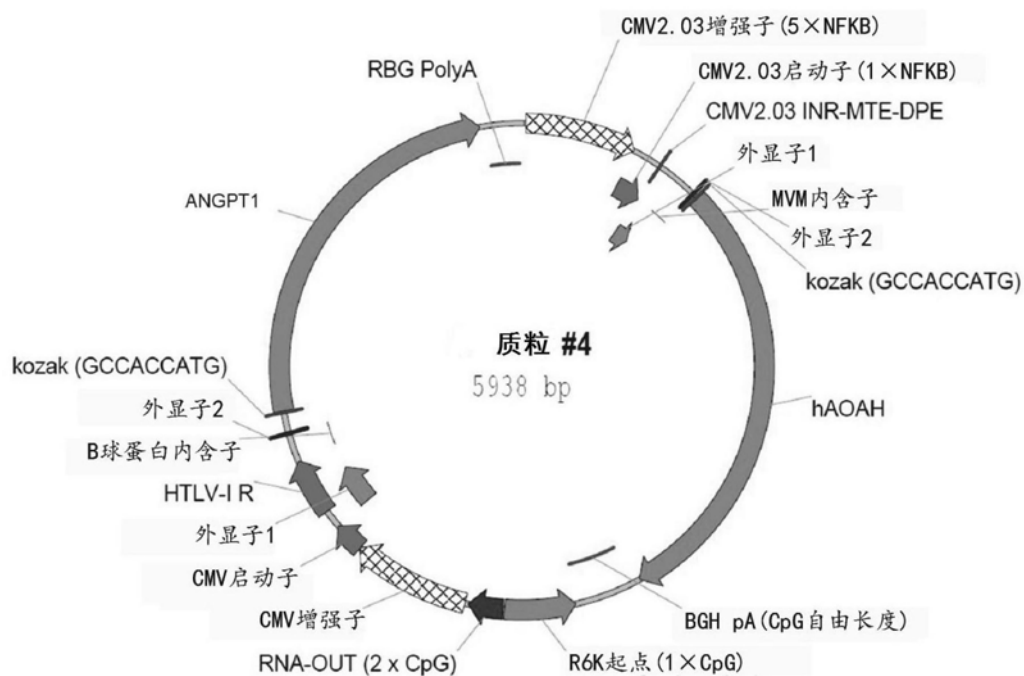


图6A

GCCACCATGCAGTCCCCCTGGAAGATTCTGACCGTGGCACCCCTGTTTCTGCTGCTGTCCCTGCAGTCTCCGCA
AGCCCCGCAAATGATGATCAGTCCAGGCCTTCCCTGTCTAACGGACACACCTGCGTGGGATGCGTGCTGGTGGTG
TCTGTGATCGAGCAGCTGGCCAGGTGCACAATTCTACAGTGCAGGCCAGCATGGAGCGCTGTGCTCCTACCTG
CCAGAGAAGCTGTTTCTGAAGACCACATGTTACCTGGTTCATCGATAAGTTCGGCAGCGACATCATCAAGCTGCTG
TCCGCCGACATGAACGCCGACGTGGTGTGCCACACCCTGGAGTTTGTAAAGCAGAATACAGGCCAGCCTCTGTGC
CACCTGTACCCCTGCCCTAAGGAGACATGGAAGTTCACACTGCAGAAGGCCAGGCAGATCGTGAAGAAGTCTCCA
ATCCTGAAGTATAGCCGCTCCGGCTCTGATATCTGCAGCCTGCCCGTGTGGCCAAGATTTGCCAGAAGATCAAG
CTGGCCATGGAGCAGAGCGTGCCCTTTAAGGACGTGGATAGCGACAAGTACTCCGTGTTCCCTACCCTGAGGGGA
TATCACTGGAGGGGAAGGGACTGTAACGATTCTGACGAGAGCGTGTACCCTGGCAGACGGCCCAACAATTGGGAT
GTGCACCAGGACAGCAACTGCAATGGCATCTGGGGAGTGGATCCAAAGGACGGAGTGCCTTATGAGAAGAAGTTT
TGTGAGGGCTCCAGCCTAGAGGCATCATCTGCTGGCGACTCCGCGGAGCACACTTTCACATCTCTCCAGAG
TGGATCACCGCTCCAGATGTCTCTGAACAGCTTCATCAATCTGCCAACCAGCCCTGACAAATGAGCTGGATTGG
CCACAGCTGAGCGGAGCAACCGGCTTTCTGGACTCCACAGTGGGCATCAAGGAGAAGTCTATCTACCTGCGGCTG
TGAAGAGAAAACCACTGCAATCACCGGGATTATCAGAACATCTCTAGGAATGGCGCCAGCTCCCGCAACCTGAAG
AAGTTCATCGAGAGCCTGTCCAGAAATAAGGTGCTGGACTACCCAGCCATCGTGATCTATGCCATGATCGGCAAC
GACGTGTGCTCCGGCAAGTCTGACCCAGTGCCCGCCATGACCACACCCGAGAAGCTGTACAGCAATGTGATGCAG
ACCCTGAAGCACCTGAACTCCACCTGCCTAATGGCTCTCAGTGATCCTGTACGGCCTGCCAGATGGCACCTTT
CTGTGGGACAACCTGCACAATAGGTATCACCCCTGGGCCAGCTGAACAAGGATATGACATACGCCAGCTGTAT
AGCTTCCTGAATTGCCTGCAGGTGTCCCTTTGTACGGCTGGATGTCTAGCAACAAGACACTGCGGACCCTGACA
TCTGAGAGAGCCGAGCAGCTGAGCAATACCCTGAAGAAGATCGCCGCCTCCGAGAAGTTCACAACTTTAATCTG
TTCTACATGGACTTCGCTTTACGAGATCATCCAGGAGTGGCAGAAGAGAGGAGGACAGCCATGGCAGCTGATC
