(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118434281 A
(43)申请公布日 2024.08.02

(21)申请号 202280077086.0
(22)申请日 2022.09.19
(30)优先权数据
63/261,393 2021.09.20 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.05.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/043967 2022.09.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/044100 EN 2023.03.23
(71)申请人 雷维维科公司
地址 美国弗吉尼亚州
(72)发明人 M·科基纳基 K·V·库拉维
(74)专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理事务所(普通合伙) 11436
专利代理师 程淼 唐莉
(51)Int.Cl.
A01K 67/0278(2024.01)

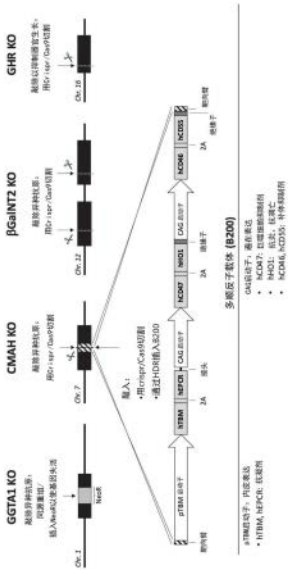
权利要求书8页 说明书168页 附图24页

(54)发明名称

用于异种移植的包含十个基因修饰的多转基因猪

(57)摘要

本发明提供了转基因动物(例如,转基因猪动物),源自该转基因动物的器官、组织和细胞,其特别可用于异种移植疗法。具体地,本发明提供了转基因猪动物,以及源自该转基因猪动物的器官、组织和细胞,其缺乏功能性α1,3半乳糖基转移酶(GTKO)基因的任何表达,并且包含在单个多基因表达载体内至少三个启动子的控制下的至少六种转基因,并且进一步包含至少四种另外的基因修饰。还提供了制备转基因动物(例如,转基因猪动物)的方法,以及使用该转基因动物,源自该转基因动物的器官、组织和细胞用于异种移植疗法和治疗疾病或病况的方法。



CN 118434281 A

1.转基因猪动物,其包含导致以下的基因修饰:

(i)缺乏功能性α1,3半乳糖基转移酶的表达;和

(ii)在单个基因组基因座处掺入和表达

(a)至少两种补体抑制剂转基因;

(b)至少一种免疫抑制转基因;

(c)至少一种细胞保护转基因;和

(d)至少两种抗凝转基因。

2.根据权利要求1所述的转基因猪动物,其中所述转基因动物包含至少六种、至少七种或至少八种转基因。

3.根据权利要求1-2中任一项所述的转基因猪动物,其中所述转基因动物包含至少六种转基因。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的转基因猪动物,其中所述至少六种转基因由多顺反子载体编码,任选地其中所述多顺反子载体包含至少三个双顺反子单元。

5.根据权利要求4所述的转基因猪动物,其中每个双顺反子单元包含驱动经由切割肽连接至第二转基因的第一转基因的启动子。

6.根据权利要求4-5中任一项所述的转基因猪动物,其中第一双顺反子单元包含所述至少两种抗凝转基因,第二双顺反子包含至少两种补体抑制剂转基因;并且第三双顺反子单元包含所述至少一种细胞保护转基因和所述至少一种免疫抑制转基因。

7.根据权利要求4-5中任一项所述的转基因猪动物,其中所述切割肽选自由T2A、P2A、F2A和E2A组成的组。

8.根据权利要求1-3中任一项所述的转基因猪动物,其中所述转基因由多顺反子载体编码,所述多顺反子载体包含:

(i)至少两个双顺反子单元,其中每个双顺反子单元包含驱动经由切割肽连接至第二转基因的第一转基因的启动子;和

(ii)至少两种非多顺反子转基因,其中每种非多顺反子转基因由其自身的启动子驱动。

9.根据权利要求5-7中任一项所述的转基因猪动物,其中:

(a)至少一个双顺反子单元由组织特异性启动子驱动,

(b)至少一个双顺反子单元由诱导型启动子驱动;和/或

(c)至少两个双顺反子单元由专用的组成型启动子驱动。

10.根据权利要求8所述的转基因猪动物,其中所述至少两个双顺反子单元各自由组成型启动子驱动,并且所述至少两种非多顺反子转基因各自由组织特异性启动子驱动。

11.根据权利要求9-10中任一项所述的转基因猪动物,其中:

(i)所述组成型启动子选自由CAG启动子、Tie-2启动子、ICAM-2启动子组成的组;

(ii)所述组织特异性启动子是内皮细胞特异性启动子;

(iii)所述诱导型启动子是四环素/多西环素调节启动子;或

(iv)所述组织特异性启动子选自猪血栓调节蛋白启动子(pTBMpr)、人血栓调节蛋白启动子、猪EPCR启动子、人EPCR启动子。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的转基因猪动物,其中所述至少两种补体抑制剂

是:

(i)选自由CD46、DAF(CD55)、CD59、CR1及其组合组成的组;

(ii)遍在表达的;

(iii)在诱导型启动子的控制下;和/或

(iv)在组成型启动子的控制下。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的转基因猪动物,其中所述至少一种免疫抑制转基因是:

(i)选自由细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、分化簇47(CD47)和II类反式激活因子-DN(CIITA-DN)组成的组;

(ii)在诱导型启动子的控制下;和/或

(iii)在组成型启动子的控制下。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的转基因猪动物,其中所述至少一种细胞保护转基因是:

(i)在组织型启动子的控制下;

(ii)在诱导型启动子的控制下;

(iii)在内皮特异性启动子的控制下;和/或

(iv)选自由血红素加氧酶1(HO-1)、A20、FAT-1、可溶性肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及其组合组成的组。

15.根据权利要求1-14中任一项所述的转基因猪动物,其中所述至少两种抗凝转基因是:

(i)在内皮特异性启动子的控制下;

(ii)在诱导型启动子的控制下;和/或

(iii)选自由内皮蛋白C受体(EPCR)、血栓调节蛋白、CD39、水蛭素、组织因子途径抑制剂(TFPI)及其组合组成的组。

16.根据权利要求4所述的转基因猪动物,其中所述多顺反子载体包含选自由以下组成的组的双顺反子单元:

(i)驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪TBM启动子(pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);

(ii)驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD47转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD47-2A-hHO1]);

(iii)驱动经由2A肽连接至人DAF转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-2A-hDAF]);

(iv)Poly-A信号融合至猪TBM启动子,其驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因(PolyA/pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);

(v)驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD59转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD59-2A-hHO1]);

(vi)驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪EPCR启动子(pEPCRpr[hTBM-2A-hEPCR]);

(vii)驱动经由2A肽连接至人CD47转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-

2A-hCD47]);

(viii)驱动第一GHR gRNA的第一U6启动子,连接至驱动第二GHR gRNA的第二U6启动子(U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2]),其中第一gRNA和第二gRNA相同或不同;

(xix)驱动Cas核酸内切酶的TRE3G启动子,经由绝缘子连接至驱动tTA的CAG启动子(TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA]);和

(x)其组合。

17.根据权利要求4所述的转基因猪动物,其中所述多顺反子载体包含:

(i)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD47-2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];

(ii)PolyA-pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD47-2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];

(iii)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-P2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-P2A-hDAF];

(iv)PolyA-pTBMpr[hTBM];CAG pr[hCD47-P2A-hHO1];pEPCRpr[hEPCR];和CAGpr[hCD46P-2A-hDAF];

(v)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-P2A-hHO1];CAGpr[hCD46-2A-hCD47];

(vi)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-2A-hHO1];CAGpr[hCD46-2A-hCD55];

(vii)U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2];TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA];CAGpr[hCD46-2A-hCD55];

(viii)SEQ ID NO:7;

(xix)SEQ ID NO:8;

(x)SEQ ID NO:9;

(xi)SEQ ID NO:11;

(xii)SEQ ID NO:12;

(xiii)SEQ ID NO:13;或

(xiv)SEQ ID NO:14。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的转基因猪动物,其中所述单个基因组基因座是天然基因座或修饰的天然基因座。

19.根据权利要求18所述的转基因猪动物,其中所述修饰的天然基因座包含:

(i)基因编辑介导的插入、缺失或取代;

(ii)转基因DNA;

(iii)选择性基因标志物;和/或

(iv)着陆区。

20.根据权利要求1-17中任一项所述的转基因猪动物,其中所述单个基因组基因座选自由AAVS1、ROSA26、CMAH、GHR、B4GalNT2和GGTA1组成的组。

21.根据权利要求4-17中任一项所述的转基因猪动物,其中编码转基因的多顺反子载体进一步包含用于在基因座处同源重组和/或同源定向修复(HDR)的核苷酸序列,所述基因座选自由AAVS1、ROSA26、GHR、CMAH、B4GalNT2和GGTA1组成的组。

22.根据权利要求1-21中任一项所述的转基因猪动物,其中所述转基因猪动物进一步包含至少一个另外的基因修饰,所述另外的基因修饰选自由以下组成的组:基因敲除;基因敲入;基因替换;点突变;基因、基因片段或核苷酸的缺失、插入或取代;大基因组插入;或其

组合。

23.根据权利要求22所述的转基因猪动物,其中所述转基因猪动物包含选自由AAVS1、ROSA26、CMAH、B4GalNT2、GGTA1和生长激素受体(GHR)组成的组的基因的敲除。

24.根据权利要求22-23中任一项所述的转基因猪动物,其中所述基因敲除包含:

(i)基因编辑介导的插入、缺失或取代;

(ii)CRISPR-Cas9介导的基因编辑;

(iii)同源重组介导的插入;和/或

(iv)NeoR插入介导的基因敲除。

25.根据权利要求24所述的转基因猪动物,其中所述单个基因组基因座是CMAH,并且所述另外的修饰包含β4GalNT2、GGTA1和GHR的敲除。

26.根据权利要求24所述的转基因猪动物,其中所述单个基因组基因座是β4GalNT2,并且所述另外的修饰包含CMAH、GGTA1和GHR的敲除。

27.根据权利要求24所述的转基因猪动物,其中所述单个基因组基因座是GGTA1,并且所述另外的修饰包含β4GalNT2、CMAH和GHR的敲除。

28.源自权利要求1-27中任一项的转基因猪动物的细胞。

29.源自权利要求1-27中任一项的转基因猪动物的器官。

30.根据权利要求29所述的器官,其中所述器官选自由心脏、肺、肝脏、胰腺和肾脏组成的组。

31.源自权利要求1-27中任一项的转基因猪动物的组织。

32.根据权利要求31所述的组织,其中所述组织选自由血管组织、心脏瓣膜、视网膜组织、神经组织和角膜组织组成的组。

33.根据权利要求32所述的组织,其中所述血管组织是血管移植物。

34.用于异种移植的方法,其包括向有需要的受试者施用源自权利要求1-27中任一项的转基因猪动物的器官、组织或细胞。

35.根据权利要求34所述的方法,其中所述受试者是非人灵长类动物或人。

36.根据权利要求34所述的方法,其中所述器官选自由心脏、肺、胰腺、肝脏和肾脏组成的组。

37.根据权利要求34所述的方法,其中所述组织选自由血管组织、视网膜组织、神经组织和角膜组织组成的组。

38.根据权利要求342所述的方法,进一步包括在异种移植所述器官、组织或细胞后,向所述受试者施用临床相关的免疫抑制方案。

39.制备权利要求1-27中任一项的转基因猪动物的方法。

40.制备包含至少六种转基因的转基因猪的方法,其包括以下步骤:

(i)用单个多顺反子载体转染猪细胞,所述单个多顺反子载体包含

(a)至少两种补体抑制剂转基因;

(b)至少一种免疫抑制转基因;

(c)至少一种细胞保护转基因;和

(d)至少两种抗凝转基因;

(ii)通过在单个基因组基因座处掺入和表达所述多顺反子载体来产生包含至少六种

转基因的多转基因猪细胞;

(iii)通过将所述多转基因猪细胞的细胞核注射至重建的体细胞核移植(SCNT)来生成多转基因猪合子;和

(iv)允许所述多转基因猪合子成熟为多转基因猪

其中所述猪细胞和所述多转基因猪缺乏α1,3半乳糖基转移酶(GTKO)的表达。

41.根据权利要求40所述的方法,其中所述猪细胞是体细胞。

42.根据权利要求40-41中任一项所述的方法,其中所述多转基因猪细胞包含至少七种、至少八种、至少九种或至少十种转基因。

43.根据权利要求40-42中任一项所述的方法,其中所述至少六种转基因由多顺反子载体编码,任选地其中所述多顺反子载体包含至少三个双顺反子单元。

44.根据权利要求43所述的方法,其中每个双顺反子单元包含驱动经由切割肽连接至第二转基因的第一转基因的启动子。

45.根据权利要求43-44中任一项所述的方法,其中第一双顺反子单元包含所述至少两种抗凝转基因,第二双顺反子包含至少两种补体抑制剂转基因;并且第三双顺反子单元包含所述至少一种细胞保护转基因和所述至少一种免疫抑制转基因。

46.根据权利要求43-45中任一项所述的方法,其中所述切割肽选自由T2A、P2A、F2A和E2A组成的组。

47.根据权利要求43-46中任一项所述的方法,其中所述至少六种转基因由多顺反子载体编码,所述多顺反子载体包含:

(i)至少两个双顺反子单元,其中每个双顺反子单元包含驱动经由切割肽连接至第二转基因的第一转基因的启动子;和

(ii)至少两种非多顺反子转基因,其中每种非多顺反子转基因由其自身的启动子驱动。

48.根据权利要求43-47中任一项所述的方法,其中:

(a)至少一个双顺反子单元由组织特异性启动子驱动;

(b)至少一个双顺反子单元由诱导型启动子驱动;和/或

(c)至少两个双顺反子单元由专用的组成型启动子驱动。

49.根据权利要求47所述的方法,其中所述至少两个双顺反子单元各自由组成型启动子驱动,并且所述至少两种非多顺反子转基因各自由组织特异性启动子驱动。

50.根据权利要求48-49中任一项所述的方法,其中:

(i)所述组成型启动子选自由CAG启动子、Tie-2启动子、ICAM-2启动子组成的组;

(ii)所述诱导型启动子是四环素/多西环素调节启动子;

(ii)所述组织特异性启动子是内皮细胞特异性启动子;和/或

(iii)所述组织特异性启动子选自猪血栓调节蛋白启动子(pTBMpr)、人血栓调节蛋白启动子、猪EPCR启动子、人EPCR启动子。

51.根据权利要求40-50中任一项所述的方法,其中所述至少两种补体抑制剂是:

(i)选自由CD46、DAF(CD55)、CD59、CR1及其组合组成的组;

(ii)遍在表达的;

(iii)在诱导型启动子的控制下;和/或

(iv)在组成型启动子的控制下。

52.根据权利要求40-51中任一项所述的方法,其中所述至少一种免疫抑制转基因是:

(i)选自由细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、分化簇47(CD47)和II类反式激活因子-DN(CIITA-DN)组成的组;

(ii)在诱导型启动子的控制下;和/或

(ii)在组成型启动子的控制下。

53.根据权利要求40-52中任一项所述的方法,其中所述至少一种细胞保护转基因是:

(i)在组成启动子的控制下;

(ii)在诱导型启动子的控制下;

(iii)在内皮特异性启动子的控制下;和/或

(iv)选自由血红素加氧酶1(HO-1)、A20、FAT-1、可溶性肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及其组合组成的组。

54.根据权利要求40-53中任一项所述的方法,其中所述至少两种抗凝转基因是:

(i)在内皮特异性启动子的控制下;

(ii)在诱导型启动子的控制下;和/或

(iii)选自由内皮蛋白C受体(EPCR)、血栓调节蛋白、CD39、水蛭素、组织因子途径抑制剂(TFPI)及其组合组成的组。

55.根据权利要求43所述的方法,其中所述多顺反子载体包含选自由以下组成的组的双顺反子单元:

(i)驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪TBM启动子(pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);

(ii)驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD47转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD47-2A-hHO1]);

(iii)驱动经由2A肽连接至人DAF转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-2A-hDAF]);

(iv)Poly-A信号融合至猪TBM启动子,其驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因(PolyA/pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);

(v)驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD59转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD59-2A-hHO1]);

(vi)驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪EPCR启动子(pEPCRpr[hTBM-2A-hEPCR]);

(vii)驱动经由2A肽连接至人CD47转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-2A-hCD47]);

(viii)驱动第一GHR gRNA的第一U6启动子,连接至驱动第二GHR gRNA的第二U6启动子(U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2]),其中第一gRNA和第二gRNA相同或不同;

(xix)驱动Cas核酸内切酶的TRE3G启动子,经由绝缘子连接至驱动tTA的CAG启动子(TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA]);和

(x)其组合。

56.根据权利要求43所述的方法,其中所述多顺反子载体包含:

(i)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD47-2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];

(ii)PolyA-pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD47-2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];

(iii)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-P2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-P2A-hDAF];

(iv)PolyA-pTBMpr[hTBM];CAG pr[hCD47-P2A-hHO1];pEPCRpr[hEPCR];和CAGpr[hCD46P-2A-hDAF];

(v)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-P2A-hHO1];CAGpr[hCD46-2A-hCD47];

(vi)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-2A-hHO1];CAGpr[hCD46-2A-hCD55];

(vii)U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2];TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA];CAGpr[hCD46-2A-hCD55];

(viii)SEQ ID NO:7;

(xix)SEQ ID NO:8;

(x)SEQ ID NO:9;

(xi)SEQ ID NO:11;

(xii)SEQ ID NO:12;

(xiii)SEQ ID NO:13;或

(xiv)SEQ ID NO:14。

57.根据权利要求40-56中任一项所述的方法,其中所述单个基因组基因座是天然基因座或修饰的天然基因座。

58.根据权利要求57所述的方法,其中所述修饰的天然基因座包含:

(i)基因编辑介导的插入、缺失或取代;

(ii)转基因DNA;

(iii)选择性基因标志物;和/或

(iv)着陆区。

59.根据权利要求40-58中任一项所述的方法,其中所述单个基因组基因座选自由AAVS1、ROSA26、CMAH、GHR、B4GalNT2和GGTA1组成的组。

60.根据权利要求43-59中任一项所述的方法,其中编码转基因的多顺反子载体进一步包含用于在基因座处同源重组和/或同源定向修复(HDR)的核苷酸序列,所述基因座选自由AAVS1、ROSA26、GHR、CMAH、B4GalNT2和GGTA1组成的组。

61.根据权利要求40-60中任一项所述的方法,其中所述转基因猪动物进一步包含至少一个另外的基因修饰,所述另外的基因修饰选自由以下组成的组:基因敲除;基因敲入;基因替换;点突变;基因、基因片段或核苷酸的缺失、插入或取代;大基因组插入;或其组合。

62.根据权利要求61所述的方法,其中所述转基因猪动物包含选自由AAVS1、ROSA26、CMAH、B4GalNT2、GGTA1和GHR组成的组的基因的敲除。

63.根据权利要求61-62中任一项所述的方法,其中所述基因敲除包含:

(i)基因编辑介导的插入、缺失或取代;

(ii)CRISPR-Cas9介导的基因编辑;

(iii)同源重组介导的插入;和/或

(iv)NeoR插入介导的基因敲除。

64.根据权利要求63所述的方法,其中所述单个基因组基因座是CMAH,并且所述另外的修饰包含β4GalNT2、GGTA1和GHR的敲除。

65.根据权利要求63所述的方法,其中所述单个基因组基因座是β4GalNT2,并且所述另外的修饰包含CMAH、GGTA1和GHR的敲除。

66.根据权利要求63所述的方法,其中所述单个基因组基因座是GGTA1,并且所述另外的修饰包含β4GalNT2、CMAH和GHR的敲除。

67.根据权利要求34-38中任一项所述的方法,其中在将源自所述转基因猪动物的器官、组织或细胞移植至受试者体内时,所述受试者比移植源自野生型猪动物的器官、组织或细胞的受试者存活长至少30天。

68.根据权利要求67所述的方法,其中所述器官是心脏、肾脏、肺或其片段。

69.根据权利要求67或68所述的方法,其中在移植之前,将所述器官转移至离体灌注处理系统。

70.根据权利要求67-69中任一项所述的方法,其中所述受试者是

(a)哺乳动物,

(b)人或非人灵长类动物;

(c)猴或狒狒。

71.根据权利要求67-70中任一项所述的方法,其中在将源自所述转基因猪动物的器官、组织或细胞移植至受试者体内时,所述受试者存活至少60天。

72.根据权利要求24所述的转基因猪动物或权利要求63所述的方法,其中所述CRISPR/Cas9介导的基因编辑包含:

(a)诱导型启动子或诱导型系统;

(b)四环素/多西环素调节系统;

(c)多顺反子载体,其包含U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2];TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA];CAGpr[hCD46-2A-hCD55];或

(d)SEQ ID NO:9的核苷酸序列。

73.根据权利要求70所述的转基因猪动物或方法,其中所述诱导型启动子控制生长激素受体基因的表达。

用于异种移植的包含十个基因修饰的多转基因猪

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年9月20日提交的美国临时专利申请号63/261,393的优先权的权益,在此出于任何和所有目的通过引用以其全文并入。

技术领域

[0003] 本公开总体涉及异种移植疗法,并且更具体地涉及包含至少十个基因修饰的多转基因猪动物,这使这些猪动物以及源自该猪动物的组织和/或细胞成为适合于异种移植的供体。

[0004] 背景

[0005] 以下对本技术背景的描述仅为了有助于理解本技术而提供,并且不被承认描述或构成本技术的现有技术。

[0006] 异种移植(移植来自不同物种供体的器官、组织和细胞)可以有效解决人供体短缺问题。虽然异种移植在许多方面有优势,但它比同种异体移植产生更复杂的免疫学情况。异种移植最严重的障碍是通过一系列免疫机制对移植器官的排斥反应,分为三个阶段:超急性排斥反应(HAR)、急性体液异种移植物排斥反应(AHXR)和T细胞介导的细胞排斥反应。HAR是极快速事件,在移植物再灌注后数分钟至数小时内导致不可逆的移植物损伤和损失。

[0007] 在通过对供体动物进行基因修饰来解决异种移植造成的免疫屏障问题方面已经付出相当大的努力。最常用的供体动物是猪。猪一直是大多数异种移植研究的焦点,因为猪与人有许多共同的解剖学和生理学特征。此外,猪的妊娠期相对较短,并且可以在无病原体的环境中饲养。因为猪通常被人用作食物来源,所以猪也不存在与大多数动物研究(例如,灵长类动物)相关的相同伦理问题。

[0008] 在克服临床前模型中使用猪器官的生物学障碍方面已经取得了重大进展,在一些心脏和肾脏系列中,器官功能的保持和受体存活期达到数月至数年。缺乏α-1,3-Gal表位(引发从猪到灵长类动物的异种移植物的HAR的主要异种抗原)的基因修饰的猪被认为是进一步基因修饰的基础,其可以解决猪和灵长类动物凝血系统之间的其他排斥机制和不相容性。虽然多个基因修饰对于成功的异种移植是必要的,但它们也带来了挑战,包括与生产相关的挑战。因此,需要稳定表达多种免疫调节转基因的转基因猪来克服异种移植排斥反应。通过含有多个单转基因的传统育种生成多转基因猪迄今已取得很大成功。然而,育种既耗时又昂贵,而且随着时间的推移,转基因的一致表达水平可能成为问题。

[0009] 开发用于将多种转基因插入单个基因座,以及插入各种细胞类型和动物中的多顺反子表达系统,是生成多转基因猪的有前景的技术。尽管仍处于起步阶段,但多顺反子表达系统代表了通常用于生成多转基因猪的传统方法的替代方案。这项技术有一定的缺点,而且效率尚不高。例如,包含三种基因的多顺反子系统可能仅产生表达其中两种基因的转基因猪。此外,多顺反子系统下游基因的有效表达取决于上游基因的表达。

[0010] 因此,需要使用多顺反子表达系统的新方法,其在用于异种移植疗法的多转基因供体动物(即猪)中产生稳定的整合和足够的转基因表达。本公开解决了这种需求。

[0011] 本技术概述

[0012] 实施方案涉及转基因动物(例如,转基因猪动物),源自该转基因动物的器官、组织和细胞,其特别可用于异种移植疗法。具体地,实施方案提供了转基因猪动物,以及源自该转基因猪动物的器官、组织和细胞,其缺乏功能性α1,3半乳糖基转移酶(GTKO)基因的任何表达,并且包含在单个多基因表达载体内至少三个启动子的控制下的至少六种转基因,并且进一步包含至少四个另外的基因修饰。另一个实施方案是生成转基因动物(例如,转基因猪动物)的改进方法,以及使用该转基因动物,源自该转基因动物的器官、组织和细胞用于异种移植疗法和治疗疾病或病况的方法。本文提供的方法有利于有效生成多转基因种源(founder)动物(例如猪),以及育种和生产群的扩大。生成多转基因种源动物的新型、改进且高效的方法基于在单个多基因表达载体中识别和插入六种人转基因,以及将多基因表达载体(多顺反子(polycistronic)或多顺反子载体(multicistronic vector,MCV))靶向插入至已知的基因座或着陆区(landing pad),以在转基因动物和移植的器官、组织和/或细胞中进行可靠且一致的转基因表达。

[0013] 在一个方面,本公开提供了转基因猪动物,其包含导致以下的基因修饰:(i)缺乏功能性α1,3半乳糖基转移酶的表达;和(ii)在单个基因组基因座处掺入和表达(a)至少两种补体抑制剂转基因;(b)至少一种免疫抑制转基因;(c)至少一种细胞保护转基因;和(d)至少两种抗凝转基因。在一些实施方案中,转基因是人cDNA。在一些实施方案中,该转基因动物包含至少六种、至少七种或至少八种转基因。在一些实施方案中,该转基因动物包含至少六种转基因。在一些实施方案中,该至少六种转基因由多顺反子载体(polycistronic vector)(多顺反子载体(multicistronic vector,MCV))编码。在一些实施方案中,该多顺反子载体包含至少三个双顺反子单元。在一些实施方案中,每个双顺反子单元包含驱动经由切割肽连接至第二转基因的第一转基因的启动子。在一些实施方案中,第一双顺反子单元包含至少两种抗凝转基因,第二双顺反子包含至少两种补体抑制剂转基因;并且第三双顺反子单元包含至少一种细胞保护转基因和至少一种免疫抑制转基因。在一些实施方案中,该切割肽选自由T2A、P2A、F2A和E2A组成的组。

[0014] 在一些实施方案中,转基因由多顺反子载体编码,该多顺反子载体包含:(i)至少两个双顺反子单元,其中每个双顺反子单元包含驱动经由切割肽连接至第二转基因的第一转基因的启动子;和(ii)至少两种非多顺反子转基因,其中每种非多顺反子转基因由其自身的启动子驱动。在一个实施方案中,至少一个双顺反子单元由组织特异性启动子驱动,至少一个双顺反子单元由诱导型启动子驱动;和/或至少两个双顺反子单元由专用的组成型启动子驱动。在一个实施方案中,至少两个双顺反子单元各自由组成型启动子驱动,并且至少两种非多顺反子转基因各自由组织特异性启动子驱动。