GAGCCAGTGGATGGCTTTCACCTAACGAGGTGGCCCTGTCTGCTGCTGGCCGACCCTTCTGGAAGAAGGTGCAG
CTGCAGTGGCCCCAGATCTGGGAAAGAAAACCCATTCAACCCACAGATTAAGCAGGTGTTTCGGGGACCAGGGC
GGGCAC TAG

图6B

GCCACCATGACAGTTTTCTTTCTTTGCTTTCCCTCGCTGCCATTCTGACTCACATAGGGTGCAGCAATCAGCGC
CGAAGTCCAGAAAACAGTGGGAGAAGATATAACCGGATTCAACATGGGCAATGTGCCTACACTTTTATTCTTCCA
GAACACGATGGCAACTGTGCTGAGAGTACGACAGACCAGTACAACACAAACGCTCTGCAGAGAGATGCTCCACAC
GTGGAACCGGATTTCTCTTCCAGAACTTCAACATCTGGAACATGTGATGGAAAATTATACTCAGTGGCTGCAA
AACTTGAGAATTACATTGTGGAACATGAAGTCGGAGATGGCCCAGATACAGCAGAATGCAGTTCAGAACCCAC
ACGGCTACCATGCTGGAGATAGGAACCAGCCTCCTCTCAGACTGCAGAGCAGACCAGAAAGCTGACAGATGTT
GAGACCCAGGTACTAAATCAAACCTTCTCGACTTGAGATACAGCTGTCTGGAGAATTTCATTATCCACCTACAAGCTA
GAGAAGCAACTTCTTCAACAGACAAATGAAATCTTGAAGATCCATGAAAAAACAGTTTATTAGAACATAAAATC
TTAGAAATGGAAGGAAAACACAAGGAAGAGTTGGACACCTTAAAGGAAGAGAAAGAGAACCTTCAAGGCTTGGTT
ACTCGTCAAACATATATAATCCAGGAGCTGGAAAAGCAATTAAACAGAGCTACCACCAACAACAGTGTCTTCAG
AAGCAGCAACTGGAGCTGATGGACACAGTCCACAACCTTGTCAATCTTTGCACTAAAGAAGGTGTTTTACTAAAG
GGAGGAAAAAGAGAGGAAGAGAAACCATTTAGAGACTGTGCAGATGTATATCAAGCTGGTTTTAATAAAAGTGG
ATCTACACTATTTATATTAATAATATGCCAGAACCCAAAAGGTGTTTTGCAATATGGATGTCAATGGGGGAGGT
TGGACTGTAATACAACATCGTGAAGATGGAAGTCTAGATTTCCAAAGAGGCTGGAAGGAATATAAAATGGGTTTT
GGAAATCCCTCCGGTGAATATTGGCTGGGGAATGAGTTATTTTTGCCATTACCAGTCAGAGGCAGTACATGCTA
AGAATTGAGTTAATGGACTGGGAAGGGAACCGAGCCTATTCACAGTATGACAGATTCCACATAGGAAATGAAAAG
CAAACTATAGGTTGTATTTAAAAGGTCACACTGGGACAGCAGGAAAAACAGAGCAGCCTGATCTTACACGGTGCT
GATTTACAGCACTAAAGATGCTGATAATGACAACCTGTATGTGCAAATGTGCCCTCATGTTAACAGGAGGATGGTGG
TTTGATGCTTGTGGCCCTCCAATCTAAATGGAATGTTCTATACTGCGGGACAAAACCATGGAAGAACTGAATGGG
ATAAAGTGGCACTACTTCAAAGGGCCAGTTACTCCTTACGTTCACAACATATGATGATTCGACCTTTAGATTTT
TAG