[0015] 在一些实施方案中,转基因在多顺反子载体(MCV)内的至少三个启动子的控制下。在一些实施方案中,启动子是组成型启动子或组织特异性启动子。在一些实施方案中,组成型启动子选自由CAG启动子、Tie-2启动子、ICAM-2启动子组成的组。在一些实施方案中,组织特异性启动子是内皮细胞特异性启动子。在一些实施方案中,诱导型启动子是四环素/多西环素调节启动子。在一些实施方案中,组织特异性启动子选自猪血栓调节蛋白启动子(pTBMpr)、人血栓调节蛋白启动子、猪EPCR启动子、人EPCR启动子。

[0016] 在一些实施方案中,转基因猪动物包含在单个基因组基因座处掺入和表达至少两

种补体抑制剂,该至少两种补体抑制剂选自由CD46、DAF(CD55)、CD59、CR1及其组合组成的组。在一些实施方案中,该至少两种补体抑制剂是遍在表达的和/或在组成型启动子的控制下或在诱导型启动子的控制下表达。

[0017] 在一些实施方案中,转基因猪动物包含在单个基因组基因座处掺入和表达至少一种免疫抑制转基因,该至少一种免疫抑制转基因选自由细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、分化簇47(CD47)和II类反式激活因子-DN(CIITA-DN)组成的组。在一些实施方案中,该至少一种免疫抑制转基因在组成型启动子的控制下。

[0018] 在一些实施方案中,转基因猪动物包含在单个基因组基因座处掺入和表达至少一种细胞保护转基因,该至少一种细胞保护转基因选自由血红素加氧酶1(HO-1)、A20、FAT-1、可溶性肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及其组合组成的组。在一些实施方案中,该至少一种细胞保护在组成型启动子的控制下,或在内皮特异性启动子的控制下。

[0019] 在一些实施方案中,转基因猪动物包含在单个基因组基因座处掺入和表达至少两种抗凝转基因,该至少两种抗凝转基因选自由内皮蛋白C受体(EPCR)、血栓调节蛋白、CD39、水蛭素、组织因子途径抑制剂(TFPI)及其组合组成的组。在一些实施方案中,该至少两种抗凝转基因在内皮特异性启动子的控制下。

[0020] 在一些实施方案中,至少六种转基因由多顺反子载体编码,并且该多顺反子载体包含选自由以下组成的组的双顺反子单元:(i)驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪TBM启动子(pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);(ii)驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD47转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD47-2A-hHO1]);(iii)驱动经由2A肽连接至人DAF转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-2A-hDAF]);(iv)Poly-A信号融合至猪TBM启动子,其驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因(PolyA/pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);(v)驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD59转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD59-2A-hHO1]);(vi)驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪EPCR启动子(pEPCRpr[hTBM-2A-hEPCR]);(vii)驱动经由2A肽连接至人CD47转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-2A-hCD47]);(viii)驱动第一GHR gRNA的第一U6启动子,连接至驱动第二GHR gRNA的第二U6启动子(U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2]),其中第一gRNA和第二gRNA相同或不同;(xix)驱动Cas核酸内切酶的TRE3G启动子,经由绝缘子连接至驱动tTA的CAG启动子(TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA]);和(x)其组合。

[0021] 在一些实施方案中,多顺反子载体包含:(i)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD47-2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];(ii)PolyA-pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD47-2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];(iii)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-P2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-P2A-hDAF];(iv)PolyA-pTBMpr[hTBM];CAG pr[hCD47-P2A-hHO1];pEPCRpr[hEPCR];和CAGpr[hCD46P-2A-hDAF];(v)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-P2A-hHO1];CAGpr[hCD46-2A-hCD47];(vi)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-2A-hHO1];CAGpr[hCD46-2A-hCD55];(vii)U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2];TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA];CAGpr[hCD46-2A-hCD55];(viii)SEQ ID NO:7;(xix)SEQ ID NO:8;(x)SEQ ID NO:9;(xi)SEQ ID NO:11;(xii)SEQ ID NO:12;(xiii)SEQ ID NO:13;或(xiv)SEQ ID NO:14。

[0022] 在一些实施方案中,转基因猪动物包含导致以下的基因修饰:(i)缺乏功能性α1,3

半乳糖基转移酶的表达;(ii)在单个基因组基因座处掺入和表达,并且该单个基因组基因座是天然基因座或修饰的天然基因座。在一些实施方案中,修饰的天然基因座包含:(i)基因编辑介导的插入、缺失或取代;(ii)转基因DNA;(iii)选择性基因标志物;和/或(iv)着陆区。在一些实施方案中,单个基因组基因座选自由AAVS1、GHR、ROSA26、CMAH、B4GalNT2和GGTA1组成的组。

[0023] 在一些实施方案中,编码转基因的多顺反子载体进一步包含用于在基因座处同源重组和/或同源定向修复(HDR)的核苷酸序列,该基因座选自由AAVS1、GHR、ROSA26、CMAH、B4GalNT2和GGTA1组成的组。

[0024] 在一个方面,本公开提供了转基因猪动物,其包含导致以下的基因修饰:(i)缺乏功能性α1,3半乳糖基转移酶的表达;(ii)在单个基因组基因座处掺入和表达(a)至少两种补体抑制剂转基因;(b)至少一种免疫抑制转基因;(c)至少一种细胞保护转基因;和(d)至少两种抗凝转基因;以及(iii)进一步包含至少一个另外的基因修饰,该另外的基因修饰选自由以下组成的组:基因敲除;基因敲入;基因替换;点突变;基因、基因片段或核苷酸的缺失、插入或取代;大基因组插入;或其组合。

[0025] 在一些实施方案中,转基因猪动物进一步包含选自由AAVS1、GHR、ROSA26、CMAH、B4GalNT2、GGTA1和生长激素受体(GHR)组成的组的基因的敲除。在一些实施方案中,基因敲除包含:(i)基因编辑介导的插入、缺失或取代;(ii)CRISPR-Cas9介导的基因编辑;(iii)同源重组介导的插入;和/或(iv)NeoR插入介导的基因敲除。

[0026] 在一些实施方案中,单个基因组基因座是CMAH,并且另外的修饰包含β4GalNT2、GGTA1和GHR的敲除。在一些实施方案中,单个基因组基因座是β4GalNT2,并且另外的修饰包含CMAH、GGTA1和GHR的敲除。在一些实施方案中,单个基因组基因座是GGTA1,并且另外的修饰包含β4GalNT2、CMAH和GHR的敲除。

[0027] 在一个方面,本公开提供了源自本发明的转基因猪动物的细胞。在一个方面,本公开提供了源自本发明的转基因猪动物的器官。在一些实施方案中,器官选自由心脏、肺、肝脏、胰腺和肾脏组成的组。在一个方面,本公开提供了源自本发明的转基因猪动物的组织。在一些实施方案中,组织选自由血管组织、心脏瓣膜、视网膜组织、神经组织和角膜组织组成的组。在一些实施方案中,血管组织是血管移植物。

[0028] 在一个方面,本公开提供了用于异种移植的方法,其包括向有需要的受试者施用源自本发明的转基因猪动物的器官、组织或细胞。在一些实施方案中,受试者是非人灵长类动物或人。在一些实施方案中,器官选自由心脏、肺、肝脏、胰腺和肾脏组成的组。在一些实施方案中,组织选自由血管组织、视网膜组织、神经组织和角膜组织组成的组。

[0029] 在一个方面,本公开提供了用于异种移植的方法,其包括向有需要的受试者施用源自本发明的转基因猪动物的器官、组织或细胞,并且进一步包括在异种移植器官、组织或细胞后,向受试者施用临床相关的免疫抑制方案。

[0030] 在一个方面,本公开提供了制备本发明的转基因猪动物的方法。在一个方面,本公开提供了制备包含至少六种转基因的转基因猪的方法,其包括以下步骤:(i)用单个多顺反子载体转染猪细胞,该单个多顺反子载体包含:(a)至少两种补体抑制剂转基因;(b)至少一种免疫抑制转基因;(c)至少一种细胞保护转基因;和(d)至少两种抗凝转基因;(ii)通过在单个基因组基因座处掺入和表达多顺反子载体来产生包含至少六种转基因的多转基因猪

细胞;(iii)通过将多转基因猪细胞的细胞核注射至重建的体细胞核移植(SCNT)来生成多转基因猪合子;和(iv)允许多转基因猪合子成熟为多转基因猪(例如转基因猪)。在一些实施方案中,猪细胞和多转基因猪(例如转基因猪)缺乏α1,3半乳糖基转移酶(GTKO)的表达。

[0031] 在一些实施方案中,猪细胞是体细胞。在一些实施方案中,多转基因猪细胞包含至少七种、至少八种、至少九种或至少十种转基因。在一些实施方案中,至少六种转基因由多顺反子载体编码,并且任选地多顺反子载体包含至少三个双顺反子单元。在一些实施方案中,每个双顺反子单元包含驱动经由切割肽连接至第二转基因的第一转基因的启动子。在一些实施方案中,第一双顺反子单元包含至少两种抗凝转基因,第二双顺反子包含至少两种补体抑制剂转基因;并且第三双顺反子单元包含至少一种细胞保护转基因和至少一种免疫抑制转基因。

[0032] 在一些实施方案中,切割肽选自由T2A、P2A、F2A和E2A组成的组。在一些实施方案中,至少六种转基因由多顺反子载体编码,该多顺反子载体包含:(i)至少两个双顺反子单元,其中每个双顺反子单元包含驱动经由切割肽连接至第二转基因的第一转基因的启动子;和(ii)至少两种非多顺反子转基因,其中每种非多顺反子转基因由其自身的启动子驱动。

[0033] 在一些实施方案中,至少一个双顺反子单元由组织特异性启动子驱动,至少一个双顺反子单元由诱导型启动子驱动,和/或至少两个双顺反子单元由专用的组成型启动子驱动。在一些实施方案中,至少两个双顺反子单元各自由组成型启动子驱动,并且至少两种非多顺反子转基因各自由组织特异性启动子驱动。在一些实施方案中,转基因在多顺反子载体(例如,MCV)内的至少三个启动子的控制下。在一些实施方案中,启动子是组成型启动子或组织特异性启动子。在一些实施方案中,组成型启动子选自由CAG启动子、Tie-2启动子、ICAM-2启动子组成的组。在一些实施方案中,诱导型启动子是四环素/多西环素调节启动子。在一些实施方案中,组织特异性启动子是选自猪血栓调节蛋白启动子(pTBMpr)、人血栓调节蛋白启动子、猪EPCR启动子、人EPCR启动子的内皮细胞特异性启动子。

[0034] 在一些实施方案中,制备包含至少六种转基因的转基因猪的方法包括用包含至少两种补体抑制剂的单个多顺反子载体转染猪细胞的步骤。在一些实施方案中,至少两种补体抑制剂选自由CD46、DAF(CD55)、CD59、CR1及其组合组成的组。在一些实施方案中,至少两种补体抑制剂是遍在表达的;和/或在组成型启动子、诱导型启动子的控制下。

[0035] 在一些实施方案中,制备包含至少六种转基因的转基因猪的方法包括用包含至少一种免疫抑制转基因的单个多顺反子载体转染猪细胞的步骤。在一些实施方案中,至少一种免疫抑制转基因选自由细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、分化簇47(CD47)和II类反式激活因子-DN(CIITA-DN)组成的组。在一些实施方案中,至少一种免疫抑制转基因在组成型启动子的控制下。

[0036] 在一些实施方案中,制备包含至少六种转基因的转基因猪的方法包括用包含至少一种细胞保护转基因的单个多顺反子载体转染猪细胞的步骤。在一些实施方案中,至少一种细胞保护转基因在组成型启动子的控制下;或在内皮特异性启动子的控制下。在一些实施方案中,至少一种细胞保护转基因选自由血红素加氧酶1(HO-1)、A20、FAT-1、可溶性肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及其组合组成的组。

[0037] 在一些实施方案中,制备包含至少六种转基因的转基因猪的方法包括用包含至少

两种抗凝转基因的单个多顺反子载体转染猪细胞的步骤。在一些实施方案中,至少两种抗凝转基因在内皮特异性启动子的控制下。在一些实施方案中,至少两种抗凝转基因选自由内皮蛋白C受体(EPCR)、血栓调节蛋白、CD39、水蛭素、组织因子途径抑制剂(TFPI)及其组合组成的组。

[0038] 在一些实施方案中,制备包含至少六种转基因的转基因猪的方法包括用单个多顺反子载体转染猪细胞的步骤。在一些实施方案中,多顺反子载体包含选自由以下组成的组的双顺反子单元:(i)驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪TBM启动子(pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);(ii)驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD47转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD47-2A-hHO1]);(iii)驱动经由2A肽连接至人DAF转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-2A-hDAF]);(iv)Poly-A信号融合至猪TBM启动子,其驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因(PolyA/pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);(v)驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD59转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD59-2A-hHO1]);(vi)驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪EPCR启动子(pEPCRpr[hTBM-2A-hEPCR]);(vii)驱动经由2A肽连接至人CD47转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-2A-hCD47]);(viii)驱动第一GHR gRNA的第一U6启动子,连接至驱动第二GHR gRNA的第二U6启动子(U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2]),其中第一gRNA和第二gRNA相同或不同;(xix)驱动Cas核酸内切酶的TRE3G启动子,经由绝缘子连接至驱动tTA的CAG启动子(TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA]);和(x)其组合。

[0039] 在一些实施方案中,多顺反子载体包含:(i)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD47-2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];(ii)PolyA-pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD47-2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];(iii)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-P2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-P2A-hDAF];(iv)PolyA-pTBMpr[hTBM];CAG pr[hCD47-P2A-hHO1];pEPCRpr[hEPCR];和CAGpr[hCD46P-2A-hDAF];(v)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-P2A-hHO1];CAGpr[hCD46-2A-hCD47];(vi)pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-2A-hHO1];CAGpr[hCD46-2A-hCD55];(vii)U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2];TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA];CAGpr[hCD46-2A-hCD55];(viii)SEQ ID NO:7;(xix)SEQ ID NO:8;(x)SEQ ID NO:9;(xi)SEQ ID NO:11;(xii)SEQ ID NO:12;(xiii)SEQ ID NO:13;或(xiv)SEQ ID NO:14。

[0040] 在一些实施方案中,制备包含至少六种转基因的转基因猪的方法包括通过在单个基因组基因座处掺入和表达多顺反子载体来产生包含至少六种转基因的多转基因猪细胞的步骤。在一些实施方案中,单个基因组基因座是天然基因座或修饰的天然基因座。在一些实施方案中,修饰的天然基因座包含:(i)基因编辑介导的插入、缺失或取代;(ii)转基因DNA;(iii)选择性基因标志物;和/或(iv)着陆区。在一些实施方案中,单个基因组基因座选自由AAVS1、ROSA26、CMAH、GHR、B4GalNT2和GGTA1组成的组。在一些实施方案中,编码转基因的多顺反子载体进一步包含用于在基因座处同源重组和/或同源定向修复(HDR)的核苷酸序列,该基因座选自由AAVS1、GHR、ROSA26、CMAH、B4GalNT2和GGTA1组成的组。

[0041] 在一个方面,本公开提供了制备包含至少六种转基因的转基因猪的方法,其包括以下步骤:(i)用单个多顺反子载体转染猪细胞,该多顺反子载体包含:(a)至少两种补体抑制剂转基因;(b)至少一种免疫抑制转基因;(c)至少一种细胞保护转基因;和(d)至少两种

抗凝转基因;(ii)通过在单个基因组基因座处掺入和表达多顺反子载体来产生包含至少六种转基因的多转基因猪细胞,并且该多转基因猪细胞进一步包含至少一个另外的基因修饰;(iii)通过将多转基因猪细胞的细胞核注射至重建的体细胞核移植(SCNT)来生成多转基因猪合子;和(iv)允许多转基因猪合子成熟为多转基因猪。在一些实施方案中,猪细胞和多转基因猪缺乏α1,3半乳糖基转移酶(GTKO)的表达,并且多转基因(例如转基因)猪动物进一步包含至少一个另外的基因修饰。在一些实施方案中,至少一个另外的基因修饰选自由以下组成的组:基因敲除;基因敲入;基因替换;点突变;基因、基因片段或核苷酸的缺失、插入或取代;大基因组插入;或其组合。在一些实施方案中,转基因猪动物包含选自由AAVS1、ROSA26、CMAH、B4GalNT2、GGTA1和生长激素受体(GHR)组成的组的基因的敲除。在一些实施方案中,基因敲除包含:(i)基因编辑介导的插入、缺失或取代;(ii)CRISPR-Cas9介导的基因编辑;(iii)同源重组介导的插入;和/或(iv)NeoR插入介导的基因敲除。

[0042] 在一些实施方案中,单个基因组基因座是CMAH,并且另外的修饰包含β4GalNT2、GGTA1和GHR的敲除。在一些实施方案中,单个基因组基因座是β4GalNT2,并且另外的修饰包含CMAH、GGTA1和GHR的敲除。在一些实施方案中,单个基因组基因座是GGTA1,并且另外的修饰包含β4GalNT2、CMAH和GHR的敲除。

[0043] 附图简述

[0044] 图1A-B显示了示出本公开的多基因载体的一些实施方案的示意图。具体地,B200(SEQ ID NO:11)、B201(SEQ ID NO:12)、B202(SEQ ID NO:13)、B209(SEQ ID NO:14)、B212(SEQ ID NO:7)、B214(SEQ ID NO:8)和B217(SEQ ID NO:9)多顺反子载体的示意图。B200载体是包含三个双顺反子单元(pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]/CAGpr[hCD47-2A-hHO1]/CAGpr[hCD46-2A-hDAF])的多顺反子载体(MCV),靶向臂位于其侧翼,用于在CMAH基因座处进行同源定向修复(HDR)。B201载体是包含三个双顺反子单元(PolyA/pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]/CAGpr[hCD47-2A-hHO1]/CAGpr[hCD46-2A-hDAF])的MCV,靶向臂位于其侧翼,用于在GGTA1/Neo基因座处进行HDR。B202载体是包含两个单顺反子单元(PolyA/pTBMpr[hTBM];pEPCRpr[hEPCR])和两个双顺反子单元的MCV,按以下顺序排列:(PolyA/pTBMpr[hTBM];CAGpr[hCD47-2A-hHO1];pEPCRpr[hEPCR]/CAGpr[hCD46P-2A-hDAF],并且靶向臂位于其侧翼,用于在GGTA1/Neo基因座处进行HDR。B209载体是包含三个双顺反子单元(pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]/CAGpr[hCD47-2A-hHO1]/CAGpr[hCD46-2A-hDAF])的MCV,靶向臂位于其侧翼,用于在CMAH基因座处进行HDR。B212载体是包含三个双顺反子单元(pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]/CAGpr[hCD59-2A-hHO1]/CAGpr[hCD46-2A-hCD47])的MCV,靶向臂位于其侧翼,用于在GGTA1/Neo基因座处进行HDR。B214载体是包含三个双顺反子单元(pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]/CAGpr[hCD59-2A-hHO1]/CAGpr[hCD46-2A-hCD55])的MCV,靶向臂位于其侧翼,用于在GGTA1/Neo基因座处进行HDR。B217载体是包含五个表达单元(U6启动子[GHRgRNA-1]/U6启动子[GHRgRNA-2]/,TRE3G[CAS9]/CAGpr[tTA]/CAGpr[hCD46-2A-hCD55])的MCV,靶向臂位于其侧翼,用于在GGTA1/Neo基因座处进行HDR。

[0045] 图2A-H显示了本文所述的载体的示例性实施方案的示意图,其用于产生包含至少10个修饰的多转基因动物(即10GE猪),其可以包含4种猪基因(GGTA1、CMAH、B4GalNT2和生长激素受体(GHR))的功能性敲除以及包含六种人转基因的多顺反子载体(6-基因载体)的靶向整合。图2A示出了B200载体(SEQ ID NO:11)插入CMAH基因座。图2B示出了B201载体

(SEQ ID NO:12)插入GGTA1/Neo基因座。图2C示出了B202载体(SEQ ID NO:13)插入GGTA1/Neo基因座。图2D示出了B209载体(SEQ ID NO:14)插入CMAH。图2E示出了B212(SEQ ID NO:7)插入GGTA1/Neo基因座。图2F示出了B214(SEQ ID NO:8)插入GGTA1/Neo基因座。图2G示出了B217(SEQ ID NO:9)插入GGTA1/Neo基因座。图2H显示了B217载体的示意图和用于产生包含至少10个修饰的多转基因动物(即10GE猪)的本文所述的载体的示例性实施方案的示意图。

[0046] 图3A-C显示了来自表达本发明的载体的转基因动物的组织的western印迹分析,表明由B200、B201、B202和B209编码的转基因在心脏(图3A)、肺(图3B)和肾脏(图3C)中的蛋白表达。通过western印迹,来自转基因组织样品的转基因蛋白具有预期分子量。

[0047] 图4显示了示出对表达B200载体(n=3)、B201载体(n=4)和B202(n=4)的转基因猪主动脉内皮细胞(pAEC)进行补体依赖性细胞毒性(CDC)测定的结果的柱状图。与表达B200、B201和B202载体的pAEC(分别为3.7%、3.4%、2.2%)相比,显著更多的血清处理的GTKO pAEC被裂解(87%)(P<.01),表明hCD46和hDAF补体抑制剂转基因具有功能性。CDC测定的定量如表1所示。柱表示添加补体后60分钟裂解细胞的百分比。左柱是血清处理的孔,以及右柱是未处理的孔。GTKO pAEC(仅GGTA1敲除(KO);缺乏人补体抑制剂的表达;n=1)作为对照。每个处理运行三个重复孔。使用GraphPad Prism软件分析数据。

[0048] 图5显示了示出对表达B200(n=3)、B201(n=4)和B202(n=2)载体的pAEC进行激活蛋白C(APC)测定的定量的柱状图,表明与GTKO阴性对照相比,B200、B201和B202 pAEC生成更多APC(P<.05),这表明hTBM和hEPCR转基因具有抗凝功能性。

[0049] 图6显示了定量对B201和GTKOpAEC进行细胞凋亡测定的结果的柱状图,并且表明虽然GTKO和B201pAEC均表现出响应于氯化血红素(hemin)处理的细胞凋亡,但B201细胞的细胞凋亡显著少于GTKO细胞。图6显示了这些细胞中表达的HO-1转基因的保护功能。GTKOpAEC不含有HO-1转基因并用作对照。

[0050] 图7A-E显示了表达由载体B200(图7A)、B201(图7B)和B202(图7C)编码的人转基因的猪肺、心脏和肾脏组织以及表达由载体B209(图7D)和B212(图7E)编码的人转基因的猪心脏和肾脏组织的免疫组化染色的代表性图像。

[0051] 图8A-B显示了移植至狒狒和人患者中的猪心脏中表达B200载体转基因的猪心脏的免疫组化染色的代表性图像。图8A显示了在移植后第126天在死后从狒狒受体立即获得的猪心脏的免疫组化染色,示出由B200载体编码的所有六种人转基因的表达。图8B显示了在移植后第60天死后立即从人移植物获得的猪心脏的免疫组化染色,表明由B200载体编码的所有六种人转基因的表达。

[0052] 图9显示了移植至狒狒中的猪肾脏中表达B201转基因的猪肾脏的免疫组化染色的代表性图像;并且表明由B201载体编码的所有人转基因的表达。在移植后第120天,在死后立即从狒狒获得并染色猪肾脏。

[0053] 图10显示了在移植至脑死亡人受体中的猪心脏中表达B209转基因的两个猪心脏样品(供体#1和供体#2)的免疫组化染色的代表性图像,并且表明由B209载体编码的所有六种人转基因的表达。死后立即获得并染色两个猪心脏样品(供体#1和供体#2)。

[0054] 发明详述

[0055] I.概述

[0056] A.用于改善异种移植的多转基因动物

[0057] 应当理解,为了提供对本技术的实质性理解,本方法的某些方面、模式、实施方案、变型和特征在下文中以各种详细程度进行描述。

[0058] 异种移植可以缓解人移植器官的严重短缺。人受体接受猪器官需要进行大量基因修饰,包括主要猪异种抗原的沉默以及关键人蛋白的表达,以调节免疫排斥、血栓形成和炎症。本公开提供了六种人转基因,当它们在猪器官中表达时,对于猪器官在非人灵长类动物以及进而在人患者中的长期存活至关重要。

[0059] 本发明涉及转基因动物,其特别可用作异种移植的器官、器官碎片(fragment)、组织或细胞的来源。具体地,本发明涉及转基因有蹄类动物,并且更具体地,转基因猪动物(猪),其可用作异种移植的器官、器官碎片、组织或细胞的来源。本发明还延伸至源自此类供体动物的器官、器官碎片、组织或细胞,产生此类供体动物的方法,以及源自此类动物的器官、器官碎片、组织或细胞在治疗疾病和病症中的用途。

[0060] 有利地,供体动物提供在移植(tx)背景下功能优于本领域已知的器官、器官碎片、组织和细胞的器官、器官碎片、组织和细胞。在不希望受任何特定理论束缚的情况下,认为本发明的器官、器官碎片、组织和细胞由于消耗性凝血病(也称为弥散性血管内凝血(DIC))以及目前在非协调性异种移植后观察到的血栓性微血管病的显著减少而具有改善的存活期和/或功能性。

[0061] 器官或器官碎片可以是任何合适的器官,例如,肺、心脏、肝脏、肾脏或胰腺。组织可以是任何合适的组织,例如,上皮组织或结缔组织。细胞可以是任何合适的细胞。细胞可以是胰岛细胞、胰腺细胞、肾细胞、心脏细胞、肝细胞或肺细胞。

[0062] 在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物,猪动物),其特别可用作肺异种移植的器官(即心脏、肾脏、肝脏、胰腺和肺)、器官碎片、组织或细胞的来源,并且延伸至源自其的器官(即心脏、肾脏、肝脏、胰腺和肺)、器官碎片、组织和细胞,以及产生转基因动物的方法和使用源自其的器官、组织和细胞进行肺异种移植的方法。