图6C

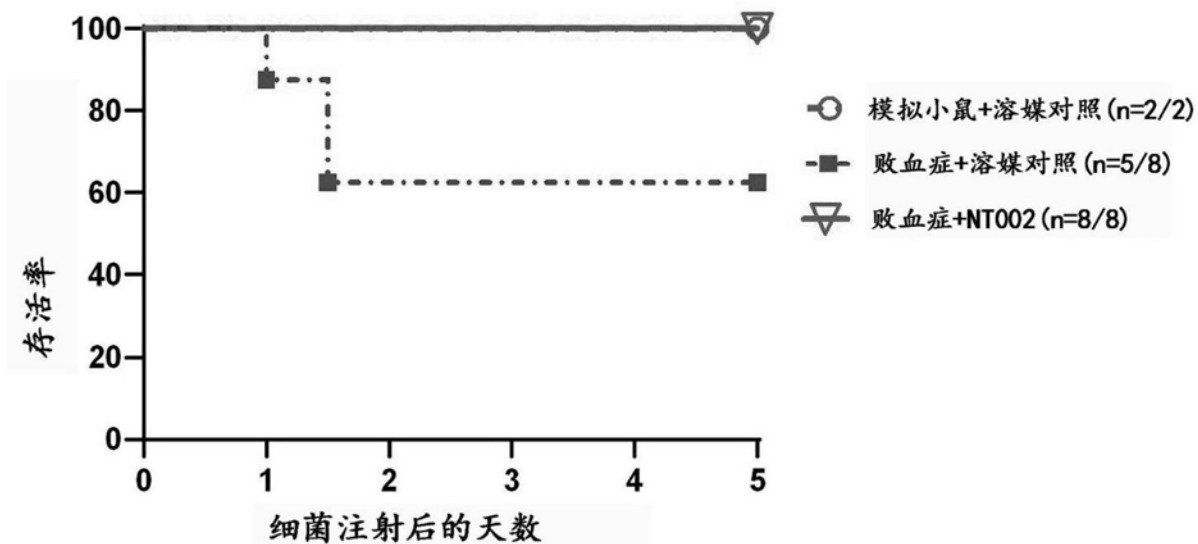


图6D



图7A

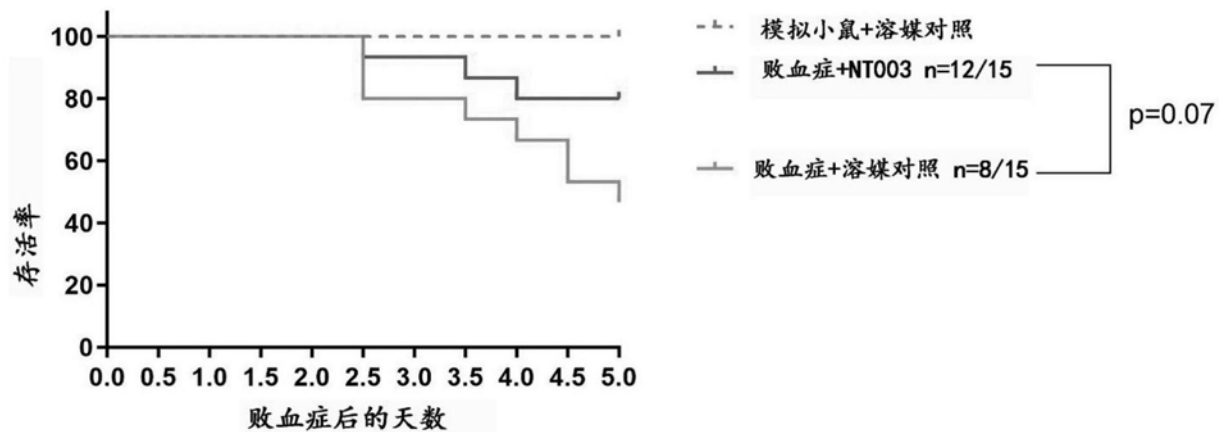


图7B

10	20	30	40	50
<u>MQSPWKILTV</u>	<u>APLFLLLSLQ</u>	<u>SSASPANDDQ</u>	<u>SRPSLSNGHT</u>	<u>CVGCVLVVSV</u>
60	70	80	90	100
IEQLAQVHNS	TVQASMERLC	SYLPEKLFLK	TTCYLVIDKF	GSDIIKLLSA
110	120	130	140	150
DMNADVCHT	LEFCKQNTGQ	PLCHLYPLPK	ETWKFTLQKA	RQIVKKSPIL
160	170	180	190	200
KYSRSGSDIC	SLPVLAKICQ	KIKLAMEQSV	PFKDVDSDKY	SVFPTLRGYH
210	220	230	240	250
WRGRDCNDSD	ESVYPGRRPN	NWDVHQDSNC	NGIWGVDPKD	GVPYEKKFCE
260	270	280	290	300
GSQPRGIILL	GDSAGAHFHI	SPEWITASQM	SLNSFINLPT	ALTNELDWPQ
310	320	330	340	350
LSGATGFLDS	TVGIKEKSIY	LRLWKRNHCH	HRDYQNISR	GASSRNLKKF
360	370	380	390	400
IESLSRNKVL	DYPAIVIIYAM	IGNDVCSGKS	DPVPAMTTPE	KLYSNVMQTL
410	420	430	440	450
KHLNSHLPNG	SHVILYGLPD	GTFLWDNLHN	RYHPLGQLNK	DMTYAQLYSF
460	470	480	490	500
LNCLQVSPCH	GWMSSNKTLR	TLTSERAEQL	SNTLKKIAAS	EKFTNFNLFY
510	520	530	540	550
MDEAFHEIIQ	EWQKRGQPW	QLIEPVDGFH	PNEVALLLLA	DHFWKKVQLQ
560	570			
WPQILGKENP	FNPQIKQVFG	DQGGH		