[0063] B.包含至少10个基因修饰的转基因动物

[0064] 为了促进有效生成转基因种源猪以及扩大育种和生产群,本公开的发明人将所有六种转基因包括在单个多基因表达载体中。载体插入猪基因组靶向已知允许转基因表达的特定基因座,以确保移植器官中可靠且一致的表达。多基因载体靶向已知基因座或着陆区显示出几个优点。首先,它通过防止潜在的有害随机插入来避免脱靶整合事件。第二,它促进靶向基因载体及其基因组环境(milieu)的基因型表征,以确认预期的设计。第三,将所有转基因合并至单个多基因载体中,使转基因能够作为单个基因座传递。转基因作为单个基因座的传递特别重要,因为它简化并增强了携带成功异种移植所需的所有修饰(例如4个、47个、9个、10个或15个修饰)的猪的育种。第四,单个多基因载体实现在单个步骤中添加多达至少10个修饰(例如,6种转基因加4种基因敲除),而不是在多个连续步骤中添加。因此,本公开的过程为生成多转基因动物(例如,猪)节省了数周的时间以及宝贵的实验室和动物资源。

[0065] 为了生成包含至少10个修饰(例如,6种转基因加4种基因敲除)的多转基因动物(例如,猪),生成了编码至少6种转基因的单个多基因载体。本领域技术人员理解,具有6种转基因(各自由其自身的启动子驱动)的载体的总尺寸将超过基于标准质粒的构建方法的

可行尺寸。因此,本发明人通过使用病毒来源的自切割肽(例如病毒2A序列)使启动子的数量最小化。

[0066] 用病毒2A序列连接转基因允许转基因编码的多肽/蛋白翻译自由单个启动子驱动的单个多转基因转录物。这种方法使所需启动子的数量减半,将载体减小到可行的尺寸。

[0067] 然后,设计并生成由三个双顺反子单元组成的多顺反子载体(MCV)。每个双顺反子单元含有两种人基因(例如两种人基因的cDNA),其通过如本文定义的病毒T2A或P2A肽序列连接,由内皮特异性启动子驱动。在一些实施方案中,内皮特异性启动子选自由猪血栓调节蛋白(TBM)启动子(pTBMpr);或猪内皮蛋白C受体(EPCR)启动子(pEPCRpr)组成的组。在一些实施方案中,每个双顺反子单元含有两种人基因(cDNA),其由如本文定义的病毒T2A或P2A肽序列连接,由组成型活性CAG启动子驱动。在一些实施方案中,组成型启动子选自由CMV增强子、鸡β-肌动蛋白启动子和兔β-球蛋白内含子组成的组。在一些实施方案中,双顺反子单元选自由以下组成的组:由pTBM启动子驱动的hTBM-2A-hEPCR;由CAG启动子驱动的hCD47-2A-hHO1;由CAG启动子驱动的hCD46-2A-hDAF和由CAG启动子驱动的hCD59-2A-hHO1。

[0068] 在一些实施方案中,多顺反子载体(MCV)含有人基因(例如hTBM、hEPCR、hCD47、hHO1、hCD46、hDAF、hCD59)的不同组合,并且每个双顺反子由特定启动子驱动。在一些实施方案中,MCV包含四个双顺反子单元。在一些实施方案中,MCV包含由pTBM启动子驱动的hTBM-2A-hEPCR;以及hCD47-2A-hHO1、hCD46-2A-hDAF和hCD59-2A-hHO1,其各自由CAG启动子驱动。在一些实施方案中,MCV包含hTBM和hEPCR,其分别由pTBM启动子和pEPCR启动子单独驱动。双顺反子单元包含由pTBM启动子(pTBMpr)驱动的hTBM cDNA,其经由2A肽与由pEPCR启动子(pEPCRpr)驱动的hEPCR cDNA连接(pTBMpr-hTBM-2A-pEPCRpr-hTBM)。生成了包含pTBMpr-hTBM-2A-pEPCRpr-hTBM和hCD47-2A-hHO1、hCD46-2A-hDAF和hCD59-2A-hHO1(其各自由CAG启动子驱动)的MCV。

[0069] 构建了数个双顺反子(bicistron,bi-cistron)来评价以下对转基因表达、生物学功能和支持移植器官存活的功效的影响:1)启动子,2)转基因组合,以及3)双顺反子内转基因的顺序。双顺反子被用作构建更大且更复杂的多顺反子载体(MCV)的基本单位。双顺反子组合的选择基于它们以与转基因猪的活力一致的方式适当表达转基因并增强移植器官及其受体的存活的能力。这些独特的、新型且经验证的双顺反子设计是对现有技术的改进,因为它们增强了将多种转基因有效掺入MCV中的能力,MCV过去和现在都可以靶向整合至允许的基因座(例如,CMAH、GGTA1、B4GalNT2),以确保来自单个基因组基因座的多种转基因的一致的、可预测的且适当的表达。

[0070] 为了使用双顺反子的新型且独特的组合生成多转基因动物,将所有载体引入猪胎仔成纤维细胞中,其中GGTA1基因座先前已通过NeoR插入诱变被敲除。参见,Dai,Y.etal.,Nat Biotechnol.20:251-5(2002)。为了插入进GGTA1,(B201、B202)载体配备有靶向NeoR的同源臂。

[0071] C.缺乏功能性α1,3半乳糖基转移酶和至少一个另外的基因修饰的猪动物

[0072] 有利地,源自转基因动物的器官、器官碎片、组织或细胞在异种移植后产生低水平至不产生以下一种或更多种:超急性排斥反应(HAR)、急性体液排斥反应(AHXR/DXR)和/或急性细胞异种移植排斥反应(ACXR)。

[0073] 在一个实施方案中,源自转基因动物的器官、器官碎片、组织或细胞在异种移植后

产生低水平至不产生HAR和AHXR。在另一个实施方案中,源自转基因动物的器官、器官碎片、组织或细胞在异种移植后产生低水平至不产生HAR、AHXR和ACXR。

[0074] 在示例性实施方案中,转基因动物是猪动物,其缺乏功能性α1,3半乳糖基转移酶(αGal)的任何表达(由于基因修饰或其他原因),并且掺入至少几个另外的基因修饰(例如,基因敲除,基因敲入,基因替换,点突变,(基因、基因片段或核苷酸的)缺失、插入或取代,大基因组插入或其组合)。基因修饰可以通过任何合适的技术介导,包括例如同源重组或基因编辑方法。

[0075] 在示例性实施方案中,转基因动物是猪动物,其缺乏功能性α1,3半乳糖基转移酶(αGal)的任何表达(由于基因修饰或其他原因),并且在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子的控制下。在某些实施方案中,一个启动子控制至少两种转基因的表达。例如,至少六种转基因中每一种的表达由单个(专用)启动子控制。在替代的实施方案中,一个启动子控制多于一种转基因的表达,例如,一个启动子控制两种转基因的表达。

[0076] 有利地,六种或更多种转基因在育种期间共整合、共表达和共分离。单个基因座可以变化。在某些实施方案中,单个基因座是天然的或修饰的天然基因座。修饰的天然基因座可以通过任何合适的技术进行修饰,包括但不限于CRISPR诱导的插入或缺失(插入缺失(indel))、引入选择性标志物基因(例如,neo)或引入大基因组插入物(例如,着陆区),其旨在促进一种或更多种转基因的掺入。在特定实施方案中,单个基因座是天然的或修饰的GGTA1基因座。GGTA1基因座通过掺入和表达至少六种转基因而失活,例如通过同源重组、应用基因编辑或重组酶技术。单个基因座还可以是,例如,AAVS1、GHR、ROSA26、CMAH或β4GalNT2。任选地,转基因动物可以具有一个或更多个另外的基因修饰和/或一种或更多种另外的猪基因的表达可以通过基因修饰以外的机制进行修饰。

[0077] 在示例性实施方案中,转基因动物是猪动物,其缺乏功能性α1,3半乳糖基转移酶(αGal)的任何表达(由于基因修饰或其他原因),并且在单个基因座处掺入和表达至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种或至少十种转基因或更多种转基因。在某些实施方案中,至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种或至少十种转基因或更多种转基因的表达由至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个启动子或更多个启动子控制。在某些实施方案中,启动子对于转基因是专用的,即一个启动子控制一种转基因的表达,而在替代的实施方案中,一个启动子控制多于一种转基因的表达,例如,一个启动子控制两种转基因的表达。有利地,两种或更多种另外的转基因在育种期间共整合、共表达和共分离。单个基因座可以变化。在某些实施方案中,单个基因座是天然的或修饰的天然基因座。修饰的天然基因座可以通过任何合适的技术进行修饰,包括但不限于CRISPR诱导的插入或缺失(插入缺失)、引入选择性标志物基因(例如,Neo)或引入大基因组插入物(例如,着陆区),其旨在促进一种或更多种转基因的掺入。在实施方案中,单个基因座是天然的或修饰的GGTA1基因座。

[0078] GGTA1基因座通过至少六种转基因的掺入和表达而失活,例如通过同源重组、应用基因编辑或重组酶技术。单个基因座还可以是,例如,AAVS1、GHR、ROSA26、CMAH或β4GalNT2。任选地,供体动物可以具有另外的基因修饰和/或一种或更多种另外的猪基因的表达可以

通过基因修饰以外的机制进行修饰。

[0079] 在示例性实施方案中,转基因动物是猪动物,其缺乏功能性α1,3半乳糖基转移酶(αGal)的任何表达(由于基因修饰或其他原因),并且在单个基因座(即基因座1)处掺入和表达至少六种转基因,还在第二单个基因座(即基因座2)和第三单个基因座(即基因座2)处掺入和表达一种或更多种另外的转基因。在某些实施方案中,一个启动子控制一种转基因的表达,例如,在基因座1、基因座2或基因座3处至少六种转基因中的每一种的表达由单个(专用)启动子控制。在替代的实施方案中,一个启动子控制多于一种转基因的表达,例如,一个启动子控制在基因座1处两种转基因的表达。特定基因座可以变化。在具体实施方案中,第一单个基因座是GGTA1,并且第二和第三单个基因座是,例如,CMAH、B4GalNT2或生长激素受体(GHR)。在具体实施方案中,在每个单个基因座(即基因座1、基因座2和基因座3)处掺入和表达至少六种转基因,以产生具有在两个不同且独立的基因座处表达的十二种或更多种转基因的动物。

[0080] 在某些实施方案中,单个基因座是天然的或修饰的天然基因座。修饰的天然基因座可以通过任何合适的技术进行修饰,包括但不限于CRISPR诱导的插入或缺失(插入缺失)、引入选择性标志物基因(例如,Neo)或引入大基因组插入物(例如,着陆区),其旨在促进一种或更多种转基因的掺入。任选地,供体动物可以具有另外的基因修饰和/或一种或更多种另外的猪基因的表达可以通过基因修饰以外的机制进行修饰。有利地,两种或更多种另外的转基因在育种期间共整合、共表达和共分离。

[0081] 所述至少三个启动子可以变化。启动子可以是外源的或天然的。在示例性实施方案中,启动子是组成型的或可调节的(例如,组织特异性启动子、诱导型启动子)。在一个实施方案中,所有三个启动子可以在供体动物中组成型或遍在表达(例如来自CAG、Tie-2、ICAM-2或类似启动子)。在使用三个启动子的另一个实施方案中,一个启动子将允许以组织特异性方式表达转基因(例如,内皮特异性表达,例如TBM或EPCR启动子),而第二启动子和第三启动子将允许以组成型或遍在的方式(例如来自CAG或类似启动子)表达一种或更多种转基因(在相同的整合位点处)。

[0082] 在一些实施方案中,启动子是可调节启动子。可调节启动子可以是诱导型系统的一部分。在一些实施方案中,转基因和/或CRISPR/Cas系统在诱导型启动子的控制下。例如,诱导型系统可以包括选自Tet-On或Tet-Off的四环素诱导型启动子、小分子双杂交转录激活系统(FKBP、ABA等)或光诱导型系统(光敏色素、LOV结构域或隐花色素)。在U.S.61/736,465和U.S.61/721,283和WO 2014/018423以及美国专利号8,889,418、8,895,308,US20140186919,US20140242700,US20140273234,US20140335620和WO2014093635中提供了诱导型DNA结合蛋白及其使用方法的实例。在一些实施方案中,诱导型系统是光诱导型转录效应子(LITE)系统,其以序列特异性方式引导转录活性的变化。光的组分可以包括酶或转基因、光响应性细胞色素异二聚体(例如来自拟南芥(Arabidopsis thaliana))和转录激活/抑制结构域。

[0083] 在一些实施方案中,CRISPR/Cas9介导的基因编辑包含:诱导型启动子或诱导型系统,四环素/多西环素调节系统;多顺反子载体,其包含U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2];TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA];CAGpr[hCD46-2A-hCD55];或SEQ ID NO:9的核苷酸序列。在一些实施方案中,诱导型启动子控制生长激素受体基因的表达。

[0084] 在某些实施方案中,另外的基因修饰(即除了上述多种转基因的掺入和表达之外)可以导致特定猪基因(包括但不限于,猪生长因子基因)的失活,或部分或全部猪GHR基因被来自人GHR基因的等同对应物替换。在一些实施方案中,生长激素受体基因表达由包含SEQ ID NO:9的诱导型系统控制。在一些实施方案中,GHR基因中另外的基因修饰包含多顺反子载体,其包含U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2];TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA];CAGpr[hCD46-2A-hCD55];或SEQ ID NO:9的核苷酸序列。其他可能与另外的基因修饰相关而失活的基因包括,例如,CMP-NeuAc羟化酶(CMAH)、异红细胞糖苷酯(isoGloboside)3合酶、β4Gal、NT2 Forrsman合酶或其组合。在某些实施方案中,其中用于转基因掺入的单个基因座不是GGTA1,另外的基因修饰涵盖GGTA1的失活。

[0085] 在某些实施方案中,另外的基因修饰是,例如,基因编辑诱导的缺失/插入或基因取代(INDEL)。在某些实施方案中,另外的基因修饰(即除了上述多种转基因的掺入和表达之外)可以导致在第二基因座处掺入和表达一种或更多种转基因。

[0086] 在一个实施方案中,本发明是猪动物,其缺乏功能性α1,3半乳糖基转移酶(αGal)的任何表达(由于基因修饰或其他原因),并且进一步包含猪生长激素受体(GHR)基因的失活,或部分或全部猪GHR基因被来自人GHR基因的等同对应物替换。任选地,猪动物包含一个或更多个另外的基因修饰。在某些实施方案中,该动物可以与含有一个或更多个基因修饰的第二动物一起育种。

[0087] 本发明还延伸至制备和使用此类转基因动物(或源自其的器官、组织或细胞)的方法。在示例性实施方案中,本发明提供了制备表达至少六种转基因的基因但缺乏α1,3半乳糖基转移酶表达的转基因猪的方法,其包括(i)在猪基因组内单个基因座处掺入至少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子的控制下,以提供多基因猪基因组;(ii)允许包含多基因猪基因组的细胞成熟为转基因猪。在某些实施方案中,猪基因组是体细胞猪基因组,并且细胞是猪合子。在某些实施方案中,猪基因组选自由配子猪基因组、合子猪基因组、胚胎猪基因组或囊胚猪基因组组成的组。在示例性实施方案中,掺入包含选自由生物转染、化学转染、物理转染、病毒介导的转导或转化或其组合组成的组的方法。在某些实施方案中,掺入包含细胞质显微注射和原核显微注射。

[0088] D.用于多转基因猪生成的多顺反子载体系统

[0089] 开发了多顺反子表达系统的用途,以将多种转基因插入各种细胞类型和动物中。使用2A肽双顺反子系统和经由转基因的随机整合进行核移植来表达四种荧光蛋白的转基因猪是有前景的。Deng et al.Plos One,6(5):e19986)产生。

[0090] 此外,使用IRES介导的三顺反子载体系统和核移植产生了表达补体调节因子CD59和H-转移酶基因的转基因猪。尝试使用该三顺反子系统表达三种基因,然而,尽管存在于IRES载体中,但在转基因猪中未检测到三顺反子系统中第三基因的表达。Jeong et al., Plos One,8(5):e63241。此外,另有报道,在多顺反子系统中下游基因的有效表达是不可能的,但如果上游基因的表达也有效,则可以实现。Hurh et al,Plos One,8:(7)e70486。

[0091] 在示例性实施方案中,该方法涉及使用双顺反子载体或多顺反子载体,其允许共整合和共表达转基因,具有功能和/或生产优势,包括利用2A技术的多顺反子载体。在优选的实施方案中,在含有至少六种转基因的多顺反子载体内,每个双顺反子均在其自身启动子的控制下,并且一个或更多个启动子可以导致两种或更多种基因的组成型表达,并且第

二启动子可以导致两种或更多种基因的组织特异性表达。这些载体与基因编辑工具(包括编辑核酸酶和/或位点特异性整合酶)组合使用。

[0092] 在某些实施方案中,该方法涉及使用单个多顺反子载体,其允许共整合和共表达六种或更多种转基因,以促进其中所有转基因一起共分离并作为单个单元传递给后代/子代的育种。

[0093] 1.生成包含至少六种转基因的转基因猪

[0094] 本发明提供了制备包含至少六种转基因的转基因猪的方法,其包括以下步骤:(i)用单个多顺反子载体转染猪细胞,该单个多顺反子载体包含(a)至少两种补体抑制剂转基因;(b)至少一种免疫抑制转基因;(c)至少一种细胞保护转基因;和(d)至少两种抗凝转基因;(ii)通过在单个基因组基因座处掺入和表达该多顺反子载体来产生包含至少六种转基因的多转基因猪细胞;(iii)通过将该多转基因猪细胞的细胞核注射至重建的体细胞核移植(SCNT)来生成多转基因猪合子;和(iv)允许该多转基因猪合子成熟为多转基因猪。在一些实施方案中,猪细胞和多转基因猪缺乏α1,3半乳糖基转移酶的表达。在一些实施方案中,多顺反子载体包含选自由以下组成的组的双顺反子单元:驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪TBM启动子(pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD47转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD47-2A-hHO1]);驱动经由2A肽连接至人DAF转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-2A-hDAF]);Poly-A信号融合至猪TBM启动子,其驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因(PolyA/pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD59转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD59-2A-hHO1]);驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪EPCR启动子(pEPCRpr[hTBM-2A-hEPCR]);(vii)驱动经由2A肽连接至人CD47转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-2A-hCD47]);(viii)驱动第一GHR gRNA的第一U6启动子,连接至驱动第二GHR gRNA的第二U6启动子(U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2]),其中第一gRNA和第二gRNA相同或不同;(xix)驱动Cas核酸内切酶的TRE3G启动子,经由绝缘子连接至驱动tTA的CAG启动子(TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA]);和其组合。在一些实施方案中,多顺反子载体包含:pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]、CAGpr[hCD47-2A-hHO1]和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];PolyA-pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]、CAGpr[hCD47-2A-hHO1]和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]、CAGpr[hCD59-P2A-hHO1]和CAGpr[hCD46-P2A-hDAF];PolyA-pTBMpr[hTBM]、CAG pr[hCD47-P2A-hHO1]、pEPCRpr[hEPCR]和CAGpr[hCD46P-2A-hDAF];pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]、CAGpr[hCD59-P2A-hHO1]和CAGpr[hCD46-2A-hCD47];pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]、CAGpr[hCD59-2A-hHO1]和CAGpr[hCD46-2A-hCD55];U6p[GHRgRNA-1]、U6p[GHRgRNA-2]、TRE3Gp[CAS9]、CAGpr[tTA]和CAGpr[hCD46-2A-hCD55];SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:11;SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:13;或SEQ ID NO:14。

[0095] 在一些实施方案中,猪细胞是体细胞。在一些实施方案中,多转基因猪细胞包含至少七种、至少八种、至少九种或至少十种转基因。在一些实施方案中,至少六种转基因由多顺反子载体编码,任选地其中该多顺反子载体包含至少三个双顺反子单元。在一些实施方案中,每个双顺反子单元包含驱动经由切割肽连接至第二转基因的第一转基因的启动子。在一些实施方案中,第一双顺反子单元包含至少两种抗凝转基因,第二双顺反子包含至少两种补体抑制剂转基因;并且第三双顺反子单元包含至少一种细胞保护转基因和至少一种

免疫抑制转基因。在一些实施方案中,切割肽选自由T2A、P2A、F2A和E2A组成的组。在一些实施方案中,至少六种转基因由多顺反子载体编码,该多顺反子载体包含:(i)至少两个双顺反子单元,其中每个双顺反子单元包含驱动经由切割肽连接至第二转基因的第一转基因的启动子;和至少两种非多顺反子转基因,其中每种非多顺反子转基因由其自身的启动子驱动。在一些实施方案中,至少一个双顺反子单元由组织特异性启动子驱动,并且至少两个双顺反子单元由专用的组成型启动子驱动。在一些实施方案中,至少一个双顺反子单元由诱导型启动子驱动。在一些实施方案中,至少两个双顺反子单元各自由组成型启动子驱动,并且至少两种非多顺反子转基因各自由组织特异性启动子驱动。

[0096] 2.制备包含至少六种转基因的转基因猪

[0097] 本发明提供了转基因猪动物,其包含导致以下的基因修饰:缺乏功能性α1,3半乳糖基转移酶基因的表达;和在单个基因组基因座处掺入和表达:(a)至少两种补体抑制剂转基因;(b)至少一种免疫抑制转基因;(c)至少一种细胞保护转基因;和(d)至少两种抗凝转基因。在一些实施方案中,转基因猪动物包含至少六种、至少七种或至少八种、至少九种、至少十种、至少十一种或至少十二种转基因。转基因动物包含至少六种转基因。在一些实施方案中,至少六种转基因由多顺反子载体编码,任选地多顺反子载体包含至少三个双顺反子单元。在一些实施方案中,每个双顺反子单元包含驱动经由切割肽连接至第二转基因的第一转基因的启动子。在一些实施方案中,第一双顺反子单元包含至少两种抗凝转基因,第二双顺反子包含至少两种补体抑制剂转基因;并且第三双顺反子单元包含至少一种细胞保护转基因和至少一种免疫抑制转基因。在一些实施方案中,切割肽选自由T2A、P2A、F2A和E2A组成的组。

[0098] 如本文所用,“自切割肽”或“2A肽”或“病毒2A序列”是指允许多种蛋白被编码为多蛋白(polyprotein)的寡肽,所述多蛋白在翻译时解离成组分蛋白。术语“自切割”的使用并不旨在暗示蛋白水解切割反应。各种“自切割”或“2A肽”或“病毒2A序列”是本领域技术人员已知的,包括但不限于在小核糖核酸(Picomaviridae)病毒家族的成员中发现的那些,例如,口蹄疫病毒(FMDV)、马甲型鼻炎病毒(ERAV)、Thosea asigna病毒(TaV)和猪tescho病毒-1(PTV-1);以及cariovirus,例如泰勒病毒(theilovirus)和脑心肌炎病毒。源自FMDV、ERAV、PTV-1和TaV的病毒2A序列在本文中分别称为“F2A”、“E2A”、“P2A”和“T2A”。本领域技术人员将能够选择合适的自切割肽用于本发明。

[0099] 在一些实施方案中,转基因由多顺反子载体编码,该多顺反子载体包含(i)至少两个双顺反子单元,其中每个双顺反子单元包含驱动经由切割肽连接至第二转基因的第一转基因的启动子;和(ii)至少两种非多顺反子转基因。每种非多顺反子转基因由其自己的启动子驱动。在一些实施方案中,至少一个双顺反子单元由组织特异性启动子驱动,并且至少两个双顺反子单元由专用的组成型启动子驱动。在一些实施方案中,至少两个双顺反子单元各自由组成型启动子驱动,并且至少两种非多顺反子转基因各自由组织特异性启动子驱动。

[0100] 在一些实施方案中,多顺反子载体包含选自由以下组成的组的双顺反子单元:驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪TBM启动子(pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD47转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD47-2A-hHO1]);驱动经由2A肽连接至人DAF转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-

2A-hDAF]);Poly-A信号融合至猪TBM启动子,其驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因(PolyA/pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD59转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD59-2A-hHO1]);驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪EPCR启动子(pEPCRpr[hTBM-2A-hEPCR]);驱动经由2A肽连接至人CD47转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-2A-hCD47]);驱动第一GHR gRNA的第一U6启动子,连接至驱动第二GHR gRNA的第二U6启动子(U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2]),其中第一gRNA和第二gRNA相同或不同;驱动Cas核酸内切酶的TRE3G启动子,经由绝缘子连接至驱动tTA的CAG启动子(TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA]);和其组合。在一些实施方案中,猪启动子可以是内源启动子或外源启动子。

[0101] 在一些实施方案中,多顺反子载体包含pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD47-2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];PolyA-pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD47-2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-P2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-P2A-hDAF];PolyA-pTBMpr[hTBM];CAG pr[hCD47-P2A-hHO1];pEPCRpr[hEPCR];和CAGpr[hCD46P-2A-hDAF];pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]、CAGpr[hCD59-P2A-hHO1]和CAGpr[hCD46-2A-hCD47];pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]、CAGpr[hCD59-2A-hHO1]和CAGpr[hCD46-2A-hCD55];U6p[GHRgRNA-1]、U6p[GHRgRNA-2]、TRE3Gp[CAS9]、CAGpr[tTA]和CAGpr[hCD46-2A-hCD55];SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:11;SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:13;或SEQ ID NO:14。

[0102] E.治疗方法

[0103] 本发明还延伸至用源自本发明的转基因动物的一种或更多种器官、器官碎片、组织或细胞治疗有需要的受试者的方法。在示例性实施方案中,器官是肝脏、肺、心脏、胰腺或其他实体器官。本发明设想的组织的实例包括但不限于上皮组织和结缔组织。本发明还设想了涉及多于一种器官或器官碎片的移植。例如,本发明设想了涉及肺、胰腺、肝脏、视网膜、心脏、肾脏或其片段的移植。

[0104] 本发明提供了用于异种移植的方法,其包括向有需要的受试者施用源自本发明的转基因猪动物的猪器官、组织或细胞。在一些实施方案中,受试者是非人灵长类动物或人。在一些实施方案中,器官选自由心脏、肺、肝脏和肾脏组成的组。在一些实施方案中,组织选自由血管组织、视网膜组织、神经组织和角膜组织组成的组。在一些实施方案中,治疗方法进一步包括在异种移植源自本发明的转基因猪动物的器官、组织或细胞后,向受试者施用临床相关的免疫抑制方案。

[0105] II.定义

[0106] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语大体上具有与本技术所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。如本说明书和所附权利要求中所用,单数形式“a”、“an”和“the”包括复数指示物,除非内容另外明确指出。例如,提及“细胞(a cell)”包括两个或更多个细胞的组合等。通常,本文中使用的命名法以及下文所述的细胞培养、分子遗传学、有机化学、分析化学和核酸化学以及杂交中的实验室程序是本领域熟知且普遍采用的那些。

[0107] 如本文所用,术语“不良事件”是指暂时性地与药品(例如,异种移植物)的使用相伴随的任何不利或非预期体征(例如,包括异常的实验室发现)、症状或疾病,无论是否被视