图8A

```

1  aacagatcag ttccggcaag cctcgaggct cacgggggtt atgcacacta acttcactga
61  gccagggagc acggaagttg tgccactgtg caacttgggt tttctttatc ctgcagtctt
121 tacctcagca gaaccgcaca ccacagactc cctccagctc tttgtgtgtg gctctctcag
181 ggtccaacaa gagcaagctg tgggtctgtg agtggttatg tgtgctttta ttcacttcac
241 acttattgaa aagtgtgtat gtgagagggg ggggtgtgtg tgtcaaagag agtgaggaag
301 agaaggagag agagatcaat tgattctgca gcctcagctc cagcatccct cagttgggag
361 ttccaaagc cgggtgatca cttgggggtg atagctcgga gatgcagtcc ccttggaaaa
421 tccttacggg ggcgcctcta ttcttgcctc tgtctcttca gtctctggcc tctccagcca
481 acgatgacca gtccaggccc agcctctcga atgggcacac ctgtgtaggg tgtgtgctgg
541 tgggtgtctgt aatagaacag cttgtctcaag ttcacaactc gacgggtccag gcctcgatgg
601 agagactgtg cagctacctg cctgaaaaac tgttcttgaa aaccacctgc tatttagtca
661 ttgacaagtt tggatcagac atcataaaac tgcttagcgc agatatgaat gctgatgtgg
721 tatgtcacac tctggagttt tgtaaacaga acactggcca accattgtgt catctctacc
781 ctcttcccaa ggagacatgg aaatttacac tacagaaggc aagacaaatt gtcaagaagt
841 ccccgattct gaaatattct agaagtgggt ctgacatttg ttcactcccg gttttggcca
901 agactctgcca gaaaattaaa ttagctatgg aacagtctgt gccattcaaa gatgtggatt
961 cagacaaata cagcgttttc ccaacactgc ggggctatca ctggcggggg agagactgta
1021 atgacagcga cgagtcagtg taccaggtta gaaggccgaa caactgggat gtccatcagg
1081 attcaaatctg taatggcatt tggggtgtcg atccaaaaga tggagtcca tatgagaaga
1141 aattctgtga aggttcacag ccaggggaa tcattttgct gggagactca gctggggctc
1201 attttcacat ctctcctgaa tggatcacag cgtcgcagat gtctttgaac tctttcatca
1261 atctaccaac agcccttacc aacgagcttg actggcccca actctctggt gctacaggat
1321 ttctggactc cactgttggg attaaagaaa aatctattta ccttcgctta tggaaaagaa
1381 accactgtaa tcacagggac taccagaata tttcaagaaa tgggtgcatt tcccgaacc
1441 tgaagaaatt tatagaaagc ttgtctagaa acaaggtgtt ggactatccc gccatcgta
1501 tatatgccat gattggaat gatgtctgca gtgggaagag tgaccagtc ccagccatga
1561 ccactcctga gaaactctac tccaacgtca tgcagactct gaagcatcta aattcccacc
1621 tgcccaatgg cagccatggt attttgtatg gcttaccaga tggaaccttt ctctgggata
1681 atttgcacaa cagatatcat cctctcggcc agctaaataa agacatgacc tatgcgcagt
1741 tgtactcctt cctgaactgc ctccaggtea gcccctgcca cggtggatg tcttccaaca
1801 agacgttgcg gactctcact tcagagagag cagagcaact ctccaacaca ctgaaaaaaa
1861 ttgcagccag tgagaaattt acaaacttca atcttttcta catggatttt gccttccatg
1921 aaatcatata ggagtggcag aagagaggcg gacagccctg gcagctcatc gagcccgagg
1981 atggattcca cccaacgag gtggctttgc tgttgttggc ggatcatttc tggaaaaagg
2041 tgcagctcca gtggcccaa atcctgggaa aggagaatcc gttcaacccc cagattaaac
2101 aggtgttttg agaccaaggc gggcactgag cctctcagga gcatgcaccc ctggggagca
2161 cagggaggca gaggttggg taaactcatt ccacaaaccc tatgggggct gccacgtcac
2221 aggcccaaag gactcttctt cagcagcatc tttgcaaaat gtctttctct caatgaagag
2281 catatctgga cgactgtgca atgctgtgtg ctcccgggat cagtaacctt tccgtgttc
2341 ctgaaataac ctttcataaa gtgctttggg tgccattcca aacaagagag tatctgtgcc
2401 ctttacagct aattgttcta aaaggagttt ctaaaaacac

```

图8B

10	20	30	40	50
MTVFLSFAFL	AAILTHIGCS	NQRRSPENSG	RRYNRIQHGO	CAYTFILPEH
60	70	80	90	100
DGNCRESTTD	QYNTNALQRD	APHVEPDFSS	QKLOHLEHVM	ENYTQWLQKL
110	120	130	140	150
ENYIVENMKS	EMAQIQONAV	QNHTATMLEI	GTSLLSQTAE	QTRKLTDTVET
160	170	180	190	200
QVLNQTSRLE	IQLLENSLST	YKLEKQLLQQ	TNEILKIHEK	NSLLEHKILE
210	220	230	240	250
MEGKHKEELD	TLKEEKENLQ	GLVTRQTYII	QELEKQLNRA	TTNNSVLQKQ
260	270	280	290	300
QLELMDTVHN	LVNLCTKEGV	LLKGGKREEE	KPFRDCADVY	QAGFNKSGIY
310	320	330	340	350
TIYINNMPPEP	KKVFCNMDVN	GGGWTVIQHR	EDGSLDFQRG	WKEYKMGFGN
360	370	380	390	400
PSGEYWLGN	FIFAITSQRQ	YMLRIELMDW	EGNRAYSQYD	RFHIGNEKQN
410	420	430	440	450
YRLYLKGHTG	TAGKQSSLIL	HGADFSTKDA	DNDNCMCKCA	LMLTGGWWFD
460	470	480	490	
ACGPSNLNGM	FYTAGQNHGK	LNGIKWHYFK	GPSYSLRSTT	MMIRPLDF