为与医疗产品相关。

[0108] 如本文所用,术语“动物”是指哺乳动物。在特定实施方案中,动物为至少六月龄。在某些实施方案中,动物处于断奶后年龄。在某些实施方案中,动物存活至达到育种年龄。本发明的动物是“基因修饰的”或“转基因的”,这意指它们具有添加或掺入的转基因或其他外来DNA,或修饰的(包括靶向的、重组的、断裂的、缺失的、破坏的、替换的、抑制的、增强的或以其他方式改变的)内源基因,以在动物的至少一个细胞中并且通常在动物的至少一个种系细胞中介导基因型或表型效应。在一些实施方案中,动物可以具有整合在其基因组的一个等位基因上的转基因(杂合转基因)。在其他实施方案中,动物可以具有在两个等位基因上的转基因(纯合转基因)。

[0109] 如本文所用,术语“育种(breeding)”或“育种(bred)”或其派生词是指任何繁殖方式,包括自然方式和人工方式。

[0110] 如本文所用,术语“育种群”或“生产群”是指通过本发明的方法生成的一组转基因动物。在一些实施方案中,在动物中可以识别到基因修饰,然后将这些动物一起育种以形成具有期望的一组基因修饰(或单个基因修饰)的动物群。参见WO 2012/112586;PCT/US2012/025097。这些子代可以进一步育种,以在其后代中产生不同或相同的基因修饰组(或单个基因修饰)。具有期望的基因修饰的动物的这种育种周期可以按照人们的意愿持续下去。在该语境下,“群”可以包含随时间产生的具有相同或不同基因修饰的多代动物。“群”还可以指具有相同或不同基因修饰的单代动物。

[0111] 如本文所用,术语“CRISPR”或“成簇规则间隔短回文重复序列”或“SPIDR”或“间隔散布直接重复序列”是指通常对特定细菌物种具有特异性的DNA基因座的家族。CRISPR基因座包含在大肠杆菌(E.coli)中识别的一类独特的散布短序列重复(SSR)(Ishino et al.,J.Bacteriol.,169:5429-5433[1987];和Nakata et al.,J.Bacteriol.,171:3553-3556[1989])和相关基因。CRISPR/Cas分子是原核适应性免疫系统的组成部分,其功能类似于真核RNA干扰,使用RNA碱基配对来引导DNA或RNA切割。引导DNA DSB需要两种组成部分:充当核酸内切酶的Cas9蛋白,以及协助引导Cas9/RNA复合物靶向DNA序列的CRISPR RNA(crRNA)和示踪RNA(tracrRNA)序列(Makarova et al.,Nat Rev Microbiol,9(6):467-477,2011)。单个靶向RNA的修饰足以改变Cas蛋白的核苷酸靶标。在一些情况下,crRNA和tracrRNA可以被工程化为单个cr/tracrRNA杂合体以引导Cas9切割活性(Jinek et al.,Science,337(6096):816-821,2012)。CRISPR/Cas系统可以用于细菌、酵母、人和斑马鱼,如别处所述(参见,例如,Jiang et al.,Nat Biotechnol,31(3):233-239,2013;Dicarlo et al.,Nucleic Acids Res,doi:10.1093/nar/gkt135,2013;Cong et al.,Science,339(6121):819-823,2013;Mali et al.,Science,339(6121):823-826,2013;Cho et al.,Nat Biotechnol,31(3):230-232,2013;和Hwang et al.,Nat Biotechnol,31(3):227-229,2013)。

[0112] 如本文所用,术语“临床相关的免疫抑制方案”是指在本文公开的基因修饰的猪的器官、组织或细胞移植后向患者提供的临床可接受的免疫抑制药物的方案。确定临床相关性需要通常由FDA作出的判断决策,在可接受的风险相对于潜在获益进行权衡,使得在维持药物或治疗功效的同时保护人体安全。

[0113] 本文所用,术语“组成型”启动子是指核苷酸序列,其在与编码或指明基因产物的多核苷酸可操作地连接时,使得基因产物在细胞的大多数或所有生理条件下在细胞中产

生。

[0114] 如本文所用,术语“供体”意在包括可以用作异种移植的供体器官、组织或细胞来源的任何非人动物。供体可以处于任何发育阶段,包括但不限于胎仔、新生仔、幼仔和成年仔。

[0115] 如本文所用,本文中用于核酸序列和动物的术语“内源”是指该动物基因组中天然存在的任何核酸序列。内源核酸序列可以包含一种或更多种基因序列、基因间序列、基因序列或基因间序列的部分,或其组合。

[0116] 如本文所用,术语“内皮特异性”、“内皮组织中特异性转基因表达”、“在内皮组织中特异性表达至少一种转基因”等,应理解这些术语是指在内皮特异性调节元件控制下的转基因,该内皮特异性调节元件实现转基因在内皮组织和/或细胞中的限制性表达。转基因功能和表达仅限于内皮组织和/或细胞。

[0117] 如本文所用,术语“内皮”是中胚层起源的上皮,其由衬(line)在体腔内部的单层薄而扁平的细胞组成。例如,浆膜腔或心脏内部含有内皮细胞衬里,并且“血管内皮”是衬在血管内的内皮。

[0118] 如本文所用,术语“内皮特异性调节元件”等是指启动子、增强子或其组合,其中该启动子、增强子或其组合驱动转基因在内皮组织和/或细胞中的限制性表达。调节元件提供仅限于内皮组织和/或细胞的转基因功能和表达。

[0119] 如本文所用,术语“增强子”是指核酸构建体中旨在以组织特异性方式促进转基因表达增加的元件。增强子是明显改变基因转录效率的外部元件(MolecularBiologyoftheGene,FourthEdition,pp.708-710,BenjaminCummingsPublishingCompany,MenloPark,CA©1987)。在某些实施方案中,动物在启动子与增强子元件组合的控制下表达转基因。在一些实施方案中,启动子与增强子元件组合使用,该增强子元件是与启动子内在缔合或共定位的DNA的非编码或内含子区。

[0120] 如本文所用,“表达”是指多核苷酸从DNA模板转录(例如转录成mRNA或其他RNA转录物)的过程和/或转录的mRNA随后翻译成肽、多肽或蛋白的过程。转录物和编码的多肽可以统称为“基因产物”。如果多核苷酸源自基因组DNA,则表达可以包括真核细胞中mRNA的剪接。

[0121] 本文中广泛使用的术语“基因”是指与生物功能相关的任何DNA区段。因此,基因包括其表达所需的编码序列和/或调节序列。基因还可以包括非表达的DNA片段,例如,所述非表达的DNA片段形成对其他蛋白的识别序列。基因可以从多种来源获得,包括从感兴趣的来源克隆,或由已知的或预测的序列信息合成,并且可以包括设计成具有期望参数的序列。

[0122] 如本文所用,术语“基因编辑”是指使用基因编辑工具将DNA插入、替换或从基因组中去除的一种基因工程。基因编辑工具的实例包括但不限于锌指核酸酶、TALEN和CRISPR。

[0123] 如本文所用,术语“基因编辑介导的”或类似术语是指基因修饰(例如,缺失、取代、重排),其涉及基因编辑/基因编辑工具的使用。

[0124] 如本文所用,术语“基因敲除”是指由染色体基因座中编码的遗传信息的破坏而产生的基因修饰。

[0125] 如本文所用,术语“基因敲入”是由用不同DNA序列替换染色体基因座中编码的遗传信息而产生的基因修饰。

[0126] 如本文所用,术语“基因修饰”是指核酸(例如,生物体基因组内的核酸)的一种或更多种改变。例如,基因修饰可以是指基因的改变、添加(例如,基因敲入)和/或缺失(例如,基因敲除)。

[0127] 如本文所用,关于表达水平的术语“高”是指被认为足以提供表型(可检测的表达或治疗益处)的表达水平。通常,“高”水平的表达足以能够减少移植物排斥反应,包括超急性排斥反应(HAR)、急性体液异种移植排斥反应(AHXR)、T细胞介导的细胞排斥反应和即刻血液介导的炎症反应(IBMIR)。

[0128] 如本文所用,术语“同源驱动重组”或“同源直接修复”或“HDR”用于指由DNA中存在双链断裂(DSB)引发的同源重组事件(Liangetal.1998);并且在与任何已知能产生高效且靶向的双链断裂并实现对靶细胞的基因组进行精确编辑的基因组编辑技术(例如CRISPR/Cas9系统)组合使用时,可以控制HDR的特异性(Findlayetal.2014;Malietal.February2014;和Ranetal.2013)。

[0129] 如本文所用,术语“增强的同源驱动插入或敲入”被描述为DNA构建体的插入,更具体地是侧翼具有同源臂或与双链断裂同源的DNA区段的大的DNA片段或构建体的插入,其利用同源性驱动的重组与任何已知能产生高效且靶向的双链断裂并实现对靶细胞的基因组进行精确编辑的基因组编辑技术(例如CRISPR/Cas9系统)相组合(Malietal.Feb2013)。

[0130] 如本文所用,术语“人源化”是指核酸或蛋白,其结构(即核苷酸或氨基酸序列)包括与在自然界中非人动物中发现的特定基因或蛋白的结构基本上对应或相同对应的部分,并且还包括与相关特定非人基因或蛋白中发现的部分不同、而是与相应人基因或蛋白中发现的类似结构更密切对应的部分。在一些实施方案中,“人源化”基因是编码基本上具有人多肽(例如,人蛋白或其部分——例如,其特征部分)的氨基酸序列的多肽的基因。术语“超急性排斥反应”是指在移植后最初24小时内发生或开始的移植材料或组织的排斥反应。

[0131] 如本文所用,术语“植入/植入物(implant)”或“移植/移植物(transplant)”或“移植/移植物(graft)”应理解为是指在允许组织或器官变得血管化的条件下将组织或器官插入受试者体内的行为;并且还应指如此插入的(即“植入的(implanted)”或“移植的(transplanted)”或“移植的(grafted)”)组织或器官。有利于哺乳动物中移植物血管化的条件包括在移植物部位处的具有广泛血液供应网络的局部组织床。

[0132] 如本文所用,术语“免疫调节剂”是指具有调节免疫应答能力的转基因。在示例性实施方案中,根据本发明的免疫调节剂可以是补体抑制剂或免疫抑制剂。在特定实施方案中,免疫调节剂是补体抑制剂。补体抑制剂可以是CD46(或MCP)、CD55CD59和/或CRI。在特定实施方案中,可以表达至少两种补体抑制剂。在一个实施方案中,补体抑制剂可以是CD55和CD59。在另一个实施方案中,免疫调节剂可以是II类反式激活因子或其突变体。在某些实施方案中,免疫调节剂可以是II类反式激活因子显性失活突变体(CIITA-DN)。在另一个特定实施方案中,免疫调节剂是免疫抑制剂。免疫抑制剂可以是CTLA4-Ig。其他免疫调节剂可以选自以下的组,但不限于CIITA-DN、PDL I、PDL2或肿瘤坏死因子-α相关诱导配体(TRAIL)、Fas配体(FasL、CD95L)CD47(称为整联蛋白相关蛋白(CD47))、HLA-E、HLA-DP、HLA-DQ和/或HLA-DR。

[0133] 如本文所用,“诱导型”启动子是受环境或发育调节的启动子。诱导型且能实现基因编辑或基因表达的时空控制的启动子的实例可以使用某种形式的能量。能量的形式可以

包括但不限于声能、电磁辐射、化学能和/或热能。诱导型系统的实例包括四环素诱导型启动子(Tet-On或Tet-Off)、小分子二杂交转录激活系统(FKBP、ABA等)或光诱导型系统(光敏色素、LOV结构域或隐花色素),例如光诱导型转录效应子(LITE),其以序列特异性方式引导转录活性的变化。光诱导型系统的组分可以包括酶或转基因、光响应性细胞色素异二聚体(例如来自拟南芥)和转录激活/抑制结构域。在U.S.61/736,465和U.S.61/721,283中提供了诱导型DNA结合蛋白及其使用方法的进一步实例。

[0134] 瞬时或诱导型表达可以通过使用例如化学调节的启动子来实现,其中外源化学物质的应用可以诱导基因表达。基因表达的调节还可以通过化学抑制型启动子来获得,其中化学物质的应用抑制基因表达。化学诱导型启动子包括但不限于:由苯磺酰胺除草剂安全剂激活的玉米In2-2启动子(De Veylder et al.,(1997)Plant Cell Physiol 38:568-77)、由用作芽前除草剂的疏水性亲电化合物激活的玉米GST启动子(GST-11-27,WO93/01294)和由水杨酸激活的烟草PR-1a启动子(Ono et al.,(2004)Biosci Biotechnol Biochem 68:803-7)。本文还可以使用由抗生素调节的启动子,例如四环素诱导型启动子和四环素抑制型启动子(Gatz et al.,(1991)Mol Gen Genet 227:229-37;美国专利号5,814,618和5,789,156)。

[0135] 如本文所用,术语“着陆区”或“工程化的着陆区”是指含有至少一个识别序列的核苷酸序列,该识别序列被特定多核苷酸修饰酶(例如位点特异性重组酶和/或靶向核酸内切酶)选择性结合和修饰。通常,着陆区序列中的识别序列不内源存在于待修饰的细胞的基因组中。可以通过选择不内源存在于靶向细胞基因组内的高效核苷酸修饰酶的识别序列来提高靶向整合率。选择不内源存在的识别序列还减少潜在的脱靶整合。在其他方面,使用待修饰的细胞中天然的识别序列可能是理想的。例如,在着陆区序列中采用多个识别序列的情况下,一个或更多个可以是外源的,并且一个或更多个可以是天然的。

[0136] 单个着陆区中可以存在多个识别序列,允许着陆区被两个或更多个多核苷酸修饰酶顺序靶向,使得可以插入两个或更多个独特序列。可选地,着陆区中存在的多个识别序列允许相同序列的多个拷贝被插入着陆区中。着陆区可以包含至少一个识别序列。例如,外源核酸可以包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个或更多个识别序列。在包含多于一个识别序列的实施方案中,识别序列可以是彼此独特的(即被不同的多核苷酸修饰酶识别)、相同的重复序列,或重复序列和独特序列的组合。任选地,着陆区可以包括编码选择性标志物(例如抗生素抗性基因、代谢选择标志物或荧光蛋白)的一个或更多个序列。还可以存在其他序列,例如转录调节和控制元件(即启动子、部分启动子、启动子陷阱、起始密码子、增强子、内含子、绝缘子和其他表达元件)。

[0137] 如本文所用,术语“大靶向载体”或“LTVEC”包括用于真核细胞的大靶向载体,其源自比旨在在真核细胞中进行同源基因靶向的其他方法通常使用的片段更大的克隆基因组DNA片段。LTVEC的实例包括但不限于细菌人工染色体(BAC)、人类人工染色体(HAC)和酵母人工染色体(YAC)。

[0138] 如本文所用,术语“基因组基因座”或“基因座(locus)”(复数基因座(loci))是基因或DNA序列在染色体上的特定位置,并且可以包括特定基因的内含子或外显子序列。“基因”是指编码在生物体中发挥功能性作用的多肽或RNA链的DNA或RNA段,因此是活生物体中

遗传的分子单位。为了本发明的目的,可以认为基因包括调节基因产物产生的区域,无论这些调节序列是否与编码序列和/或转录的序列相邻。因此,基因包括但不一定限于内含子、外显子、启动子序列、终止子、翻译调节序列(例如核糖体结合位点和内部核糖体进入位点)、增强子、沉默子、绝缘子、边界元件、5'或3'调节序列、复制起点、基质附接位点和基因座控制区。

[0139] 如本文所用,术语"肺移植"是指患者的患病肺被来自供体的肺部分或全部替换的外科手术。肺移植可以是"单侧",即仅切除受体的两个肺中的一个并用供体的单个肺替换;还可以是"双侧",即涉及切除两个肺,两侧各一个,并替换供体的双肺。在某些实施方案中,肺与心脏一起移植。

[0140] 如本文所用,术语"肺保存"是指从获取肺的时间直至在受体中植入发生期间维持和保护供体肺的过程。

[0141] 如本文所用,术语"心脏移植"是指患者的患病心脏被来自供体的心脏完全替换的外科手术。在某些实施方案中,心脏与肺一起移植。

[0142] 如本文所用,术语"心脏瓣膜移植"是指患者的患病心脏瓣膜被来自供体的心脏瓣膜替换的外科手术。

[0143] 如本文所用,术语"心脏保存"是指从获取心脏的时间直至在受体中植入期间维持和保护供体心脏的过程。

[0144] 如本文所用,术语"肾脏移植"是指在切除或不切除患病的一个或更多个肾脏的情况下患者接受供体肾脏的外科手术。在某些实施方案中,肾脏被移植至受体的下腹腔中。

[0145] 如本文所用,短语"移植功能丧失"是指供体动物中器官或组织表现出的任何正常过程的生理破坏或功能障碍。

[0146] 如本文所用,术语"哺乳动物"是指任何非人哺乳动物,包括但不限于猪、绵羊、山羊、家牛(牛)、鹿、骡、马、猴、犬、猫、大鼠和小鼠。在某些实施方案中,动物是猪动物。猪动物可以是任何体型。例如,猪动物的体重可以为约10磅至约500磅。在一些实施方案中,猪动物的体重可以大于500磅。猪动物的体重可以取决于异种移植受体的体重和体型。在特定实施方案中,哺乳动物是母猪并且已经分娩至少一次。在某些实施方案中,哺乳动物是非人灵长类动物,例如,猴或狒狒。

[0147] 如本文所用,"标志物"或"选择性标志物"是允许从群体中的大多数处理的细胞中分离出表达该标志物的稀少转染细胞的选择标志物。此类标志物的基因包括但不限于新霉素磷酸转移酶和潮霉素B磷酸转移酶,或荧光蛋白(例如GFP)。

[0148] 如本文所用,术语"核苷酸"、"多核苷酸"、"核苷酸序列"、"核酸"和"寡核苷酸"可互换使用。它们是指任何长度的核苷酸的聚合形式,可以是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构,并且可以执行任何已知或未知的功能。

[0149] 以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段的编码或非编码区、由连锁分析界定的基因座、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。该术语还涵盖具有合成主链的核酸样结构,参见,例如,Eckstein,1991;Baserga et al.,1992;Milligan,1993;WO 97/03211;WO 96/39154;Mata,1997;Strauss-Soukup,1997;和

Samstag,1996。多核苷酸可以包含一个或更多个修饰的核苷酸,例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,可以在聚合物组装之前或之后对核苷酸结构进行修饰。核苷酸序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以在聚合后被进一步修饰,例如通过与标记组分缀合。

[0150] 如本文所用,短语“可操作地连接”包含其中可操作地连接的组分以它们预期的方式起作用的关系。在一种情况下,编码蛋白的核酸序列可以可操作地连接至调节序列(例如,启动子、增强子、沉默子序列等),以便保持适当的转录调节。

[0151] 如本文所用,术语“器官”是指连接成结构单元以发挥共同功能的组织的集合。器官可以是实体器官。实体器官是具有坚实的组织紧密性(consistency)的内部器官,并且既不是中空的(例如胃肠道器官)也不是液体(例如血液)。实体器官的实例包括心脏、肾脏、肝脏、肺、胰腺、脾脏和肾上腺。

[0152] 如本文所用,术语“灵长类动物”是指灵长目的各种哺乳动物,其由狐猴、懒猴、眼镜猴、新大陆猴、旧大陆猴和猿(包括人)组成,并且特征在于手足上有指甲、短鼻和大的大脑。在某些实施方案中,灵长类动物是非人灵长类动物。在其他实施方案中,灵长类动物是人。

[0153] 如本文所用,术语“启动子”是指DNA区,通常位于编码区的上游(5’),其至少部分控制转录的起始和水平。本文提及的“启动子”应在其最广泛的语境下理解,并且包括经典基因组基因的转录调节序列,包括TATA盒或非TATA盒启动子,以及响应发育和/或环境刺激或以组织特异性或细胞类型特异性的方式改变基因表达的另外的调节元件(即激活序列、增强子和沉默子)。启动子通常但不一定位于其调节表达的结构基因的上游或5’。此外,包含启动子的调节元件通常位于距离基因转录起始位点2kb内,尽管它们也可能相距许多kb。启动子可以含有位于起始位点的更远端的另外的特异性调节元件,以进一步增强细胞中的表达,和/或改变与其可操作地连接的结构基因的表达时间或诱导性。

[0154] 如本文所用,术语“猪的”、“猪动物”、“猪(pig)”和“猪(swine)”是指代同一类型的动物的通用术语,而不考虑性别、体型或品种。

[0155] 如本文所用,术语“识别位点”或“识别序列”是指被核酸酶或其他酶识别以结合并引导DNA主链的位点特异性切割的特定DNA序列。

[0156] 如本文所用,术语“重组位点”是指被位点特异性重组酶识别并且可以充当重组事件的底物的核苷酸序列。

[0157] 如本文所用,术语“调节元件”和“表达控制元件”可互换使用,并且是指可以影响可操作地连接的编码序列在特定环境中的转录和/或翻译的核酸分子。这些术语广泛使用并涵盖促进或调节转录的所有元件,包括启动子、RNA聚合酶和转录因子基本相互作用所需的核心元件、上游元件、增强子和反应元件(参见,例如,Lewin,″Genes V″(Oxford University Press,Oxford)第847-873页)。原核生物中的示例性调节元件包括启动子、操纵子序列和核糖体结合位点。用于真核细胞的调节元件可以包括但不限于启动子、增强子、剪接信号和聚腺苷酸化信号。

[0158] 如本文所用,术语“可调节启动子”是指可以用于调节肽是否在动物、组织或器官中表达的启动子。可调节启动子可以是组织特异性的并且仅在特定组织中表达,或者是暂时可调节的(在特定时间开启(由发育阶段驱动),或者是可诱导的,使得仅由诱导型元件控

制开启或关闭(表达或不表达)。(还可以是诱导型启动子,例如免疫诱导型启动子和细胞因子应答启动子,例如由干扰素γ、TNF-α、IL-1、IL-6或TGF-β诱导的)。例如,在器官或组织是猪的一部分时,可以阻止表达,但一旦猪已被移植至人体一段时间,可以诱导表达以克服细胞免疫应答。此外,可以通过可调节的启动子系统来控制表达水平,以确保不发生受体免疫系统的免疫抑制。

[0159] 如本文所用,术语"调节序列"、"调节元件"、和"控制元件"可互换使用,并且是指位于待表达的多核苷酸靶标的上游(5'非编码序列)、内部或下游(3'非翻译序列)的多核苷酸序列。调节序列影响,例如,转录的时间、转录的量或水平、RNA加工或稳定性,和/或相关结构核苷酸序列的翻译。调节序列可以包括激活子结合序列、增强子、内含子、多腺苷酸化识别序列、启动子、阻遏物结合序列、茎环结构、翻译起始序列、翻译前导序列、转录终止序列、翻译终止序列、引物结合位点等。

[0160] 如本文所用,术语"安全港"基因座是指基因组中可以在没有损害的情况下添加转基因DNA(例如,构建体)并产生一致水平的表达的位点。在某些实施方案中,本发明涉及转基因DNA的掺入和表达,包括安全港基因座内的转基因。

[0161] 如本文所用,术语"位点特异性重组酶"是指可以促进"重组位点"之间重组的一组酶,其中两个重组位点在单个核酸分子内或在分离的多个核酸分子上物理分离。"位点特异性重组酶"的实例包括但不限于phiC31、att、Bxb1、R4(整合酶)和或Cre、Flp和Dre重组酶。

[0162] 如本文所用,术语"受试者"是指任何动物(例如,哺乳动物),包括但不限于,人、非人灵长类动物、啮齿类动物等(例如,其是特定治疗(例如,移植物)的受体或其是移植物的供体)。术语"受试者"和"患者"在涉及人受试者时可互换使用,除非本文另有说明(例如,其中受试者是移植物供体)。在一个实施方案中,受试者可以是供体。在另一个实施方案中,受试者可以是受体。

[0163] 如本文所用,术语"靶向载体"是指重组DNA构建体,其通常包含与位于靶基因或靶序列的关键元件的侧翼的基因组DNA同源的特定DNA臂。在引入细胞时,靶向载体经由同源重组整合至细胞基因组中。"组织特异性"启动子是在与编码或指明基因产物的多核苷酸可操作地连接时,基本上仅在细胞是与启动子相对应的组织类型的细胞时才导致基因产物在细胞中产生的核苷酸序列。

[0164] 如本文所用,术语"组织"是指介于细胞和完整器官之间的细胞组织水平。组织是来自相同来源的相似细胞的集合,它们共同执行特定功能。然后,通过多个组织的功能分组形成器官。本发明设想的组织的实例包括但不限于结缔组织、肌肉组织、神经组织、上皮组织和矿化组织。血液、骨骼、肌腱、韧带、脂肪和乳晕组织是结缔组织的实例,它们还可以分类为纤维结缔组织、骨骼结缔组织和液体结缔组织。肌肉组织分为三个不同的类别:内脏肌或平滑肌,存在于器官的内衬中;骨骼肌,通常附着在骨骼上并产生整体运动;和心肌,存在于心脏中,在心脏中其收缩以将血液泵送到整个生物体。包含中枢神经系统和周围神经系统的细胞被分类为神经(nervous)(或神经(neural))组织。在中枢神经系统中,神经组织形成大脑和脊髓。在周围神经系统中,神经组织形成脑神经和脊神经,包括运动神经元。

[0165] 如本文所用,术语转录激活子样效应核酸酶或"TALEN"是指通过将TAL效应DNA结合结构域与DNA切割结构域融合而生成的人工限制性酶。这些试剂能够实现有效的、可编程的且特异性的DNA切割,并且代表基因组原位编辑的强大工具。转录激活子样效应子(TALE)

可以经快速工程化以结合几乎任何DNA序列。如本文所用,术语TALEN是广义的并且包括可以在没有另一个TALEN协助的情况下切割双链DNA的单体TALEN。术语TALEN还用于指代一对TALEN中的一个或两个成员,它们被工程化为一起工作以在相同位点处切割DNA。一起工作的TALEN可以被称为左-TALEN和右-TALEN,这参考DNA的手性。参见美国系列号12/965,590;美国系列号13/426,991(美国专利号8,450,471);美国系列号13/427,040(美国专利号8,440,431);美国系列号13/427,137(美国专利号8,440,432);和美国系列号13/738,381,它们全部通过引用以其全文并入本文。

[0166] 如本文所用,术语"转染的"或"转化的"或"转导的"是指将外源核酸转移或引入宿主细胞的过程。"转染的"或"转化的"或"转导的"细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。细胞包括原代受试细胞及其后代。

[0167] "转基因"是已经从一个生物体转移至另一个生物体的基因或遗传物质。在转基因被转移至生物体中时,则该生物体可以被称为转基因生物体。通常,该术语描述含有已经从一个生物体中分离并引入不同生物体中的基因序列的DNA区段。这种非天然的DNA区段可以保留在转基因生物体中产生RNA或蛋白的能力,或者它可以改变转基因生物体的遗传密码的正常功能。通常,DNA被掺入生物体的种系中。例如,在高等脊椎动物中,这可以通过将外来DNA注射至受精卵的细胞核中或经由体细胞核移植来实现,其中将带有拟掺入宿主基因组中的期望转基因的体细胞转移至去核卵母细胞中,并在移植至代孕母体内后产生活的子代。在插入细胞时,转基因可以是cDNA(互补DNA)区段,其是mRNA(信使RNA)的拷贝,也可以是位于基因组DNA原始区域的基因本身。转基因可以是基因组序列,特别是在作为大克隆引入BAC(细菌人工染色体)或粘粒时,或者可以是"微小基因"的形式,通常以基因组DNA(包括内含子区,例如内含子1)、5'或3'调节区,以及cDNA区的组合为特征。

[0168] 除非另有说明,否则本说明书上下文中的转基因"表达"意指来自非天然核酸的肽序列在宿主的至少一个细胞中表达。肽可以由掺入宿主基因组中的转基因表达。转基因可以包含编码蛋白或其片段(例如,功能片段)的多核苷酸。蛋白的片段(例如,功能片段)可以包含蛋白的至少或至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的氨基酸序列。蛋白的片段可以是蛋白的功能片段。蛋白的功能片段可以保留蛋白的部分或全部功能。

[0169] 如本文所用,术语"移植耐受"被定义为不需要持续的药理学免疫抑制的供体特异性无反应状态。移植耐受可以消除许多与免疫抑制剂相关的不良事件。因此,诱导耐受可以导致对异种移植物接受的改善。在实施方案中,诱导耐受可以通过异种移植排斥反应的临床症状的减少来识别。在另一个实施方案中,诱导耐受可以改善或预防与异种移植物移植相关的代谢、炎症和增殖病理学病况或疾病。在另一个实施方案中,诱导耐受可以改善或减少或预防与施用用于预防异种移植排斥反应的免疫抑制疗法相关的不良临床病况或疾病。在又一个实施方案中,诱导耐受可以促进异种移植物存活。在不同的实施方案中,诱导耐受可以防止表现出这些疾病或病况的患者复发。

[0170] 术语"有蹄类动物"是指有蹄的哺乳动物。偶蹄类动物是偶数趾(偶蹄)的有蹄类动物,包括羚羊、骆驼、牛、鹿、山羊、猪和绵羊。奇蹄类动物是奇数趾的有蹄类动物,包括马、斑马、犀牛和貘。如本文所用,术语有蹄类动物是指成年、胚胎或胎仔有蹄类动物。

[0171] 如本文所用,术语"载体"是指能够将多核苷酸转移至宿主细胞的部分。载体包括

但不限于单链、双链或部分双链的核酸分子;包含一个或更多个自由端、无自由端(例如环状)的核酸分子;包含DNA、RNA或两者的核酸分子;以及本领域已知的其他类型的多核苷酸。一种类型的载体是“质粒”,其是指可以例如通过标准分子克隆技术被插入另外的DNA区段的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中病毒来源的DNA或RNA序列存在于用于包装至病毒(例如逆转录病毒、复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒、复制缺陷型腺病毒和腺相关病毒)中的载体中。

[0172] 病毒载体还包括由病毒携带用于转染至宿主细胞中的多核苷酸。某些载体能够在它们被引入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和游离型(episomal)哺乳动物载体)。其他载体(例如,非游离型哺乳动物载体)在引入宿主细胞后被整合至宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体可以引导它们可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。重组DNA技术中常用的表达载体通常是质粒的形式。重组表达载体可以包含适合于在宿主细胞中表达核酸的形式的本发明的核酸,这意指重组表达载体包括一种或更多种调节元件,该调节元件可以基于用于表达的宿主进行选择,其可操作地连接至待表达的核酸序列。

[0173] 在重组表达载体内,“可操作地连接”旨在意指感兴趣的核苷酸序列以允许核苷酸序列表达的方式连接至调节元件(例如在体外转录/翻译系统中或在载体被引入宿主细胞时在宿主细胞中)。关于重组和克隆方法,提及美国专利申请系列号10/815,730,其内容通过引用以其全文并入本文。优选地,载体是DNA载体,并且更优选地,可以表达编码根据本发明的蛋白的RNA。本领域记载了许多合适的载体;实例可见于Molecular Cloning:a Laboratory Manual:2nd edition,Sambrook et al.,1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press or DNA cloning:a practical approach,Volume II:Expression systems,editedby D.M.Glover(IRLPress,1995)。

[0174] 如本文所用,术语“锌指核酸酶”或“ZFN”是指包含锌指DNA结合结构域和DNA切割结构域的人工(工程化的)DNA结合蛋白。锌指结构域可以经工程化以靶向特定的期望DNA序列,并且这使得锌指核酸酶能够靶向复杂基因组内的独特序列。它们通过在用户指定的位置产生DNA双链断裂来促进基因组的靶向编辑。每个ZFN含有两个功能结构域:a.)DNA结合结构域,其由一串双指模块组成,双指模块各自识别独特的六聚体(6bp)DNA序列。双指模块拼接在一起形成锌指蛋白,各自具有≥24bp的特异性。b.)DNA切割结构域,其由Fok I的核酸酶结构域组成。在DNA结合结构域和DNA切割结构域融合在一起时,产生一对高特异性的“基因组剪刀”。ZFN是基因编辑工具。

[0175] III.转基因动物

[0176] 本发明提供了转基因动物(例如,转基因猪动物),其用作异种移植中使用的器官、器官碎片、组织或细胞的来源。本发明延伸至源自转基因动物的器官、组织和细胞,以及此类动物的群体,例如生产群。

[0177] 该动物可以是任何合适的动物。在示例性实施方案中,该动物是有蹄类动物,并且更具体地是猪动物或猪。转基因供体动物(例如,有蹄类动物、猪动物或猪)经过基因修饰,并且更具体地,包含多种转基因,例如,在单个基因座中包含多种转基因。在某些实施方案中,转基因供体动物经基因修饰以表达分布在第一基因座(即基因座1)和第二基因座(即基因座2)之间的多种转基因。该基因座可以是天然的或修饰的天然基因座。本文描述了用于

修饰天然基因座以促进靶向的各种策略。

[0178] 在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,转基因猪动物),其包含在至少三个启动子(例如,外源启动子,或外源启动子和天然启动子的组合)的控制下在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因,并且其中猪缺乏α1,3半乳糖基转移酶的表达。任选地,转基因动物包含一个或更多个另外的基因修饰,包括但不限于基因的添加和/或缺失,包括敲除和敲入,以及基因取代和重排。

[0179] 在具体实施方案中,本发明提供了转基因猪动物,其包含在单个基因座处掺入和表达的至少六种转基因,其中该至少六种转基因的表达受专用的启动子控制,即启动子驱动每个单独转基因的表达。例如,在转基因动物在单个基因座中掺入和表达六种转基因的情况下,这些转基因的表达由四个启动子驱动,其中每个启动子对特定转基因具有特异性。在替代的实施方案中,给定的启动子控制多于一种转基因(例如,两种转基因、三种转基因)的表达。例如,在转基因动物掺入和表达六种转基因的情况下,六种转基因中的两种作为由第一启动子控制的多顺反子而表达,六种转基因中的两种作为由第二启动子控制的多顺反子而表达,并且六种转基因中的两种作为由第三启动子控制的多顺反子而表达。在一些实施方案中,第一启动子、第二启动子和第三启动子相同。在一些实施方案中,第一启动子、第二启动子和第三启动子不同。在一些实施方案中,至少一个启动子是不同的。

[0180] 在一些实施方案中,至少六种转基因选自由免疫调节剂(例如,免疫抑制剂)、抗凝剂(anticoagulant)、补体抑制剂和低温保护(cryoprotective)转基因组成的组。在一些实施方案中,单个基因座是天然基因座。在其他实施方案中,单个基因座是修饰的天然基因座,例如转基因基因座。转基因基因座可以是,例如,含有选择性标志物基因的基因座或含有着陆区的基因座。在一些实施方案中,至少六种转基因在多顺反子载体(MCV)中提供并通过随机整合或通过利用基因编辑工具而掺入。

[0181] 任选地,转基因动物可以具有一个或更多个另外的基因修饰。另外的基因修饰可以是,例如,基因敲除或基因敲入。在具体实施方案中,另外的基因修饰包含嵌合的猪-人vWF。

[0182] 在另一个实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,猪),其包括至少五个基因修饰,导致(i)缺乏α1,半乳糖基转移酶的表达(即αGal无效)和(ii)在单个基因座中掺入和表达至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种或至少十种转基因。转基因的表达由启动子(专用的启动子或控制两种或更多种转基因表达的启动子)驱动。启动子可以是外源的或外源启动子和天然启动子的组合。

[0183] 在某些实施方案中,如果添加多于六种的转基因,可能涉及在多于一个基因座处掺入转基因,以更好地调节转基因组合的表达,例如整合在GGTA1处的至少三个启动子的控制下的至少六种转基因的整合,以及在第二基因座(例如CMAH、B4GalNT2、AAVS1、GHR或Rosa26)处的第二多顺反子的整合。在第二基因座被基因修饰的某些实施方案中,可以修饰该第二基因座以使另一猪基因的表达失活(例如通过应用基因编辑和/或同源重组技术)。在示例性实施方案中,作为第二基因座掺入和表达的多种转基因选自由免疫调节剂、补体抑制剂、抗凝剂和低温保护转基因组成的组。在示例性实施方案中,第二基因座是天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座(例如,着陆区)。在示例性实施方案中,在第二基因座处的至少两种转基因在MCV中提供并且利用基因编辑工具掺入。任选地,转基因动物可以

具有一个或更多个另外的基因修饰。

[0184] 在一个实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,猪),其包括至少六个基因修饰,导致(i)α1,半乳糖基转移酶的表达降低和(ii)在单个基因座中掺入和表达至少六种转基因,其中该六种转基因在至少三个启动子(例如,外源启动子或外源启动子和天然启动子的组合)的控制下表达。在示例性实施方案中,转基因选自由免疫调节剂、抗凝剂、补体抑制剂和低温保护转基因组成的组。在示例性实施方案中,单个基因座是天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座(例如,着陆区)。在示例性实施方案中,至少两种转基因在MCV中提供并且利用基因编辑工具(即CRISPR/cas9、TALEN或ZFN)掺入以增强同源重组或同源依赖性修复的效率。任选地,转基因动物可以具有一个或更多个另外的基因修饰。

[0185] 在一些实施方案中,CRISPR/Cas9介导的基因编辑包含:诱导型启动子或诱导型系统、四环素/多西环素调节系统;多顺反子载体,其包含U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2];TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA];CAGpr[hCD46-2A-hCD55];或SEQ ID NO:9的核苷酸序列。在一些实施方案中,诱导型启动子控制生长激素受体基因的表达。

[0186] 在另一个实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,猪),其包括至少五个基因修饰,导致(i)α1,半乳糖基转移酶的表达降低和(ii)在单个基因座中或分布在两个基因座之间的至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种或至少十种转基因的掺入和表达。在示例性实施方案中,转基因选自由免疫调节剂、补体抑制剂、抗凝剂和低温保护转基因组成的组。在示例性实施方案中,单个基因座是天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座(例如,着陆区)。在示例性实施方案中,至少两种转基因在MCV中提供并且利用基因编辑工具(即CRISPR/cas9、TALEN或ZFN)掺入以增强同源重组或同源依赖性修复的效率。任选地,转基因动物可以具有一个或更多个另外的基因修饰。

[0187] 在示例性实施方案中,转基因动物缺乏α1,半乳糖基转移酶的表达(即αGal无效)并且包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个或至少七个或更多个基因修饰。任选地,除了转基因整合之外,另外的敲除包括β4GalNT2基因或CMAH基因的敲除(这两种基因均与先天免疫和异种移植排斥反应的原因有关)。

[0188] 在示例性实施方案中,转基因动物具有降低的α1,半乳糖基转移酶的表达,并且包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个或至少七个另外的基因修饰。在某些实施方案中,α1,半乳糖基转移酶的表达降低约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约95%。

[0189] 在示例性实施方案中,转基因动物包含(i)导致缺乏α1,3半乳糖基转移酶表达的基因修饰,和(ii)至少十个另外的基因修饰,或更具体地六种另外的转基因。这些另外的基因修饰可以是任何合适的基因修饰,包括但不限于CRISPR诱导的缺失/插入或基因取代(插入缺失),包括在其他基因座(例如,B4GalNT2、CMAH、vWF或GHR)处的敲除或敲入。

[0190] 在示例性实施方案中,转基因动物包含(i)导致α1,3半乳糖基转移酶表达降低的基因修饰,和(ii)至少六个另外的基因修饰,或更具体地10个另外的基因修饰。在示例性实施方案中,转基因动物包含(i)导致缺乏α1,3半乳糖基转移酶表达的基因修饰,和(ii)至少五个另外的基因修饰,或更具体地五个另外的基因修饰。在示例性实施方案中,转基因动物包含(i)导致缺乏α1,3半乳糖基转移酶表达的基因修饰,和(ii)至少六个另外的基因修饰,或更具体地六个另外的基因修饰。

[0191] 在具体实施方案中,供体动物(例如,有蹄类动物、猪动物或猪)包含导致(i)缺乏α1,3半乳糖基转移酶表达以及掺入和表达至少五种、或至少六种或更多种转基因的基因修饰。在示例性实施方案中,供体动物(例如,有蹄类动物、猪动物或猪)包含导致(i)α1,3半乳糖基转移酶表达降低和(ii)掺入和表达六种另外的转基因的基因修饰。任选地,供体动物可以含有或更多个另外的基因修饰。

[0192] 在示例性实施方案中,供体动物(例如,有蹄类动物、猪动物或猪)包含导致(i)α1,3半乳糖基转移酶表达降低和(ii)掺入和表达六种另外的转基因的基因修饰。任选地,供体动物可以含有一个或更多个另外的基因修饰(基因敲除、基因敲入、插入缺失、猪vWF或GHR的修饰)。

[0193] A.转基因表达

[0194] 转基因的表达可以处于任何水平,但在具体实施方案中,表达处于高水平。根据期望的水平和组织特异性表达,可以使用多个启动子/增强子元件。根据期望的表达模式,启动子/增强子可以是组成型的或诱导型的。启动子可以是外源的或天然的,或者是外源启动子和天然启动子的组合。

[0195] 在某些实施方案中,转基因由组成型或遍在型启动子表达。在某些其他实施方案中,转基因由组织特异性或细胞类型特异性启动子或者诱导型启动子表达,并且可以包括另外的调节元件,例如增强子、绝缘子、基质附接区(MAR)等。

[0196] 在示例性实施方案中,六种或更多种转基因是共表达的。在示例性实施方案中,六种或更多种转基因以近似摩尔当量表达。在一些实施方案中,至少六种转基因由组成型启动子或组织特异性启动子驱动。在一些实施方案中,组成型启动子选自由CAG启动子、Tie-2启动子、ICAM-2启动子组成的组。在一些实施方案中,诱导型启动子是四环素/多西环素调节启动子。在一些实施方案中,组织特异性启动子是内皮细胞特异性启动子;和/或组织特异性启动子选自猪血栓调节蛋白启动子(pTBMpr)、人血栓调节蛋白启动子、猪EPCR启动子、人EPCR启动子。在一些实施方案中,猪血栓调节蛋白启动子是外源或内源启动子。在示例性实施方案中,转基因由主要在内皮细胞中有活性的启动子表达。在某些实施方案中,转基因的表达由猪Icam-2增强子/启动子控制。在某些实施方案中,转基因的表达由组成型CAG启动子控制。

[0197] 在某些实施方案中,转基因动物经基因修饰以导致掺入和表达六种或更多种转基因,其中至少一种转基因由组成型启动子控制并且至少一种转基因由组织特异性启动子(或更具体地,主要在内皮细胞中有活性的启动子)控制。

[0198] 在示例性实施方案中,转基因动物经基因修饰以导致在单个基因座中掺入和表达六种或更多种转基因,其中至少两种转基因由组成型启动子控制并且至少两种转基因由组织特异性启动子(或更具体地,主要在内皮细胞中有活性的启动子)控制。

[0199] 转基因可以是适合用于修饰供体动物(例如,猪动物)以用于异种移植的任何转基因。在示例性实施方案中,转基因选自免疫调节剂(例如,补体调节剂、补体抑制剂、免疫抑制剂)、抗凝剂、低温保护基因或其组合。在某些实施方案中,转基因序列在人中。

[0200] 在某些实施方案中,转基因是免疫调节剂。在某些实施方案中,转基因是补体调节剂或更具体地是补体抑制剂。补体抑制剂可以包括但不限于CD46(MCP)、CD59或CR1。补体抑制剂的序列可以是人的。在某些实施方案中,转基因是补体途径抑制剂(即补体抑制剂)抑

制剂。补体抑制剂可以包括但不限于CD55(DAF)、CD59、CR1和CD46(MCP)。补体抑制剂的序列可以是人的。在一些实施方案中,至少六种转基因包含至少两种补体抑制剂,其选自由CD46、DAF(CD55)、CD59、CR1及其组合组成的组。在一些实施方案中,至少两种补体抑制剂是遍在表达的;和/或在组成型启动子或诱导型启动子的控制下。

[0201] 在某些实施方案中,至少一种转基因是免疫抑制剂。在一些实施方案中,至少一种免疫抑制转基因选自由细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、分化簇47(CD47)和II类反式激活因子-DN(CIITA-DN)组成的组。在一些实施方案中,至少一种免疫抑制转基因在组成型启动子的控制下。

[0202] 在某些实施方案中,转基因是具有T细胞调节作用的免疫抑制基因——例如CTLA4-Ig,或II类MHC(CIITA)的显性失活抑制剂,或调节B细胞或T细胞介导的免疫功能的其他基因。在进一步的实施方案中,此类动物可以经进一步修饰以消除影响免疫功能的基因的表达。在某些实施方案中,免疫抑制剂是CD47。在某些实施方案中,至少两种转基因是抗凝剂。在一些实施方案中,至少两种抗凝转基因在内皮特异性启动子的控制下。在一些实施方案中,至少两种抗凝转基因选自由内皮蛋白C受体(EPCR)、血栓调节蛋白、CD39、水蛭素、组织因子途径抑制剂(TFPI)及其组合组成的组。在一些实施方案中,抗凝剂的序列可以是人的。

[0203] 转基因动物也可以含有一个或更多个另外的基因修饰。在一个实施方案中,动物可以经基因修饰以抑制CMP-Neu5Ac羟化酶基因(CMAH)(参见,例如,美国专利公开2005-0223418)、iGb3合酶基因(参见,例如,美国专利公开2005-0155095)和/或Forssman合酶基因(参见,例如,美国专利公开2006-0068479)的表达。此外,动物可以经基因修饰以降低促凝血剂的表达。具体地,在一个实施方案中,动物经基因修饰以降低或消除促凝血基因(例如FGL2(纤维蛋白原样蛋白2))的表达。在另一个实施方案中,动物可以经基因修饰以抑制β-1,4N-乙酰氨基半乳糖转移酶2(β4GalNT2)的表达。

[0204] B.特异性基因修饰

[0205] 1.α1,3半乳糖基转移酶(αGal)

[0206] 在一个实施方案中,本发明提供了适合用作异种移植的器官、组织和细胞来源的转基因动物,其中供体动物缺乏αGal的表达或其表达已被降低。缺乏αGal表达(即αGal无效)的转基因动物具有一个或更多个另外的基因修饰,并且在某些实施方案中,至少四个另外的基因修饰、至少五个另外的基因修饰或至少六个另外的基因修饰。这些基因修饰可以是,例如,掺入或表达转基因。在具体实施方案中,转基因动物具有至少三个基因修饰,其导致(i)缺乏αGal的表达;(ii)在单个基因座中掺入和表达至少两种转基因。在某些实施方案中,单个基因座是修饰的αGal。

[0207] 已经实施多种策略来消除或调节异种移植引起的抗半乳糖体液反应,包括用α-半乳糖苷酶酶促去除表位(Stone et al.,Transplantation 63:640-645,1997)、特异性抗半乳糖抗体去除(Ye et al.,Transplantation 58:330-337,1994)、用其他碳水化合物部分对表位加帽,这未能消除.α.GT表达,并且补体抑制蛋白的引入报道转基因猪中.α.GT的竞争性抑制仅导致表位数量的部分减少。类似地,在N-乙酰氨基葡萄糖转移酶III(N-acetylglucosaminyltransferase III)转基因猪中阻断gal表位表达的尝试也仅导致gal表位数量的部分减少,并且未能显著延长灵长类受体中的移植物存活期。猪细胞和活体动

物中αGal基因座的单等位基因敲除是本领域已知的。异种移植领域的重大突破是产生第一批缺乏αGal的任何功能性表达的活猪(Phelps et al.Science 299:411-414(2003);另参见Revivicor,Inc.的PCT公开号WO 04/028243和Immerge Biotherapeutics,Inc.的PCT公开号WO 04/016742)。

[0208] 在一个实施方案中,动物(以及源自其的器官、组织和细胞)由包含至少六种转基因的转基因动物(例如,转基因猪)提供,其中六种转基因在单个基因座处掺入和表达,这些转基因在至少三个启动子的控制下,并且其中猪缺乏α1,3半乳糖基转移酶的表达。在示例性实施方案中,在修饰的αGal基因座处掺入和表达转基因。在某些实施方案中,至少三个启动子是外源的、天然的,或外源的和天然的组合。

[0209] 在一个实施方案中,提供了动物以及源自其的器官、组织和细胞,其(i)缺乏功能性αGal的任何表达和(ii)在单个基因座处掺入和表达至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种或至少十种或更多种转基因。在一些实施方案中,在修饰的αGal基因座处掺入和表达转基因。在某些实施方案中,动物可以包括一个或更多个另外的基因修饰。这些基因修饰可以导致在相同基因座或不同基因座处掺入和表达一种或更多种另外的转基因。

[0210] 在另一个实施方案中,提供了动物、器官、组织和细胞,其具有降低水平的功能性αGal表达,并且掺入和表达至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种、至少九种、至少十种、至少十一种或至少十二种另外的转基因。功能性αGal的表达可以降低,例如,至少约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、80%、约90%或约95%。

[0211] 缺乏或降低水平的功能性αGT表达可以通过本领域技术人员已知的任何合适的方法来实现。在一些实施方案中,提供了其中αGal基因的一个等位基因经由基因靶向事件失活的动物(例如,有蹄类动物、猪动物)。在另一个实施方案中,提供了猪动物,其中αGal基因的两个等位基因经由靶向事件失活。在一个实施方案中,可以经由同源重组来靶向基因。在其他实施方案中,基因可以被破坏,即遗传密码的一部分可以被改变,从而影响该基因区段的转录和/或翻译。例如,基因的破坏可以通过取代、缺失(“敲除”)或插入(“敲入”)技术发生,包括靶向插入选择性标志物基因(例如,neo),其使得αGal基因的编码区中断。可以插入期望的蛋白的另外的基因或调节现有序列转录的调节序列。

[0212] 在某些实施方案中,使αGal基因的等位基因失活,从而所得αGal酶不能再在细胞表面上生成Gal。在一个实施方案中,αGal基因可以被转录成RNA,但不能被翻译成蛋白。在另一个实施方案中,αGal基因可以以截短的形式转录。这种截短的RNA不能翻译,或可以翻译成非功能性蛋白。在替代的实施方案中,αGal基因可以以不发生基因转录的方式失活。在另一个实施方案中,αGal基因可以被转录,然后被翻译成非功能性蛋白。

[0213] 在一些实施方案中,可以通过使用替代的方法(例如靶向基因转录或翻译的方法)来降低活性αGal基因的表达。例如,可以通过使用靶向天然.α.GT基因或其mRNA的反义RNA或siRNA来降低表达。在其他实施方案中,使用位点特异性重组酶来靶向基因组的区域以进行重组。此类系统的实例是CRE-lox系统和Flp-Frt系统。

[0214] 具有两个无活性的αGal基因等位基因的猪不是天然存在的。先前发现,在尝试通过基因靶向事件敲除αGal基因的第二等位基因时,识别到点突变,其阻止第二等位基因产

生功能性αGal酶。

[0215] 因此,在本发明的另一个方面,可以通过至少一个点突变使αGal失活。在一个实施方案中,αGal基因的一个等位基因可以通过至少一个点突变而失活。在另一个实施方案中,αGal基因的两个等位基因均可以通过至少一个点突变而失活。在一个实施方案中,该点突变可以经由基因靶向事件发生。在另一个实施方案中,该点突变可以是天然发生的。在再一个实施方案中,可以经由诱变剂在αGal基因中诱导突变。

[0216] 2.β4GaINT2

[0217] 在一个实施方案中,本发明提供了适合用作异种移植的器官、组织和细胞来源的转基因动物,其中供体动物缺乏β1,4N-乙酰-氨基半乳糖转移酶2(β4GALNT2)的表达或其表达已被降低。缺乏β4GalNT2表达(即β4GalNT2无效)的转基因动物具有一个或更多个另外的基因修饰。这些基因修饰可以是,例如,掺入或表达转基因。在具体实施方案中,缺乏β1,4N-乙酰-氨基半乳糖转移酶2(β4GALNT2)的表达或其表达已被降低的转基因动物的特征还在于(i)缺乏αGal的表达;和(ii)在单个基因座中掺入和表达至少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子控制下。

[0218] β4Gal-NT2产生的聚糖是许多人的异种抗原。Estrada JL et al,Xenotransplantation 2015:22:194-202。在人和小鼠中,β4GalNT2催化N-乙酰氨基半乳糖添加至唾液酸修饰的乳糖胺中,以产生GalNAc b1-4(Neu5Ac a2-3)Gal b1-4GlcNAc b1-3Gal(Sda血型抗原)。该基因在猪的可移植器官(肾脏、心脏、肝脏、肺和胰腺)和内皮细胞中发挥作用。约5%的人具有无活性的β4GalNT2,因此产生针对该基因产生的SDa和CAD碳水化合物的抗体。