图9A

```
1 gccctaagcc atcagcaatc cttagtatag gggcacactc atgcattcct gtcaagtcac
61 cttgtgaaaag gctgcctgct tccagcttgg cttggatgtg caaccttaat aaaactcact
121 gaggtctggg agaaaatagc agatctgcag cagatagggg agaggaaagg gtctagaata
181 tgtacacgca gctgactcag gcaggctcca tgctgaacgg tcacacagag aggaaacaat
241 aaatctcagc tactatgcaa taaatatctc aagttttaac gaagaaaaac atcattgcag
301 tgaaataaaa aatttttaaaa ttttagaaca aagctaacaa atggctagtt ttctatgatt
361 cttcttcaaa cgctttcttt gagggggaaa gagtcaaaca aacaagcagt ttacctgaa
421 ataaagaact agtttttagag gtcagaagaa aggagcaagt tttgcgagag gcacggaagg
481 agtgtgctgg cagtacaatg acagttttcc tttcctttgc tttcctcgct gccattctga
541 ctcacatagg gtgcagcaat cagcgccgaa gtccagaaaa cagtgggaga agatataacc
601 ggattcaaca tgggcaatgt gcctacactt tcattcttcc agaacacgat ggcaactgtc
661 gtgagagtac gacagaccag tacaacacaa acgctctgca gagagatgtc ccacacgtgg
721 aaccggattt ctcttcccag aaacttcaac atctggaaca tgtgatggaa aattatactc
781 agtggctgca aaaacttgag aattacattg tggaaaacat gaagtctggag atggcccaga
841 tacagcagaa tgcagttcag aaccacacgg ctaccatgct ggagatagga accagcctcc
901 tctctcagac tgcagagcag accagaaagc tgacagatgt tgagaccacg gtactaaatc
961 aaacttctcg acttgagata cagctgctgg agaattcatt atccacctac aagctagaga
1021 agcaacttct tcaacagaca aatgaaatct tgaagatcca tgaaaaaaac agtttattag
1081 aacataaaat cttagaaatg gaaggaaaac acaaggaaga gttggaacac ttaaaggaag
1141 agaaagagaa ccttcaaggc ttggttactc gtcaaacata tataatccag gagctggaaa
1201 agcaattaaa cagagctacc accaacaaca gtgtccttca gaagcagcaa ctggagctga
1261 tggacacagt ccacaacctt gtcaatcttt gcactaaaga aggtgtttta ctaaagggag
1321 gaaaaagaga ggaagagaaa ccatttagag actgtgcaga tgtatatcaa gctgggttta
1381 ataaaaagtgg aatctacact atztatatta ataatatgcc agaacccaaa aaggtgtttt
1441 gcaatatgga tgtcaatggg ggaggttggg ctgtaataca acatcgtgaa gatggaagtc
1501 tagatttcca aagaggctgg aaggaatata aaatgggttt tggaaatccc tccggtgaat
1561 attggctggg gaatgagttt atTTTTGCCA ttaccagtca gaggcagtac atgctaagaa
1621 ttgagttaat ggactgggaa gggaaccgag cctattcaca gtatgacaga ttccacatag
1681 gaaatgaaaa gcaaaaactat aggttgattt taaaaggtca cactggggaca gcaggaaaac
1741 agagcagcct gatcttacac ggtgctgatt tcagcactaa agatgctgat aatgacaact
```