[0219] 可以使用任何合适的方法来生成其基因组缺乏或具有降低的内源β4GALNT2表达的猪。破坏可以位于内源猪β4GalNT2核酸序列中的许多位点。破坏的实例包括但不限于天然基因序列中的缺失和异源核酸序列插入天然基因序列中。插入的实例可以包括但不限于与终止密码子偶联的人工剪接受体或与融合配偶体(例如GFP)偶联的剪接供体。敲除构建体可以含有与内源β4GALNT2核酸序列同源的序列或与内源β4GALNT2核酸序列相邻的序列同源的序列。在一些情况下,敲除构建体可以含有编码选择性标志物(例如,抗生素抗性、荧光报告物(例如,GFP或YFP)或酶(例如,β-半乳糖苷酶))的核酸序列,其可操作地连接至调节序列(例如启动子)。敲除构建体可以包括其他核酸序列,例如重组序列(例如,loxP序列,参见Sendai,et al,Transplantation,81(5):760-766(2006))、剪接受体序列、剪接供体序列、转录起始序列和转录终止序列。内源β4GalNT2核酸序列的破坏可以导致基因表达降低或编码的多肽的非功能性截短或融合。

[0220] 在一个实施方案中,本发明提供了β4GALNT2表达降低或不表达β4GALNT2的转基因动物(例如,猪动物)。任选地,动物包含一个或更多个另外的基因修饰。在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,猪动物),其掺入和表达至少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子的控制下,其中该动物缺乏β4GALNT2的表达或具有降低的β4GALNT2表达。任选地,动物包含一个或更多个另外的基因修饰。在一个实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,猪动物),其表达就减少的由猪β4GALNT2产生的Sda或SDa样聚糖,或不表达由猪β4GALNT2产生的Sda或SDa样聚糖。任选地,动物包含一个或更多个另外的基因修饰。

[0221] 在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,猪动物),其掺入和表达至

少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子的控制下,其中该动物缺乏或具有减少表达的由猪β4GALNT2产生的Sda或SDa样聚糖。任选地,动物包含一个或更多个另外的基因修饰。

[0222] 3.CMAH

[0223] 在一个实施方案中,本发明提供了适合用作异种移植的器官、组织和细胞来源的转基因动物,其中供体动物缺乏胞苷单磷酸-N-乙酰神经氨酸羟化酶(CMAH)的表达,或其表达已被降低。缺乏CMAH表达(即CMAH无效)的转基因动物具有一个或更多个另外的基因修饰。这些基因修饰可以是,例如,掺入或表达转基因。在具体实施方案中,转基因动物具有至少四个另外的基因修饰,导致(i)缺乏αGal的表达;和(ii)在单个基因座中掺入和表达至少六种转基因。

[0224] 猪细胞表达胞苷单磷酸-N-乙酰神经氨酸羟化酶(CMAH),而人细胞中未发现这种酶。CMAH将唾液酸N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)转化成N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)。如此,在猪组织被移植至人体内时,这些表位在植入后立即引发人患者的抗体介导的排斥反应。

[0225] 可以使用任何合适的方法来生成其基因组含有内源CMAH表达缺失或表达降低的猪。破坏可以位于内源猪CMAH核酸序列中的许多位点。破坏的实例包括但不限于天然基因序列中的缺失和异源核酸序列插入天然基因序列中。插入的实例可以包括但不限于与终止密码子偶联的人工剪接受体或与融合配偶体(例如GFP)偶联的剪接供体。敲除构建体可以含有与内源CMAH核酸序列同源的序列或与内源CMAH核酸序列相邻的序列同源的序列。在一些情况下,敲除构建体可以含有编码选择性标志物(例如,抗生素抗性、荧光报告物(例如,GFP或YFP)或酶(例如,β-半乳糖苷酶))的核酸序列,其可操作地连接至调节序列(例如启动子)。敲除构建体可以包括其他核酸序列,例如重组序列(例如,loxP序列,参见Sendai,et al,Transplantation,81(5):760-766(2006))、剪接受体序列、剪接供体序列、转录起始序列和转录终止序列。内源CMAH核酸序列的破坏可以导致基因表达降低或编码的多肽的非功能性截短或融合。

[0226] 在一个实施方案中,本发明提供了CMAH糖基转移酶表达降低或不表达CMAH糖基转移酶的转基因动物(例如,猪动物)。任选地,动物包含一个或更多个另外的基因修饰。在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,猪动物),其掺入和表达至少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子的控制下,其中该动物缺乏CMAH的表达或具有降低的CMAH表达。任选地,动物包含一个或更多个另外的基因修饰。

[0227] 4.vWF

[0228] von Willebrand因子(vWF)基因是大且复杂的基因,具有多个结构域,并且其编码多聚糖蛋白。多聚糖蛋白vonWillebrand factor(vWF)的主要功能是血小板粘附至结缔组织和内皮下层,以及作为vWF与血小板糖蛋白Ib(GPIb)结合功能的血小板聚集。然而,在受体血小板的聚集对供体器官的存活产生破坏性影响时,这种现象在异种移植过程中不太有利。例如,将猪肺(和其他器官)移植至人或非人灵长类动物导致人血小板的自发聚集和分离。这可以通过猪VWF基因的“人源化”来避免,以消除猪vWF与人血小板的自发结合。通常,猪vWF基因的人源化或修饰需要删除与人血小板自发聚集相关的基因序列,并且用不产生自发聚集的人基因对应物替换。这可以包括删除全部或部分猪vWF基因,并且用全部或部分人vWF基因替换。

[0229] 旨在消除自发血小板聚集反应的猪vWF修饰可以包括D3(部分)、A1、A2、A3(部分)

结构域内的区域,这些结构域已知与hvWF中GP1b结合位点(D3结构域)的折叠和分离相关,以及与GP1b受体(A1结构域)和ADAMTS13切割位点(A2结构域)相关的区域。外显子22-28涵盖这些区域。在正常应力下,人血小板在猪血存在下自发聚集。为了避免这种对成功异种移植的潜在威胁,并且由于人vWF在血液中正常剪切应力的条件下不诱导自发血小板聚集,因此人vWF基因中与vWF蛋白折叠相关的区域以及与GPib结合、胶原蛋白结合(2个区域中的一个)和ADAMTS13切割相关的区域可以用于替换猪vWF基因中的基因组同源物(并导致嵌合人/猪蛋白)。通过这种方式,可以用来自人vWF基因的单个cDNA或基因组片段提供可以隐藏或掩蔽vWF上GP1b结合位点以及A结构域内的人源化受体位点的替换的折叠。这可以通过同源重组或基因靶向来实现,包括利用基因编辑方法增强此类机制(例如,CRISPR辅助同源重组可以用于将人vWF片段整合至猪vWF基因座中。该人片段替换上述涉及自发血小板聚集的区域,并且可以是来自人vWF基因的cDNA或基因组片段的形式)。

[0230] 在示例性实施方案中,相关的人vWF基因序列的插入可以通过用于基因组编辑的任何现有方法(例如但不限于CRISPR/CAS9、TALEN核酸酶)来完成。猪vWF的修饰可以通过仅替换猪vWF基因的相关区域,或可选地通过用hvWF替换整个pvWF基因来完成。

[0231] 在一个实施方案中,猪vWF基因的区域可以用人对应物(E22-E28区)替换。可选地,可以使用位点特异性重组系统(即CRE-LOX重组系统)和/或通过特异性核酸碱基对改变以用人对应物替换猪vWF基因组序列中的核苷酸来完全敲除转基因动物的vWF基因并完全替换人vWVF基因的基因合成序列。

[0232] 在一个实施方案中,本发明是转基因动物(例如猪转基因动物),其缺乏αGal的表达,以及对猪vWF基因的基因修饰。修饰可以是,例如,猪vWF基因的敲除并用人源化或嵌合vWF基因替换。转基因动物可以含有一个或更多个另外的基因修饰。在一个实施方案中,转基因动物进一步包含掺入和表达CD46。

[0233] 转基因动物还可以被育种成含有一个或更多个基因修饰的第二转基因动物。例如,发明是缺乏αGal表达以及对猪vWF基因进行基因修饰的转基因动物(例如猪转基因动物),其可以被育种成第二转基因动物,该第二转基因动物在单个基因座处含有至少六种转基因,或在单个基因座处含有至少六种转基因并在第二基因座处含有至少两种转基因,从而提供含有多个基因修饰的动物。

[0234] 在一个实施方案中,本发明是转基因动物(例如,猪转基因动物),其缺乏αGal的表达,以及对猪vWF基因的基因修饰(例如,嵌合的人-猪vWF)和在至少三个启动子控制下的单个基因座处的至少四个基因修饰。基因座可以变化。在示例性实施方案中,基因座是天然基因座或修饰的天然基因座。基因座可以是,例如,AAVS1、GHR、ROSA26、CMAH、β4GalNT2和GGTA1。可以通过同源重组或基因编辑工具掺入至少六种转基因。

[0235] 5.生长因子受体

[0236] 本发明提供了转基因动物,例如转基因猪动物,其具有基因改变以产生Laron综合征的一种或更多种特征。Laron综合征的特征在于缺乏响应于生长激素的IGF-1产生,并且通常是由生长激素受体中的突变引起的。Laron综合征患者身材矮小,也可能对某些病况(例如糖尿病(II型)和某些癌症)有抵抗力。转基因动物可以具有导致生长激素受体(GHR)表达降低的基因改变,或导致损害GHR功能的GHR突变的改变。在一些实施方案中,转基因动物具有GHR敲除基因改变。GHRKO改变的实例描述于,例如,Yu et al.,Generation of GHR-

modified pigs as Laron syndrome models via a dual-sgRNAs/Cas9 system and somatic cell nuclear transfer,J Transl Med 16:41(2018)。与没有基因改变的动物相比,转基因动物的GHR表达可以降低30％、40％、50％、75％或90％或更多。与没有基因改变的动物相比,转基因动物可以产生30％、40％、50％、75％或90％或更少的IGF-1。该基因修饰可以单独进行或与其他基因修饰组合进行。例如,该基因改变可以包括在本文所述的其他基因改变中(图2A-D)。

[0237] 引入本发明的转基因动物的基因组中的转基因可以是任何合适的转基因。

[0238] C.补体调节剂

[0239] 在一个实施方案中,转基因是免疫调节剂。在示例性实施方案中,供体动物已被基因修饰,结果是(i)αGal的表达缺乏或降低,和(ii)在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因,其中至少两种转基因中的至少一种是免疫调节剂。免疫调节剂可以是任何合适的免疫调节剂。在示例性实施方案中,免疫调节剂是补体调节剂(例如,补体抑制剂)或免疫抑制剂。

[0240] 在一个实施方案中,本发明提供了适合用作异种移植的器官、组织和细胞来源的转基因动物(例如,猪动物),其中供体动物已经基因修饰以掺入和表达至少一种补体调节剂,例如补体抑制剂。在示例性实施方案中,供体动物已被基因修饰,结果是(i)αGal的表达缺乏或降低,和(ii)在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因,其中至少一种转基因是补体调节剂或更具体地补体抑制剂。

[0241] 补体是一系列血液蛋白的统称,并且是免疫系统的主要效应机制。补体激活及其在靶结构上的沉积可以导致补体介导的直接细胞裂解,或由于生成强炎症调节剂以及募集和激活免疫效应细胞而间接导致细胞或组织破坏。介导组织损伤的补体激活产物在补体途径的各个点生成。宿主组织上不适当的补体激活在许多自身免疫性疾病和炎症性疾病的病理学中起着重要作用,并且也是许多与生物不相容性相关的疾病状态的原因,例如,心肺后炎症和移植排斥反应。细胞表面表达的补体抑制蛋白防止补体沉积在宿主细胞膜上。

[0242] 补体系统包含约30种蛋白的集合并且是免疫系统的主要效应机制之一。补体级联主要经由经典途径(通常具有抗体依赖性)或替代途径(通常不依赖于抗体)激活。经由任一途径的激活均导致生成C3转化酶,其是级联的核心酶复合物。C3转化酶将血清C3切割成C3a和C3b,后者与激活位点共价结合,并且导致进一步生成C3转化酶(放大环)。激活产物C3b(和仅经由经典途径生成的C4b)及其分解产物是重要的调理素,并且参与促进细胞介导的靶细胞裂解(通过吞噬细胞和NK细胞)以及免疫复合物转运和溶解。C3/C4激活产物及其在免疫系统的各种细胞上的受体对于调节细胞免疫应答也很重要。C3转化酶参与C5转化酶的形成,C5转化酶是切割C5产生C5a和C5b的复合物。C5a具有强促炎和趋化特性,并且可以募集和激活免疫效应细胞。C5b的形成启动终末补体途径,导致补体蛋白C6、C7、C8和(C9)n顺序组装,以形成膜攻击复合物(MAC或C5b-9)。MAC在靶细胞膜中的形成可以导致直接细胞裂解,但也可以引起细胞激活和各种炎症调节剂的表达/释放。

[0243] 膜补体抑制剂有两大分类:补体激活途径抑制剂(抑制C3转化酶形成)和终末补体途径抑制剂(抑制MAC形成)。补体激活的膜抑制剂包括补体受体1(CR1)、衰变加速因子(DAF或CD55)和膜辅因子蛋白(MCP或CD46)。它们都具有由不同数量的约60-70个氨基酸的重复单元(称为短同源重复(short consensus repeats,SCR),其是C3/C4结合蛋白的共同特征)

组成的蛋白结构。已识别人补体激活抑制剂的啮齿动物同源物。啮齿动物蛋白Cr1是广泛分布的补体激活抑制剂,其功能与DAF和MCP相似。尽管Cr1在功能上似乎是啮齿动物中补体激活最重要的调节因子,但啮齿动物还表达DAF和MCP。尽管在人中没有发现Cr1的同源物,但Cr1的研究及其在动物模型中的应用具有临床相关性。

[0244] 宿主细胞膜中终末补体途径和MAC形成的控制主要通过CD59的活性发生,CD59是广泛分布的20kD糖蛋白,其通过葡萄糖磷脂酰肌醇(glucosylphosphatidylinositol,GPI)锚附附接至质膜。在组装MAC中,CD59与C8和C9结合并阻止膜插入。

[0245] 膜结合补体调节蛋白(如DAF、MCP和CD59)保护宿主细胞免受其自身补体的影响。在器官被移植至另一个物种中时,受体中的天然抗体结合供体器官的内皮并激活补体,从而启动快速排斥反应。先前已表明,与人细胞相比,猪的那些细胞对人补体非常敏感,并且认为这是因为猪细胞表面补体调节蛋白对人补体无效。在器官被移植至另一个物种中时,受体中的天然抗体结合供体器官的内皮并激活补体,从而启动快速排斥反应。多种策略已被证明可以预防或延迟排斥反应,包括去除IgM天然抗体以及使用sCR1、肝素或C1抑制剂进行全身去补体或抑制补体。

[0246] 解决排斥反应问题的另一种方法是在转基因猪中表达人的膜结合的补体调节分子。已生成表达衰变加速因子DAF(CD55)、膜辅因子蛋白MCP(CD46)和反应性裂解膜抑制剂MIRL(CD59)的转基因猪。(参见Klymium et al.Mol Reprod Dev(2010)77:209-221)。这些人抑制剂已被证明在猪血管内皮上大量表达。用人血液对来自对照动物的心脏进行离体灌注,在数分钟内引起补体介导的器官破坏,而从转基因动物获得的心脏对补体具有不应性(refractory)并存活数小时。

[0247] 如上所述的在猪器官中表达人补体调节蛋白以使其“人源化”的基本原理基于以下假设:内源猪调节蛋白在抑制人补体方面效率低下,因此在异种移植的情况下对器官存活贡献很小。此外,可溶性补体抑制剂可以在体外防止补体介导的胰岛裂解。

[0248] 已分离和表征了几种人补体调节蛋白(CRP)的猪类似物。表达人补体调节蛋白分子的猪器官能够抵抗补体损伤,不是因为它们表达人CRP分子,而是因为它们表达的功能性CRP分子数量大大增加。猪CRP表达的增加在保护供体器官免受导致超急性排斥反应的补体损伤方面与表达人补体调节蛋白的供体器官同样有效。

[0249] CD46已被表征为具有调节特性的蛋白,其能够保护宿主细胞免受经由经典途径和替代途径激活的补体介导的攻击,可以在炎症和体液排斥反应过程中提供保护,免受由低水平的天然或诱导的抗Gal或抗非Gal抗体介导的补体裂解。因此,更多的胰岛能够移植并随后得到更好的保护免受排斥反应,从而减少免疫抑制的需求。

[0250] 在本发明的一个实施方案中,提供了动物(以及源自其的器官、组织和细胞),其缺乏功能性αGal的表达(或具有表达降低的αGal)和已经基因修饰以掺入和表达至少一种、至少两种、至少三种、或至少四种或更多种补体抑制剂。补体抑制剂的表达可以是遍在的或在组织特异性启动子的控制下。

[0251] 在示例性实施方案中,补体抑制剂是膜补体抑制剂。膜补体抑制剂可以是补体激活途径的抑制剂(抑制C3转化酶形成)或终末补体途径的抑制剂(抑制MAC形成)。补体激活的膜抑制剂包括补体受体1(CR1)、衰变加速因子(DAF或CD55)、膜辅因子蛋白(MCP或CD46)等。终末补体途径的膜抑制剂可包括CD59等。

[0252] 在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其包含基因修饰,该基因修饰导致(i)缺乏αGal的表达和(ii)在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子控制下,其中至少两种转基因中的至少一种是补体调节剂,并且更具体地,补体抑制剂,并且甚至更具体地,膜补体抑制剂。单个基因座可以选自天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座。在示例性实施方案中,至少六种转基因作为MCV提供,并且整合可以是随机整合或通过基因靶向工具促进。任选地,转基因动物包括一个或更多个另外的基因修饰,包括但不限于天然猪vWF、B4GalNT2、CMAH或Forsmann基因的修饰。

[0253] 在示例性实施方案中,提供了动物(以及源自其的器官、组织和细胞),其包含至少六种转基因,其中所述六种转基因在单个基因座处掺入和表达,这些转基因在至少三个启动子控制下,并且其中猪缺乏α1,3半乳糖基转移酶的表达,其中至少六种转基因包括至少两种补体调节子,并且更具体地,两种补体抑制剂。另外的转基因可以是,例如,免疫抑制剂、细胞保护基因或其组合。单个基因座可以选自天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座。在示例性实施方案中,至少六种转基因作为MCV提供,并且整合是随机的或通过基因靶向工具促进。任选地,转基因动物包括一个或更多个另外的基因修饰。

[0254] 在示例性实施方案中,提供了动物(以及源自其的器官、组织和细胞),其缺乏功能性αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以掺入和表达至少四种另外的转基因,其中至少四种另外的转基因中的至少两种中的至少一种是补体抑制剂,并且更具体地,至少两种膜补体抑制剂。

[0255] 在示例性实施方案中,提供了动物(以及源自其的器官、组织和细胞),其缺乏功能性αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以(i)掺入和表达至少两种补体抑制剂,并且更具体地,至少两种膜补体抑制剂,以及(ii)掺入和表达至少两种另外的转基因,该另外的转基因选自抗凝剂、免疫抑制剂、细胞保护基因或其组合。

[0256] 在一个实施方案中,提供了动物(以及源自其的器官、组织和细胞),其缺乏功能性αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以(i)掺入和表达CD46和CD55并且(i)掺入和表达至少两种另外的转基因。在某个实施方案中,另外的转基因选自抗凝剂、免疫抑制剂、细胞保护基因或其组合。

[0257] 在具体实施方案中,提供了动物(以及源自其的器官、组织和细胞),其缺乏功能性αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以掺入和表达至少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子的控制下,其中所述转基因中的至少一种是CD46并且表达受内源启动子控制。

[0258] 在另一个实施方案中,提供了动物(以及源自其的器官、组织和细胞),其缺乏功能性αGal的表达(或其中表达降低)并且已经基因修饰以(i)掺入和表达CD46和CD55,并且(i)掺入和表达至少三种另外的转基因。在某个实施方案中,另外的转基因选自抗凝剂、免疫抑制剂细胞保护基因或其组合。在示例性实施方案中,至少三种另外的转基因包括至少两种抗凝剂。在示例性实施方案中,至少三种另外的转基因包括至少两种抗凝剂和免疫抑制剂。

[0259] 在另一个实施方案中,提供了动物(以及源自其的器官、组织和细胞),其缺乏功能性αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以(i)掺入和表达CD46和CD55,并且(i)掺入和表达至少四种另外的转基因。在某个实施方案中,另外的转基因选自抗凝剂、免疫抑制

剂、细胞保护基因或其组合。在示例性实施方案中,至少四种另外的转基因包括至少两种抗凝剂。在示例性实施方案中,至少四种另外的转基因包括至少两种抗凝剂和免疫抑制剂。在示例性实施方案中,至少四种另外的转基因包括至少三种抗凝剂。

[0260] 在另一个实施方案中,提供了动物(以及源自其的器官、组织和细胞),其缺乏功能性αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以(i)掺入和表达CD46和CD55,并且(i)掺入和表达至少五种另外的转基因。在某个实施方案中,另外的转基因选自抗凝剂、免疫抑制剂、细胞保护基因或其组合。在示例性实施方案中,至少五种另外的转基因包括至少两种抗凝剂和至少一种免疫抑制剂。在示例性实施方案中,至少五种另外的转基因包括至少三种抗凝剂和至少一种免疫抑制剂。在示例性实施方案中,至少五种另外的转基因包括至少两种抗凝剂和至少两种免疫抑制剂。在一个实施方案中,动物可以经修饰以表达补体调节肽、其生物活性片段或衍生物。在一个实施方案中,补体调节肽是全长补体调节肽。在另外的实施方案中,补体调节肽可以含有少于全长的补体调节蛋白。

[0261] 本领域技术人员已知的任何人或猪补体调节序列或其生物活性部分或片段可以根据本发明的组合物和方法。在另外的实施方案中,根据本发明可以使用任何共有补体调节肽。在另一个实施方案中,核酸和/或肽序列与本文所述的补体调节肽和核苷酸序列至少80%、85%、90%或95%同源。在进一步的实施方案中,可以使用表现出与补体调节剂相似的活性的任何片段或同源序列。任选地,表达至少六种转基因中的至少一种补体调节剂(例如,补体抑制剂)并且缺乏α1,3gal表达的动物具有至少一个另外的基因修饰。

[0262] D.免疫抑制剂

[0263] 在一个实施方案中,本发明提供了适合用作异种移植的器官、组织和细胞来源的转基因动物,其中供体动物已经基因修饰以掺入和表达至少一种免疫抑制剂。转基因动物通常具有一个或更多个另外的基因修饰,更具体地,五个或更多个另外的基因修饰,甚至更具体地,六个或更多个另外的基因修饰。

[0264] “免疫抑制剂”转基因能够下调免疫应答。对于任何类型的移植程序,功效和毒性之间的平衡是其临床接受的关键因素。关于胰岛移植,进一步的担忧是许多现行免疫抑制剂,特别是糖皮质激素或钙调磷酸酶抑制剂,例如他克莫司(Tarcolimus),损害β细胞或诱导外周胰岛素抵抗(Zeng et al.Surgery(1993)113:98-102)。无类固醇免疫抑制方案(“Edmonton方案”),包括西罗莫司、低剂量他克莫司和抗IL-2受体的单克隆抗体(mAb),已用于对1型糖尿病患者进行仅胰岛移植的试验(Shapiro,A.M.J.et al,(2000),N.Eng.J.Med.,343:230-238)。最近使用“Edmonton方案”的成功重新燃起了人们对使用胰岛移植治疗糖尿病的热情。然而,对他克莫司毒性的担忧可能限制该疗法在人中的应用。

[0265] 阻断关键T细胞共刺激信号(特别是CD28途径)的生物制剂是保护胰岛的潜在可选方案。阻断CD28途径的试剂的实例包括但不限于可溶性CTLA4,包括突变CTLA4分子。

[0266] T细胞激活参与移植排斥反应的发病机制。T细胞的激活需要至少两组信号传导事件。第一组是通过T细胞受体对抗原肽(其与抗原呈递细胞(APC5)上的主要组织相容性复合物(MHC)分子结合)的特异性识别来启动。第二组信号是非抗原特异性的,并且由T细胞共刺激受体与APC上的其配体相互作用传递。在缺乏共刺激的情况下,T细胞的激活受损或中止,这可能导致克隆失能的抗原特异性无反应状态,或通过细胞凋亡死亡而消除(deletion)。因此,T细胞共刺激的阻断可提供以抗原特异性方式抑制非期望的免疫应答,同时保留正常

免疫功能的方法。(Dumont,F.J.2004Therapy 1,289-304)。

[0267] 1.CTLA4

[0268] 迄今已识别的几种T细胞共刺激途径中,最突出的是CD28途径。CD28是在T细胞上表达的细胞表面分子,其反受体B7.1(CD80)和B7.2(CD86)分子存在于树突细胞、巨噬细胞和B细胞上,已被表征和识别为中断T细胞共刺激信号的有吸引力的靶标。与CD28同源的第二T细胞表面分子称为细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白(CTLA 4)。CTLA4是细胞表面信号传导分子,但与CD28的作用相反,CTLA4负调节T细胞功能。CTLA4对B7配体的亲和力是CD28的20倍高。

[0269] CD28/B7途径已成为中断T细胞共刺激信号的有吸引力的靶标。CD28/B7抑制剂的设计已利用该系统的内源负调节因子CTLA4。CTLA4-免疫球蛋白(CTLA4-Ig)融合蛋白作为抑制T细胞共刺激的手段已被广泛研究。任何免疫抑制疗法均必须达到困难的平衡;必须提供足够的抑制来克服疾病或排斥反应,但过度免疫抑制将抑制整个免疫系统。CTLA4-Ig的免疫抑制活性已在器官移植和自身免疫性疾病动物模型的临床前研究中得到证实。可溶性CTLA4最近已在患有肾衰竭、银屑病和类风湿性关节炎的人患者中进行测试,并且被配制为Bristol-Myers Squibb(Abatacept,可溶性CTLA4-Ig)开发的药物,该药物已获批用于治疗类风湿性关节炎。该药物是新型选择性T细胞共刺激调节剂中的第一种药物。Bristol-Myers Squibb还正在进行Belatacept(LEA29Y)用于同种异体肾脏移植的II期临床试验。LEA29Y是CTLA4的突变形式,其已经工程化以具有比野生型CTLA4更高的对B7受体的亲和力,其与免疫球蛋白融合。Repligen公司还正在进行CTLA4-Ig用于特发性血小板减少性紫癜的临床试验。标题为“使用可溶性CTLA4突变分子保护同种异体胰岛移植物的方法”的美国专利号5,730,403描述了使用可溶性CTLA4-Ig和CTLA4突变分子保护同种异体胰岛移植物。

[0270] 尽管来自一种生物体的CTLA-4能够与来自另一种生物体的B7结合,但同种异体B7的亲和力最高。因此,虽然来自供体生物体的可溶性CTLA-4可以与受体B7(正常细胞上)和供体B7(异种移植细胞上)两者结合,但它优先结合异种移植物上的B7。因此,在包含用于异种移植的猪动物或细胞的本发明的实施方案中,猪CTLA4是典型的。帝国理工学院的PCT公开号WO 99/57266描述了猪CTLA4序列以及用于异种移植疗法的可溶性CTLA4-Ig的施用。VaughnA.et al.,J Immunol(2000)3175-3181描述了可溶性猪CTLA4-Ig的结合和功能。猪CTLA4-Ig结合猪(但不结合人)B7,阻断受体T细胞上的CD28并使这些局部T细胞失能,而不引起整体T细胞免疫抑制(参见Mirenda et.al.,Diabetes 54:1048-1055,2005)。