图9B

```

1801 gtatgtgcaa atgtgccctc atgttaacag gaggatgggtg gtttgatgct tgtggccctc
1861 ccaatctaaa tggaatgttc tatactgcgg gacaaaacca tggaaaactg aatgggataa
1921 agtggcacta cttcaaaggg cccagttact ccttacgttc cacaactatg atgattcgac
1981 ctttagatatt ttgaagcgc aatgtcagaa gcgattatga aagcaacaaa gaaatccgga
2041 gaagctgcca ggtgagaaac tgtttgaaaa cttcagaagc aaacaatat tgcctccctc
2101 cagcaataag tggtagttat gtgaagtcac caaggttctt gaccgtgaat ctggagccgt
2161 ttgagttcac aagagtctct acttgggggtg acagtgtctc cgtggctcga ctatagaaaa
2221 ctccactgac tgtcgggctt taaaaaggga agaaactgct gagcttgctg tgcttcaaac
2281 tactactgga ccttattttg gaactatggg agccagatga taaatatggg taatttcattg
2341 taaaacagaa aaaaagagtg aaaaagagaa tatacatgaa gaatagaaac aagcctgcca
2401 taatcctttg gaaaagatgt attataccag tgaaaagggtg ttatatctat gcaaacctac
2461 taacaaatta tactgttgca caattttgat aaaaatttag aacagcattg tcctctgagt
2521 tggttaaatg ttaatggatt tcagaagcct aattccagta tcatacttac tagttgattt
2581 ctgcttacc ctttcaaact gaaaattcca tttttgtaag ccataatgaa ctgtagtaca
2641 tggacaataa gtgtgtggta gaaacaaact ccattactct gatttttgat acagttttca
2701 gaaaaagaaa tgaacataat caagtaagga tgtatgtggg gaaaacttac cacccccata
2761 ctatggtttt catttactct aaaaactgat tgaatgatat ataaatatat ttatagcctg
2821 agtaaagtta aaagaatgta aaatatatca tcaagttctt aaaataatat acatgcattt
2881 aatatcttct ttgatattat acaggaaagc aatatcttgg agtatgttaa gttgaagtaa
2941 aagcaagtac tctggagcag ttcatttttac agtatctact tgcattgtga tacatacatg
3001 taacttcatt attttaaaaa tattttttaga actccaatac tcaccctgtt atgtcttgct
3061 aatttaaatt ttgctaatta actgaaacat gcttaccaga ttcacactgt tccagtgtct
3121 ataaaagaaa cactttgaag tctataaaaa ataaaataat tataaatatc attgtacata
3181 gcatgtttat atctgcaaaa aacctaatag ctaattaatc tggaaatgc aacattgtcc
3241 ttaattgatg caaataaacac aaatgctcaa agaaatctac tatatccctt aatgaaatac
3301 atcattcttc atatatctct ccttcagctc attcccttag gcaattttta atttttaaaa
3361 attattatca ggggagaaaa attggcaaaa ctattatatg taagggaat atatacaaaa
3421 agaaaattaa tcatagtcac ctgactaaga aattctgact gctagttgcc ataaataact
3481 caatggaaat attcctatgg gataatgtat tttaagtga tttttggggg gcttgaagtt
3541 actgcattat tttatcaaga agtcttctct gcctgtaagt gtccaagggt atgacagtaa
3601 acagttttta ttaaaacatg agtcactatg ggatgagaaa attgaaataa agctactggg
3661 cctcctctca taaaagagac agttgttggc aaggtagcaa taccagtttc aaacttgggtg
3721 acttgatcca ctatgcctta atggtttctt ccatttgaga aaataaagct attcacattg
3781 ttaagaaaaa tactttttta agtttaccat caagtctttt ttatatattat gtgtctgtat
3841 tctaccctct tttgccttac aagtgatatt tgcaggatatt ataccatttt tctattcttg
3901 gtggcttctt catagcaggt aagcctctcc ttctaaaaac ttctcaactg ttttcattta
3961 agggaaaagaa aatgagtatt ttgtcctttt gtgttcctac agacactttc ttaaaccagt
4021 ttttgataa agaatactat ttccaaactc atattacaaa aacaaaataa aataataaaa
4081 aaagaaagca tgatattttac tgttttgttg tctgggtttg agaaatgaaa tattgtttcc
4141 aattattttat aataaatcag tataaaatgt tttatgattg ttatgtgtat tatgtaatac
4201 gtacatgttt atggcaattt aacatgtgta ttcttttaaa tgtttcagaa taggataatt
4261 aggtattcga attttgcctt taaaattcat gtggtttcta tgcaaagttc ttcatatcat
4321 cacaacatta tttgatttaa ataaaattga aagtaatat tgtgcaa

```

图9C