[0271] 许多关于CTLA4-Ig作为免疫抑制剂的研究均侧重于向患者施用可溶形式的CTLA4-Ig。已建立经工程化以表达CTLA4-Ig的转基因小鼠,并进行了多项实验。Ronchese等人在小鼠中表达CTLA4后,总体检查了免疫系统功能(Ronchese et al.J Exp Med(1994)179:809;Lane et al.J Exp Med.(1994)March 1;179(3):819)。Sutherland等人(Transplantation.200069(9):1806-12)描述了小鼠转基因胎仔胰腺同种异体移植物分泌的CTLA4-Ig的保护作用,以测试转基因表达的CTLA4-Ig对同种异体胰岛移植的作用。Lui等人(J Immunol Methods 2003277:171-183)报道了转基因小鼠的产生,其在乳腺特异性启动子控制下表达CTLA4-Ig,以诱导转基因动物乳汁中表达可溶性CTLA4-Ig用作生物反应器。

[0272] Alexion Phamaceuticals Inc.的PCT公开号WO 01/30966描述了含有附接至补体蛋白CD59的T细胞抑制剂CTLA-4的嵌合DNA构建体,以及包含其的转基因猪细胞、组织和器官。PCT公开号WO2007035213(Revivicor)描述了已经基因修饰以表达CTLA4-Ig的转基因猪动物。

[0273] 可以在动物、组织或细胞中表达另外的免疫抑制剂。例如,在小鼠中被灭活从而产生免疫受损表型的基因可以在猪中通过基因靶向进行克隆和破坏。一些在小鼠中被靶向并可以被靶向以产生免疫受损猪的基因包括β2-微球蛋白。在一个实施方案中,供体动物经修饰以转基因表达细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4-免疫球蛋白(CTLA4)。动物或细胞可以经修饰以表达CTLA4肽或其生物活性片段(例如,胞外结构域、肽的截短形式,其中至少跨膜结构域已被去除)或其衍生物。该肽可以是,例如,人或猪的肽。CTLA4肽可以发生突变。

[0274] 突变肽可以具有比野生型更高的对猪和/或人B7分子的亲和力。在一个具体实施方案中,突变的CTLA4可以是CTLA4(Glu104,Tyr29)。CTLA4肽可以经修饰以使其在细胞内表达。CTLA4肽的其他修饰包括向N末端或C末端添加内质网滞留信号。内质网滞留信号可以是,例如,序列KDEL。CTLA4肽可以与肽二聚化结构域或免疫球蛋白(Ig)分子融合。CTLA4融合肽可以包括能够连接两个肽的接头序列。在另一个实施方案中,可以向根据本发明产生的缺乏功能性免疫球蛋白表达的动物施用CTLA4肽或其变体(pCTLA4-Ig或hCTLA4-Ig(Abatacept/Orencia或Belatacept))作为药物以抑制它们的T细胞应答。如本文所用,CTLA4用于指任何这些变体或本领域已知的变体,例如CTLA4-Ig。

[0275] 在一个实施方案中,CTLA4肽是全长CTLA4。在进一步的实施方案中,CTLA4肽可以含有少于全长的CTLA4蛋白。在一个实施方案中,CTLA4肽可以含有CTLA-4肽的胞外结构域。在具体实施方案中,CTLA4肽是CTLA4的胞外结构域。在更进一步的实施方案中,本发明提供了CTLA4的突变形式。在一个实施方案中,CTLA4的突变形式可以具有比野生型更高的对猪和/或人B7的亲和力。在一个特定实施方案中,突变的CTLA4可以是人CTLA4(Glu104,Tyr29)。

[0276] 在一个实施方案中,CTLA4可以是CTLA4的截短形式,其中至少蛋白的跨膜结构域已被去除。在另一个实施方案中,CTLA4肽可以经修饰,使得其在细胞内表达。在一个实施方案中,可以将高尔基体滞留信号添加至CTLA4肽的N末端或C末端。在一个实施方案中,高尔基体滞留信号可以是序列KDEL,其可以添加至CTLA4肽的C末端或N末端。在进一步的实施方案中,CTLA4肽可以与肽二聚化结构域融合。在一个实施方案中,CTLA4肽可以与免疫球蛋白(Ig)融合。在另一个实施方案中,CTLA4融合肽可以包括能够连接两个肽的接头序列。

[0277] 本领域技术人员已知的任何人CTLA4序列或其生物活性部分或片段可以根据本发明的组合物和方法而定。非限制性实例包括但不限于以下描述人CTLA4序列的Genbank登录号:NM005214.2;BC074893.2;BC074842.2;AF414120.1;AF414120;AY402333;AY209009.1;BC070162.1;BC069566.1;L15006.1;AF486806.1;AC010138.6;AJ535718.1;AF225900.1;AF225900;AF411058.1;M37243.1;U90273.1;和/或AF316875.1。编码CTLA4肽的其他核苷酸序列可以选自包括但不限于以下来自EST数据库的Genbank登录号:CD639535.1;A1733018.1;BM997840.1;BG536887.1;BG236211.1;BG058720.1;A1860i99.1;AW207094.1;AA210929.1;A1791416.1;BX113243.1;AW515943.1;BE837454.1;AA210902.1;BF329809.1;A1819438.1;BE837501.1;BE837537.1;和/或AA873138.1。

[0278] 在另外的实施方案中,根据本发明可以使用任何共有CTLA4肽。在另一个实施方案中,核酸和/或肽序列与天然CTLA4肽和核苷酸序列至少80％、85％、90％或95％同源。在进一步的实施方案中,可以使用表现出与CTLA4相似活性的任何片段或同源序列。在其他实施方案中,表现出T细胞抑制活性的氨基酸序列可以是猪CTLA4序列的氨基酸38至162或人CTLA4序列的氨基酸38至161(参见,例如,PCT公开号WO 01/30966)。在一个实施方案中,使用的部分应具有母体分子活性的至少约25％,优选至少约50％。

[0279] 在其他实施方案中,本发明的CTLA4核酸和肽可以与免疫球蛋白基因和分子或其片段或区域融合。本发明的CTLA4序列包括与免疫球蛋白融合的那些序列。在一个实施方案中,Ig可以是人Ig。在另一个实施方案中,Ig可以是IgG,特别是IgG1。在另一个实施方案中,Ig可以是IgG的恒定区。在具体实施方案中,恒定区可以是IgG1的C.γ.1链。在本发明的一个具体实施方案中,猪CTLA 4的胞外结构域可以与人C.γ.1Ig融合。在另一个具体实施方案中,人CTLA4的胞外结构域可以与IgG1或IgG4融合。在另外的具体的实施方案中,突变的CTLA4(Glu 104,Tyr 29)的胞外结构域可以与IgG1融合。在一个实施方案中,至少一种转基因是B7-H4,也称为B7x。B7-4H在2003年被鉴别,并且属于免疫球蛋白B7家族。

[0280] 2.CIITA

[0281] 在一个实施方案中,供体动物经修饰以转基因表达II类反式激活因子(CIITA)及其突变体PDL1、PDL2、肿瘤坏死因子-α相关凋亡诱导配体(TRAIL)、Fas配体(FasL、CD95L)、整联蛋白相关蛋白(CD47)、HLA-E、HLA-DP、HLA-DQ或HLA-DR。

[0282] II类反式激活因子(CIITA)是双功能或多功能结构域蛋白,其充当转录激活蛋白并在MHC II类基因的表达中发挥关键作用。先前已证明,人CIITA基因的突变形式编码缺乏氨基末端151个氨基酸的蛋白,其作为HLA II类表达的有效显性失活抑制因子(Yun et al.,Int Immunol.19970ctober;9(10):1545-53)。猪MHC II类抗原是人CD4+T细胞直接识别T细胞的有效刺激剂,因此可能在临床异种移植中对转基因猪供体的排斥反应中发挥重要作用。已报道一种突变的人CIITA构建体在猪细胞中有效,显著抑制IFN[γ]诱导的以及组成型猪MHC II类表达。此外,携带突变的人CIITA构建体的稳定转染的猪血管内皮细胞系未能刺激纯化的人CD4+T细胞的直接T细胞异种识别(Yun etal.,Transplantation.2000Mar.15;69(5):940-4)。来自CIITA-DN转基因动物的器官、组织和细胞可以在人受体中诱导明显减少的T细胞排斥反应。与其他转基因相组合,突变的CIITA的转基因表达可以使异种移植物能够长期存活,并且具有临床可接受的免疫抑制水平。

[0283] 在一个实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,猪),其包含导致(i)缺乏αGal的表达和(ii)在单个基因座处掺入和表达至少两种转基因的基因修饰,其中至少六种转基因包括至少一种免疫抑制剂。单个基因座可以选自天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座。任选地,转基因动物包括一个或更多个另外的基因修饰。

[0284] 在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其包含导致(i)缺乏αGal的表达和(ii)在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因的基因修饰,其中至少两种转基因中的至少两种是免疫抑制剂。单个基因座可以选自天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座。至少六种转基因可以作为MCV提供并且利用基因编辑工具掺入基因座中。任选地,转基因动物包括一个或更多个另外的基因修饰。

[0285] 在示例性实施方案中,提供了动物(以及源自其的器官、组织和细胞),其缺乏功能

性αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以(i)在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因,其中至少六种转基因包括至少一种免疫抑制剂。免疫抑制剂可以是,例如,CIITA-DN或CLTA4-IG。至少六种转基因可以包括选自补体抑制剂、抗凝剂或其组合的另外的转基因。单个基因座可以选自天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座。至少三种转基因可以作为MCV提供并且利用基因编辑工具掺入基因座中。任选地,转基因动物包括一个或更多个另外的基因修饰。

[0286] 在示例性实施方案中,提供了动物(以及源自其的器官、组织和细胞),其缺乏功能性αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以(i)在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因,其中至少六种转基因包括至少两种免疫抑制剂。免疫抑制剂可以是,例如,CIITA-DN或CLTA4-IG。至少六种转基因还可以包括至少一种补体抑制剂、至少两种抗凝剂、至少两种补体抑制剂或其组合。单个基因座可以选自天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座。至少六种转基因可以作为MCV提供并且利用基因编辑工具掺入基因座中。任选地,转基因动物包括一个或更多个另外的基因修饰。

[0287] E.其他免疫调节剂

[0288] 1.PDL1,PDL2

[0289] T细胞激活的典型共刺激分子是CD80/86或CD40。除了过去几年中的这些正向共刺激途径外,还发现了介导负信号并对T细胞激活的调节非常重要的新的共刺激途径。这些较新的途径之一是由程序性死亡1(PD-1)受体及其配体PD-L1和PD-L2组成的途径。PD-1受体在静息细胞中不表达,但在T细胞和B细胞激活后表达上调。PD-1含有基于酪氨酸的细胞质免疫受体开关基序,并且PD-L1或PD-L2与PD-1的结合在T细胞中产生抑制信号。最近的数据表明,PD1/PD配体途径可以在对表现出调节活性的T细胞亚群的控制中发挥作用。在小鼠中,PD-1信号已被证明是调节性T细胞(Treg)的抑制活性和适应性Treg的生成所必需的。这些观察结果表明PD-1/PDLig及其相互作用不仅抑制T细胞应答,还可以激发免疫调节。

[0290] 多项证据表明,PD-1/PD配体途径可以控制同种异体移植物的植入和排斥,这意味着这些分子是器官移植后免疫调节的感兴趣的靶标。事实上,在大鼠移植模型中,通过将PDL1Ig基因转移至供体心脏,可以延长同种异体移植物的存活期。此外,已报道在小鼠中通过注射PD-L1 Ig增强PD-1信号传导可以保护移植物免受排斥反应。最近的数据还表明,小鼠中的胰岛移植物上PD-L1 IG的过表达可以部分延长胰岛移植物的存活期。猪细胞和组织中人PD-L1或PD-L2的转基因表达应减少通过直接致敏途径引发的早期人抗猪T细胞应答(Plege et al.,Transplantation.2009Apr.15;87(7):975-82)。通过Treg的诱导,也可能通过实现持久耐受所需的间接途径来控制对异种移植物敏感的T细胞。

[0291] 在具体实施方案中,缺乏αGal的表达并且掺入和表达在至少三个启动子的控制下的至少六种转基因的转基因动物包含PDL1或PDL2的掺入和表达。

[0292] 2.TRAIL/Fas L

[0293] 凋亡诱导配体(例如Fas配体(FasL、CD95L)或肿瘤坏死因子-α相关凋亡诱导配体(TRAIL、Apo-2L))的表达可以消除攻击异种移植物的T细胞。TRAIL是II型膜蛋白,具有与其他肿瘤坏死因子家族成员同源的胞外结构域,显示出与FasL具有最高的氨基酸同一性(28%)。TRAIL优先对肿瘤细胞发挥其凋亡诱导作用。在正常细胞中,TRAIL受体的结合不导致细胞死亡。最近的研究表明,免疫细胞(包括T细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞和树突细胞)

的细胞毒性作用至少部分由TRAIL介导。转基因猪中人TRAIL的表达可以为保护猪组织在异种移植至灵长类动物后免受细胞介导的排斥反应提供合理的策略。人TRAIL的稳定表达已经在转基因猪中实现,并且表达的TRAIL已被证明在体外具有生物学功能(Klose et al., Transplantation.2005Jul.27;80(2):222-30)。在一些实施方案中,缺乏αGal的表达并且掺入和表达在至少三个启动子的控制下的至少六种转基因的转基因动物包含TRAIL或FasL的掺入和表达。

[0294] 3.NK细胞应答——HLA-E/β2微球蛋白和HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR

[0295] 人自然杀伤(NK)细胞是成功进行猪到人异种移植的潜在障碍,因为它们离体浸润用人血灌注的猪器官,并且直接地和在人血清存在的情况下通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性在体外裂解猪细胞。正常自体细胞上抑制性NK受体的主要组织相容性复合物(MHC)I类配体的表达阻止NK细胞自身反应性。大多数激活的人NK细胞上表达的抑制性受体CD94/NKG2A与人白细胞抗原(HLA)-E特异性结合。非经典人MHC分子HLA-E是携带CD94/NKG2A的NK细胞的有效抑制配体,并且与经典MHC分子不同,它不诱导同种异体T细胞应答。HLA-E在内质网中组装并且作为稳定的三聚体复合物转运至细胞表面,该三聚体复合物由HLA-E重链、.β.2-微球蛋白(.β.2m)和源自一些MHC 1类分子的前导序列的肽组成。HLA-E的表达已被证明提供针对异种人NK细胞细胞毒性的部分保护(Weiss et al., Transplantation.2009Jan.15;87(1):35-43)。猪器官上HLA-E的转基因表达有可能显著减轻人NK细胞介导的猪异种移植排斥反应,而没有同种异体反应的风险。此外,已成功生成了携带其他HLA基因的转基因猪,其目标是使猪器官、组织和细胞“人源化”(Huang et al., Proteomics.2006November;6(21):5815-25,还参见美国专利号6,639,122)。

[0296] 在具体实施方案中,缺乏αGal的表达并且掺入和表达在至少三个启动子的控制下的至少六种转基因的转基因动物包含HLA-3的掺入和表达。

[0297] 4.CD47

[0298] CD47(分化簇47)也称为整联蛋白相关蛋白(IAP),其是人中由CD47基因编码的跨膜蛋白。已知CD47既是免疫抑制剂又是免疫调节剂,并且在SIRP-α信号传导中具有致耐受性。CD47是遍在表达的50-kDa细胞表面糖蛋白,其作为信号调节蛋白(SIRP)-α(也称为CD172a、SHPS-1、SIRP-α,巨噬细胞上的免疫抑制受体)的配体。CD47和SIRP-α构成细胞-细胞通讯系统(CD47-SIRP-α系统),其在多种细胞过程(包括细胞迁移、B细胞粘附和T细胞激活)中发挥重要作用。此外,CD47-SIRP-α系统与巨噬细胞吞噬作用的负调节有关。几种细胞类型(即红细胞、血小板或白细胞)表面上的CD47可以通过与抑制性巨噬细胞受体SIRP-α结合来防护巨噬细胞的吞噬作用。CD47-SIRP-α相互作用在自我识别和吞噬抑制中的作用已通过以下观察证明:原代野生型小鼠巨噬细胞快速吞噬从CD47缺陷型小鼠获得的未经调理的RBC,但不吞噬来自野生型小鼠的RBC。

[0299] 通过其SIRP-α受体,CD47抑制Fcγ和补体受体介导的吞噬作用。猪CD47不诱导人巨噬细胞样细胞系中的SIRP-α-酪氨酸磷酸化,并且可溶性人CD47-Fc融合蛋白抑制人巨噬细胞对猪细胞的吞噬活性。如此,操纵猪细胞表达人CD47从根本上降低细胞对人巨噬细胞吞噬作用的敏感性(Ide et al.,Proc Natl Acad Sci USA.2007Mar.20;104(12):5062-6)。猪细胞上人CD47的表达可以向人巨噬细胞上的SIRP-α提供抑制信号传导,从而提供防止巨噬细胞介导的异种移植排斥反应的途径。

[0300] 在一些实施方案中,缺乏αGal的表达并且掺入和表达在至少三个启动子控制下的至少六种转基因的转基因动物包含CD47的掺入和表达。在示例性实施方案中,提供了动物(以及源自其的器官、组织和细胞),其缺乏功能性αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以(i)在单个基因座掺入和表达至少六种转基因,其中至少六种转基因中的一种是CD47。在一些实施方案中,至少六种转基因可以包括另外的转基因,该另外的转基因选自补体抑制剂、抗凝剂或其组合。在一些实施方案中,单个基因座可以选自天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座。至少三种转基因可以作为MCV提供并且利用基因编辑工具掺入基因座中。任选地,转基因动物包括一个或更多个另外的基因修饰。

[0301] F.抗凝剂

[0302] 在一个实施方案中,本发明提供了适合用作异种移植的器官、组织和细胞来源的转基因动物,其中转基因动物已经基因修饰以掺入和表达至少一种抗凝剂。在一些实施方案中,动物包含另外的基因修饰。在一些实施方案中,转基因动物包含至少十个基因修饰,并且甚至更具体地。在一些实施方案中,十个基因修饰包含至少六种转基因插入和至少四种敲除基因。在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物,其包含至少十个基因修饰,该基因修饰导致(i)缺乏αGal的表达和(ii)在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子的控制下,其中至少两种转基因是抗凝剂。在一些实施方案中,至少两种抗凝转基因在内皮特异性启动子的控制下。

[0303] 在一些实施方案中,抗凝剂可以是任何合适的抗凝剂。合适的抗凝转基因的代表性非限制性实例包括组织因子途径抑制剂、水蛭素、血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白C受体(EPCR)、CD39及其组合。在一些实施方案中,抗凝剂选自由内皮蛋白C受体(EPCR)、血栓调节蛋白、CD39、水蛭素、组织因子途径抑制剂(TFPI)及其组合组成的组。在一些实施方案中,抗凝剂的表达可以是遍在在的或组织特异性的。在一些实施方案中,抗凝剂的表达受主要在内皮中具有活性的启动子控制。

[0304] 1.TFPI

[0305] 组织因子途径抑制剂(TFPI)是单链多肽,其可以可逆地抑制因子Xa(Xa)和凝血酶(因子IIa),从而抑制TF依赖性凝血。有关TFPI的综述,请参见Crawleyand Lane(ArteriosclerThrombVascBiol.2008,28(2):233-42)。Dorling及同事生成了表达融合蛋白的转基因小鼠,该融合蛋白由与人CD4的跨膜/细胞质结构域连接的人TFPI的三个Kunitz结构域组成,具有用于靶向Weibel-Palade细胞内储存颗粒的P-选择素尾(Chen D,etal.AmJTransplant2004;4:1958-1963.)。所导致的TFPI在内皮上的激活依赖性展示足以完全抑制环孢素处理的大鼠对小鼠心脏异种移植物的血栓形成介导的急性体液排斥反应。还表明有效调节凝血功能可以预防慢性排斥反应。用表达水蛭素/CD4/P-选择素融合蛋白的转基因小鼠心脏获得类似的结果,表明在该模型中抑制凝血酶生成或活性是保护的关键。

[0306] 2.水蛭素

[0307] 水蛭素是药用水蛭(例如欧洲医蛭(Hirudomedicinalis))唾液腺中天然存在的肽,并且是凝血酶的有效抑制剂。Dorling及同事(Chenetal.,JTransplant.2004December;4(12):1958-63)还生成了表达膜系链(membrane-tethered)水蛭素融合蛋白的转基因小鼠,并且将其心脏移植至大鼠体内(小鼠-大鼠Xeno-Tx)。与对照非转基因小鼠心脏(3天内

全部被排斥)相比,来自两个转基因小鼠品系的100%的器官完全抵抗体液排斥反应,并且在施用环孢素A抑制T细胞介导的排斥反应时存活超过100天。Riesbeck et al.,(Circulation.1998Dec.15;98(24):2744-52)还探索了哺乳动物细胞中水蛭素融合蛋白的表达用于预防血管内血栓形成的策略。细胞中的表达降低局部凝血酶水平并抑制纤维蛋白形成。因此,水蛭素是另一种用于预防异种移植中血栓形成作用的感兴趣的抗凝转基因。

[0308] 3.血栓调节蛋白

[0309] 血栓调节蛋白(TBM)通过与凝血酶形成1:1化学计量复合物,在抗凝途径中凝血酶诱导的蛋白C激活中充当辅助因子。内皮细胞蛋白C受体(EPCR)是N-糖基化的I型膜蛋白,其增强蛋白C的激活。Van de Wouwer et al.,Arterioscler Thromb Vasc Biol.2004August;24(8):1374-83综述了这些蛋白在蛋白C抗凝系统中的作用。不同小组已探索这些和其他抗凝转基因的表达,以潜在地解决异种移植的凝血障碍(由Cowan and D'Apice,Cur Opin Organ Transplant.2008April;13(2):178-83综述)。Esmon及同事(Li et al.,J Thromb Haemost.2005July;3(7):1351-9)在转基因小鼠的内皮细胞上过表达EPCR,并且显示这种表达保护小鼠免受血栓形成的威胁。Iino et al.,(J Thromb Haemost.2004May;2(5):833-4)表明经由基因疗法在供体胰岛中体外过表达TBM可作为预防胰岛移植中血栓并发症的手段。

[0310] 4.CD39

[0311] CD39是主要的血管核苷三磷酸二磷酸水解酶(NTPDase),并且将ATP和ADP转化成AMP并最终转化成腺苷。细胞外腺苷在血栓形成和炎症中发挥重要作用,因此对其在移植中的有益作用进行研究(由Robson et al.Semin Thromb Hemost.2005April;31(2):217-33综述)。最近的研究已表明CD39在减少炎症反应方面具有主要作用(Beldi et al.,Front Biosci,2008,13:2588-2603)。表达hCD39的转基因小鼠在心脏移植模型中表现出受损的血小板聚集、延长的出血时间和对全身性血栓栓塞的抵抗(Dwyer et al.,J Clin Invest.2004May;113(10):1440-6)。它们还显示在胰岛上表达CD39,并且在与人血液一起孵育时,与野生型胰岛相比,这些胰岛显著延迟凝血时间(Dwyer et al.,Transplantation.2006Aug.15;82(3):428-32)。在转基因猪中由组成型启动子系统高水平表达hCD39的初步研究显示出高产后致死率(Revivicor,Inc.,未公开的数据)。然而,转基因猪对内皮细胞特异性表达CD39表现出更好的耐受性。因此,需要以不损害动物健康的方式在猪中表达某些抗凝转基因,但仍提供足够的表达水平以用于临床异种移植。

[0312] 在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其具有基因修饰,该基因修饰导致(i)缺乏αGal的表达(或表达降低)和(ii)在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因,这些转基因在三个启动子控制下,其中两种转基因中的至少一种是抗凝剂。

[0313] 在一个实施方案中,抗凝剂选自组织因子途径抑制剂、水蛭素、血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白C受体(EPCR)、CD39及其组合。在一些实施方案中,单个基因座可以是天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座。在一些实施方案中,天然基因座可以是GGTA1、B4GalNT2、GHR、CMAH、Rosa26、AAVS1或可能赋予整合转基因有益表达特征的其他内源基因座。

[0314] 在一些实施方案中,至少六种转基因在至少三个启动子的控制下,可以作为MCV提

供,并且掺入可以使用基因编辑工具。这种编辑可以涉及靶向插入预定位点(例如着陆区),其充当“安全港”(以免中断基因组中任何必需基因),和/或提供整合位点特有的期望特征。在对于防止异种移植排斥反应很重要的基因座处插入的情况下,多转基因的插入还可以导致参与在灵长类动物中诱导异种反应的猪基因失活(即αGal、CMAH或B4GalNT2或其他基因(iGB3,Forssman)失活)。任选地,动物可以包括一个或更多个另外的基因修饰,并且在多于一个基因座处,其中在一个基因座处插入至少六种转基因,并且另一组两种或更多种转基因(在至少三个启动子的控制下)可以在第二位点进行共整合。替代的实施方案提供了在一个基因座处插入MCV,并且在不同基因座处靶向失活,其中这种失活可以通过基因编辑工具促进。

[0315] 在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其具有导致(i)缺乏αGal的表达(或表达降低)和(ii)在单个基因座处掺入和表达至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、或至少八种或更多种转基因的基因修饰,其中至少一种、至少两种或至少三种转基因是抗凝剂。在一个实施方案中,抗凝剂选自组织因子途径抑制剂、水蛭素、血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白C受体、CD39及其组合。在一些实施方案中,至少六种转基因可以作为MCV提供并且掺入可以涉及基因编辑工具。在一些实施方案中,单个基因座可以是天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座。在一些实施方案中,转基因动物可以包括一个或更多个另外的基因修饰。

[0316] 本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其缺乏αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以掺入和表达至少三种抗凝剂。在某些实施方案中,抗凝剂选自组织因子途径抑制剂(TFPI)、水蛭素、血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白C受体、CD39及其组合。在某些实施方案中,至少三种抗凝剂中的至少一种受主要在内皮细胞中有活性的启动子的表达控制。在某些实施方案中,至少三种抗凝剂中的至少两种受主要在内皮细胞中有活性的启动子的表达控制。

[0317] 在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其缺乏αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以掺入和表达至少三种抗凝剂,其中至少三种抗凝剂中的一种是EPCR。

[0318] 在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其缺乏αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以掺入和表达至少三种抗凝剂,其中至少三种抗凝剂包括EPCR和TBM。

[0319] 在一个实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其缺乏αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以掺入和表达至少四种另外的转基因,其中至少四种另外的转基因包括至少一种抗凝剂。在某些实施方案中,至少一种抗凝剂选自组织因子途径抑制剂、水蛭素、血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白C受体、CD39及其组合。在一个实施方案中,至少一种抗凝剂是EPCR。

[0320] 在一个实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其缺乏αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以掺入和表达至少四种另外的转基因,其中至少四种另外的转基因包括至少两种抗凝剂。在某些实施方案中,至少两种抗凝剂选自组织因子途径抑制剂、水蛭素、血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白C受体、CD39及其组合。在一个实施方案中,至少两种抗凝剂包括EPCR和TBM。在另一个实施方案中,至少两种抗凝剂包括

EPCR和TFPI。

[0321] 在一个实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其缺乏αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以掺入和表达至少四种另外的转基因,其中至少四种另外的转基因包括至少三种抗凝剂。在某些实施方案中,至少三种抗凝剂选自组织因子途径抑制剂、水蛭素、血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白C受体、CD39及其组合。在一个实施方案中,至少三种抗凝剂包括EPCR、TBM和TFPI。在另一个实施方案中,至少三种抗凝剂包括EPCR、TBM和CD39。

[0322] 在一个实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其缺乏αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以掺入和表达至少五种另外的转基因,其中至少五种另外的转基因包括至少两种抗凝剂。在某些实施方案中,至少两种抗凝剂选自组织因子途径抑制剂、水蛭素、血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白C受体、CD39及其组合。在一个实施方案中,至少两种抗凝剂包括EPCR和TBM。在另一个实施方案中,至少两种抗凝剂包括EPCR和TFPI。

[0323] 在一个实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其缺乏αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以掺入和表达至少五种另外的转基因,其中至少五种另外的转基因包括至少三种抗凝剂。在某些实施方案中,至少三种抗凝剂选自组织因子途径抑制剂、水蛭素、血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白C受体、CD39及其组合。在一个实施方案中,至少三种抗凝剂包括EPCR、TBM和TFPI。在另一个实施方案中,至少三种抗凝剂包括EPCR、TBM和CD39。

[0324] 在一个实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其缺乏αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以掺入和表达至少六种另外的转基因,其中至少六种另外的转基因包括至少两种抗凝剂。在某些实施方案中,至少两种抗凝剂选自组织因子途径抑制剂、水蛭素、血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白C受体、CD39及其组合。在一个实施方案中,至少两种抗凝剂包括EPCR和TBM。在另一个实施方案中,至少两种抗凝剂包括EPCR和TFPI。任选地,至少六种另外的转基因还包括至少一种免疫抑制剂。

[0325] 在一个实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,有蹄类动物、猪动物),其缺乏αGal的表达(或表达降低)并且已经基因修饰以掺入和表达至少六种另外的转基因,其中至少六种另外的转基因包括至少三种抗凝剂。在某些实施方案中,至少三种抗凝剂选自组织因子途径抑制剂、水蛭素、血栓调节蛋白、内皮细胞蛋白C受体、CD39及其组合。在一个实施方案中,至少三种抗凝剂包括EPCR、TBM和TFPI。在另一个实施方案中,至少三种抗凝剂包括EPCR、TBM和CD39。

[0326] G.细胞保护转基因

[0327] 本发明提供了适合用作异种移植的器官、组织和细胞来源的转基因动物,其中转基因动物已经基因修饰以掺入和表达至少一种低温保护转基因(“细胞保护剂”)。在一些实施方案中,至少一种细胞保护转基因在组成型启动子或内皮特异性启动子的控制下。在一些实施方案中,至少一种细胞保护转基因选自由血红素加氧酶1(HO-1)、A20、FAT-1、可溶性肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及其组合组成的组。

[0328] 本发明提供了转基因动物(例如猪),其包含基因修饰,该基因修饰导致:(i)缺乏αGal的表达;和(ii)在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因,这些转基因在至少三个启

动子的控制下,其中至少六种转基因中的至少一种是细胞保护转基因。

[0329] 细胞保护转基因被认为包括抗细胞凋亡剂、抗氧化剂和抗炎剂。实例包括A20、血红素加氧酶1(HO-1)、FAT-1、可溶性肿瘤坏死因子-α(TNF-α)。

[0330] 1.A20

[0331] A20提供抗炎和抗细胞凋亡活性。可以通过抗炎、抗凝和/或抗凋亡分子来保护血管化的移植器官免受内皮细胞激活和细胞损伤。人A20基因(hA20)是具有调节急性血管排斥反应(AVR)巨大潜力的基因之一,它首先被识别为人脐静脉内皮细胞中的肿瘤坏死因子(TNF)-α诱导因子。人A20具有双重细胞保护功能,通过分别阻断几种半胱天冬酶和转录因子核因子-κB来保护内皮细胞免受TNF介导的细胞凋亡和炎症的影响。已产生有活力的A20转基因仔猪,并且在这些动物中hA20的表达仅限于骨骼肌、心脏和PAEC,其被hA20表达保护而免受TNF介导的细胞凋亡,并且至少部分地抵抗CD95(Fas)L介导的细胞死亡。此外,来自hA20转基因克隆猪的心肌细胞受到部分保护以免受心脏损伤(Oropeza et al.,Xenotransplantation.2009November;16(6):522-34)。

[0332] 2.HO-1

[0333] HO提供抗炎、抗凋亡和抗氧化活性。血红素加氧酶(HO)是血红素分解代谢中的限速酶,也称为HSP32,属于热休克蛋白成员,其中血红素环被切割成二价铁、一氧化碳(CO)和胆绿素,然后胆绿素还原酶将其转化成胆红素。HO的三种亚型(包括HO-1、HO-2和HO-3)已被克隆。HO-1的表达是高度诱导型的,而HO-2和HO-3是组成型表达的(Maines M D et al.,Annual Review ofPharmacology&Toxicology 1997;37:517-554,和Choi A M et al.,American Journal of Respiratory Cell&Molecular Biology 1996;15:9-19)。对$HO\text{-}1^{-/-}$小鼠的分析表明,编码HO-1的基因调节铁稳态,并且作为细胞保护基因,其具有有效的抗氧化、抗炎和抗凋亡作用。最近在人HO-1缺乏症病例报告中描述了类似的发现。

[0334] HO-1的细胞保护作用(包括抗炎、抗氧化和抗凋亡)的分子机制由其反应产物介导。HO-1表达可以通过不同金属的原卟啉在体外和体内调节。钴原卟啉(CoPP)和铁原卟啉(FePP)可以上调HO-1的表达。相反,锡原卟啉(SnPP)和锌原卟啉(ZnPP)在蛋白水平上抑制HO-1的活性。HO-1的表达抑制小鼠到大鼠心脏移植物的排斥反应,保护胰岛细胞免于凋亡,并且改善移植后胰岛细胞的体内功能。还已证明通过基因转移施用HO-1提供针对高氧诱导的肺损伤的保护,上调HO-1保护遗传性肥胖的Zucker大鼠肝脏免受缺血/再灌注损伤,并且HO-1基因的消融或表达调节顺铂诱导的肾小管细胞凋亡。在转基因动物模型中,显示了HO-1的过表达防止肺部炎症和血管对缺氧的反应,并且保护心脏免受缺血和再灌注损伤。已产生携带HO-1转基因的猪,但尚未报道与它们在异种移植中的使用相关的临床效果(美国专利号7,378,569)。

[0335] 3.FAT-1

[0336] FAT-1提供抗炎活性。多不饱和脂肪酸(PUFA)发挥抑制(n-3类)炎症的作用。哺乳动物细胞缺乏将n-6PUFA转化成n-3PUFA的去饱和酶。因此,必须通过饮食提供必需的n-3脂肪酸。然而,与哺乳动物不同的是,自由生活的线虫动物秀丽隐杆线虫表达n-3脂肪酸去饱和酶,该酶将双键引入n-6-脂肪酸烃链的n-3位置处,以形成n-3PUFA。已生成表达线虫fat-1基因的转基因小鼠,因此能够有效地将饮食中的6系列PUFA转化成3系列PUFA,例如EPA(20:5n-3)和DHA(22-6n-3)。另一小组产生转基因小鼠模型,其中fat-1cDNA的密码子经过

进一步优化,以便在哺乳动物系统中有效翻译;n-3PUFA的内源产生通过过表达秀丽隐杆线虫n-3脂肪酸去饱和酶基因mfat-1实现。该小组显示,通过mfat-1的转基因表达,细胞内n-3PUFA的增加和n-6PUFA的减少增强了分离的小鼠胰岛中葡萄糖、氨基酸和GLP-1刺激的胰岛素分泌,并且使胰岛对细胞因子诱导的细胞死亡具有强抵抗力(Wei et al.,Diabetes.2010February;59(2):471-8)。

[0337] 4.可溶性TNF-α受体(sTNFR1)

[0338] 肿瘤坏死因子(TNF、恶病质素(cachexin或cachectin),并且正式名称为肿瘤坏死因子-α)是参与全身炎症的细胞因子,并且是刺激急性期反应的一组细胞因子中的一员。TNF的主要作用是调节免疫细胞。TNF能够诱导凋亡性细胞死亡,从而诱发炎症。可溶性TNF-α受体1(sTNFR1)是TNFR1的胞外结构域并且是TNF-α的拮抗剂(Su et al.,1998.Arthritis Rheum.41,139-149)。异种移植物中sTNFR1的转基因表达可能具有有益的抗炎作用。

[0339] 具有相关抗氧化特性的其他细胞保护剂包括但不限于SOD和过氧化氢酶(Catalyse)。氧是所有需氧生物体的必需分子,并且在ATP生成(即氧化磷酸化)中起主要作用。在该过程中,活性氧(ROS),包括超氧阴离子(O(2)(-))和过氧化氢(H(2)O(2))作为副产物产生。在人体中,抗氧化防御系统平衡ROS的生成。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶是两种具有抗氧化特性的酶。SOD催化超氧自由基歧化为过氧化氢,后者通过过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶转化成水。移植环境中可以发生因ROS生成而导致的细胞损伤。由于抗氧化防御能力下降,胰腺β细胞特别容易受到自由基和炎症损伤。常用的抗排斥药物具有优异的抑制适应性免疫应答的作用;然而,大多数对胰岛有害,并且不能很好地防护胰岛分离和缺血再灌注损伤引起的活性氧和炎症。因此,人们对用抗氧化剂离体治疗胰岛,或经由基因疗法或在供体组织中转基因表达来表达抗氧化基因感兴趣。EC-SOD和过氧化氢酶的离体基因转移在抗原诱导的关节炎的大鼠模型中具有抗炎作用(Dai et al.,Gene Ther.2003April;10(7):550-8)。此外,通过门静脉递送EC-SOD和/或过氧化氢酶基因显著减轻了小鼠模型中的肝脏I/R损伤(He et al.,Liver Transpl.2006December;12(12):1869-79)。在最近的小鼠研究中,与未处理的对照相比,在同基因、次优同基因或异种移植之前用催化抗氧化剂处理的胰岛表现出优越的功能。在同一项研究中,接受催化抗氧化剂处理的同种异体胰岛的糖尿病小鼠受体在移植后表现出改善的血糖控制,并且表现出同种异体移植排斥反应延迟。此外,过表达MnSOD的胰岛移植物的功能比对照移植物长约50%。此外,某些抗凝剂还提供抗炎活性,包括血栓调节蛋白、EPCR和CD39。

[0340] 在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,猪),其包含导致(i)缺乏α Gal的表达;和(ii)在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因(在至少三个启动子的控制下),其中至少六种转基因中的至少一种是细胞保护转基因。单个基因座可以是天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座。至少两种转基因可以作为MCV提供并且掺入可以涉及基因编辑工具。任选地,动物可以具有一个或更多个另外的基因修饰。

[0341] 在示例性实施方案中,本发明提供了转基因动物(例如,猪),其包含导致(i)缺乏α Gal的表达;和(ii)在单个基因座处掺入和表达至少五种、至少六种、至少七种或至少八种转基因,或在一个基因座处掺入和表达至少六种转基因并且在第二基因座处掺入和表达一种或更多种转基因,其中至少一种转基因是细胞保护转基因,并且其中至少六种转基因在至少三个启动子的控制下,该至少三个启动子可以是组成型、普遍存在的、组织特异性的或

诱导型调节启动子系统的不同组合。转基因可以作为MCV提供并且掺入可以涉及基因编辑工具。单个基因座可以是天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座。任选地,动物可以具有一个或更多个另外的基因修饰。

[0342] IV.转基因动物的产生

[0343] 本发明提供了制备包含至少六种转基因的转基因猪的方法,其包括以下步骤:(i)用单个多顺反子载体转染猪细胞,该单个多顺反子载体包含(a)至少两种补体抑制剂转基因;(b)至少一种免疫抑制转基因;(c)至少一种细胞保护转基因;和(d)至少两种抗凝转基因;(ii)通过在单个基因组基因座处掺入和表达该多顺反子载体来产生包含至少六种转基因的多转基因猪细胞;(iii)通过将该多转基因猪细胞的细胞核注射至重建的体细胞核移植(SCNT)来生成多转基因猪合子;和(iv)允许该多转基因猪合子成熟为多转基因猪。在一些实施方案中,猪细胞和多转基因猪缺乏α1,3半乳糖基转移酶的表达。

[0344] 本发明的转基因动物可以通过本领域技术人员已知的任何方法产生,包括但不限于选择性育种,核移植,将DNA引入卵母细胞、精子、合子或卵裂球中,或通过使用胚胎干细胞。还可以利用基因编辑工具,如本文进一步所述。

[0345] 在一些实施方案中,在动物中可以鉴定基因修饰,然后将这些动物一起育种以形成具有期望的一组基因修饰(或单个基因修饰)的动物群。这些子代可以经进一步育种以在其后代中产生不同的或相同的基因修饰组(或单个基因修饰)。具有期望基因修饰的动物的育种周期可以按照人们的意愿持续下去。本文中的"群"可以包括随时间产生的具有相同或不同基因修饰的多代动物。"群"还可以指具有相同或不同基因修饰的单代动物。

[0346] 可用于基因修饰(经由,例如,但不限于同源重组、随机插入/整合、核酸酶编辑、锌指加TALEN核酸酶、CRISPR/Cas 9核酸酶)的细胞包括,例如,上皮细胞、神经细胞、表皮细胞、角质形成细胞、造血细胞、黑色素细胞、软骨细胞、淋巴细胞(B淋巴细胞和T淋巴细胞)、红细胞、巨噬细胞、单核细胞、单核细胞、成纤维细胞、心肌细胞和其他肌细胞等。此外,用于产生转基因动物(经由,例如,但不限于核移植)的细胞可以从不同的器官(例如皮肤、肺、胰腺、肝脏、胃、肠、心脏、生殖器官、膀胱、肾脏、尿道和其他泌尿器官等)获得。细胞可以从身体的任何细胞或器官(包括所有体细胞或生殖细胞)获得。

[0347] 另外,可以从多种不同的器官和组织获得可以进行基因修饰的动物细胞,例如但不限于皮肤、间充质、肺、胰腺、心脏、肠、胃、膀胱、血管、肾脏、尿道、生殖器官以及整个或部分胚胎、胎仔或成年动物的分解制品。在本发明的一个实施方案中,细胞可以选自由以下组成的组,但不限于上皮细胞、成纤维细胞、神经细胞、角质形成细胞、造血细胞、黑色素细胞、软骨细胞、淋巴细胞(B和T)、巨噬细胞、单核细胞、单核细胞、心肌细胞、其他肌肉细胞、颗粒细胞、卵丘细胞、表皮细胞、内皮细胞、胰岛Langerhans细胞、血细胞、血液前体细胞、骨细胞、骨前体细胞、神经元干细胞、原始干细胞、成体干细胞、间充质干细胞、肝细胞、角质形成细胞、脐静脉内皮细胞、主动脉内皮细胞、微血管内皮细胞、成纤维细胞、肝脏星状细胞、主动脉平滑肌细胞、心肌细胞、神经元、Kupffe细胞、平滑肌细胞、Schwann细胞和上皮细胞、红细胞、血小板、中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、脂肪细胞、软骨细胞、胰岛细胞、甲状腺细胞、甲状旁腺细胞、腮腺细胞、肿瘤细胞、神经胶质细胞、星形胶质细胞、红细胞、白细胞、巨噬细胞、上皮细胞、体细胞、垂体细胞、肾上腺细胞、毛细胞、膀胱细胞、肾细胞、视网膜细胞、视杆细胞、视锥细胞、心脏细胞、起搏细胞、脾脏细胞、抗原呈

递细胞、记忆细胞、T细胞、B细胞、浆细胞、肌肉细胞、卵巢细胞、子宫细胞、前列腺细胞、阴道上皮细胞、精子细胞、睾丸细胞、生殖细胞、卵细胞、睾丸间质细胞、管周细胞、支持细胞、叶黄素细胞、宫颈细胞、子宫内膜细胞、乳腺细胞、卵泡细胞、粘液细胞、纤毛细胞、非角化上皮细胞、角化上皮细胞、肺细胞、杯状细胞、柱状上皮细胞、鳞状上皮细胞、骨细胞、成骨细胞和破骨细胞。在一种替代的实施方案中,可以使用胚胎干细胞。可以采用胚胎干细胞系,或者可以从宿主(例如猪动物)新鲜获得胚胎干细胞。细胞可以在适当的成纤维细胞饲养层上生长或在白血病抑制因子(LIF)存在下生长。

[0348] 胚胎干细胞是优选的生殖细胞类型,可以采用胚胎干细胞系,或者可以从宿主(例如猪动物)新鲜获得胚胎干细胞。细胞可以在适当的成纤维细胞饲养层上生长或在白血病抑制因子(LIF)存在下生长。

[0349] 特别感兴趣的细胞除其他谱系外进一步包括干细胞,例如造血干细胞、胚胎干细胞、间充质干细胞等、胰岛Langerhans、可以分泌多巴胺的肾上腺髓质细胞、成骨细胞、破骨细胞、上皮细胞、内皮细胞、白细胞(例如B淋巴细胞和T淋巴细胞)、骨髓单核细胞等、神经元、神经胶质细胞、神经节细胞、视网膜细胞、肝脏细胞(例如肝细胞)、骨髓细胞、角质形成细胞、毛囊细胞和成肌(肌肉)细胞。

[0350] 在具体实施方案中,细胞可以是成纤维细胞或成纤维细胞样细胞,其具有与成纤维细胞无法区分的形态或表型,或者衰老前的寿命为至少10天或至少12天或至少14天或至少18天或至少20天,或具有足以允许非衰老细胞核同源重组和核移植的寿命;在一个具体实施方案中,细胞可以是胎仔成纤维细胞。成纤维细胞是合适的体细胞类型,因为它们可以从发育中的胎仔和成年动物中大量获得。这些细胞可以容易地在体外繁殖,倍增时间短,并且可以克隆繁殖用于基因靶向程序。使用的细胞可以来自胎仔动物或者可以是新生动物或来自成年动物。细胞可以是成熟的或未成熟的、分化的或未分化的。

[0351] A.同源重组

[0352] 同源重组允许内源基因进行位点特异性修饰,因此可以将新的改变工程化到基因组中。同源重组的主要步骤是DNA链交换,这涉及DNA双链体与至少一条含有互补序列的DNA链配对,以形成含有异源双链体DNA的中间重组结构(参见,例如,Radding,C.M.(1982)Ann.Rev.Genet.16:405;美国专利号4,888,274)。异源双链体DNA可以采取多种形式,包括含有三链体形式的三DNA链,其中单个互补链入侵(invade)DNA双链体(Hsieh et al.(1990)Genes and Development 4:1951;Rao et al.,(1991)PNAS 88:2984),并且在两条互补的DNA链与DNA双链体配对时,可以形成经典的Holliday重组接合或chi结构(Holliday,R.(1964)Genet.Res.5:282),或双D环("Diagnostic Applications ofDouble-D Loop Formation"U.S.Ser.No.07/755,462,filed Sep.4,1991)。一旦形成,异源双链体结构可以通过链断裂和交换而解离,使得入侵DNA链的全部或部分被剪接成受体DNA双链体,添加或替换受体DNA双链体的区段。

[0353] 可选地,异源双链体结构可以导致基因转化,其中通过使用入侵链作为模板修复错配碱基,将入侵链的序列转移至受体DNA双链体(Genes,3rd Ed.(1987)Lewin,B.,John Wiley,NewYork,N.Y.;Lopez et al.(1987)Nucleic Acids Res.15:5643)。无论是通过断裂和重新连接机制还是通过基因转换机制,在同源配对接合处形成异源双链DNA都可以用于将遗传序列信息从一个DNA分子转移至另一个DNA分子。

[0354] 同源重组(基因转换和经典链断裂/重新连接)在DNA分子之间转移遗传序列信息的能力使得靶向同源重组成为基因工程和基因操纵中的强有力方法。

[0355] 在同源重组中,输入的DNA与基因组中含有基本上同源的DNA序列的位点相互作用并整合至该位点中。在非同源("随机"或"非法(illicit)")整合中,输入的DNA并未在基因组中的同源序列处发现,而是在其他地方(大量潜在位置中的一个)整合。通常,高等真核细胞的研究表明,同源重组的频率远低于随机整合的频率。这些频率的比率对"基因靶向"有直接影响,"基因靶向"取决于通过同源重组的整合(即外源"靶向DNA"和基因组中相应"靶DNA"之间的重组)。本发明可以使用同源重组来使基因失活或在细胞(例如上述细胞)中插入并上调或激活基因。DNA可以在特定基因座处包含至少一部分基因,其在天然基因的至少一个、任选两个拷贝中引入改变,以防止功能性基因产物的表达。改变可以是插入、缺失、替换、突变或其组合。在仅将改变引入失活的基因的一个拷贝时,具有靶基因的单个未突变拷贝的细胞被扩增,并且可以进行第二靶向步骤,其中改变可以与第一改变相同或不同,通常不同,并且在涉及缺失或替换的情况下,可以与最初引入的改变的至少一部分重叠。在该第二靶向步骤中,可以使用具有相同的同源臂但含有不同的哺乳动物选择性标志物的靶向载体。对所得的转化体进行筛选,筛选出不存在功能性靶抗原的转化体,并且可以进一步筛选细胞的DNA以确保不存在野生型靶基因。可选地,表型的纯合性可以通过对突变杂合的宿主进行育种来实现。

[0356] 许多文章描述了同源重组在哺乳动物细胞中的用途。这些文章的举例有Kucherlapati et al.(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:3153-3157;Kucherlapati et al.(1985)Mol.Cell.Bio.5:714-720;Smithies et al.(1985)Nature 317:230-234;Wake et al.(1985)Mol.Cell.Bio.8:2080-2089;Ayares et al.(1985)Genetics 111:375-388;Ayares et al.(1986)Mol.Cell.Bio.7:1656-1662;Song et al.(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:6820-6824;Thomas et al.(1986)Cell 44:419-428;Thomas and Capecchi,(1987)Cell 51:503-512;Nandi et al.(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:3845-3849;和Mansour et al.(1988)Nature336:348-352;Evans and Kaufman,(1981)Nature 294:146-154;Doetschman et al.(1987)Nature 330:576-578;Thoma and Capecchi,(1987)Cell 51:503-512;Thompson et al.(1989)Cell 56:316-321。

[0357] 在一个实施方案中,在本发明的转基因动物中掺入和表达的至少六种转基因是通过同源重组引入的。在另一个实施方案中,在本发明的转基因动物中掺入和表达的六种转基因中的至少一种是通过同源重组引入的。

[0358] B.随机插入

[0359] 在一个实施方案中,编码转基因序列的DNA可以随机插入细胞的染色体中。随机整合可以由本领域技术人员已知的将DNA引入细胞的任何方法产生。这可以包括但不限于电穿孔、声穿孔、使用基因枪、脂转染、磷酸钙转染、使用树形分子、显微注射、使用病毒载体(包括腺病毒、AAV和逆转录病毒载体)以及II组核酶。在一个实施方案中,编码DNA可以被设计为包括报告基因,使得转基因或其表达产物的存在可以通过报告基因的激活来检测。可以使用本领域已知的任何报告基因,例如以上公开的那些。报告基因还可以是被添加至细胞中的转基因中的一种,使得该转基因(例如DAF或CD46或EPCR或CD47)的细胞表面表达可以与流式细胞术(和所述转基因特异性荧光抗体)结合使用,作为富集基因转移和转基因

(以及共同插入的转基因组合)的后续表达的手段。通过在细胞培养物中选择其中报告基因已被激活的那些细胞,可以选择含有转基因的细胞。在其他实施方案中,可以经由电穿孔将编码转基因的DNA引入细胞中。在其他实施方案中,可以经由脂转染、感染或转化将DNA引入细胞中。在一个实施方案中,电穿孔和/或脂转染可以用于转染成纤维细胞。在具体的实施方案中,转染的成纤维细胞可以用作核移植的核供体,以生成本领域已知的和如下所述的转基因动物。

[0360] 然后,可以通过FACS对已针对报告基因的存在进行染色的细胞进行分选,以富集细胞群,从而使我们拥有更高百分比的含有编码感兴趣转基因的DNA的细胞。在其他实施方案中,然后可以将FACS分选的细胞培养一段时间,例如12小时、24小时、36小时、48小时、72小时、96小时或更多小时,或者培养这样的时间段以允许DNA整合以产生稳定转染的细胞群。

[0361] 在一个实施方案中,在本发明的转基因动物中掺入和表达的至少六种转基因是通过随机整合引入的。在另一个实施方案中,在本发明的转基因动物中掺入和表达的六种转基因中的至少一种是通过随机整合引入的。例如,通过随机整合将包含至少两种转基因的双顺反子载体掺入基因组中。

[0362] C.靶向基因组编辑

[0363] 在示例性实施方案中,利用基因组编辑工具将转基因掺入动物中。这些工具包括但不限于核酸酶和位点特异性重组酶。在示例性实施方案中,插入的方法通过利用基因编辑工具(例如但不限于整合酶(重组酶)、CRISPR/CAS 9核酸酶、TALAN核酸酶、锌指核酸酶)的基因组编辑方法来促进。

[0364] 转基因可以靶向选自天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座(例如,着陆区)的单个基因座。天然基因座可以是,例如,GGTA1、β4GalNT2、CMAH、GHR、ROSA26、AAVS1。天然基因座可以经修饰,即修饰的天然基因座,例如修饰的(GGTA1、β4GalNT2或CMAH)。

[0365] 在示例性实施方案中,转基因可以靶向着陆区和/或对接位点或其他稳定表达位点。在一个实施方案中,着陆区或对接载体可以被插入任何感兴趣的基因座(例如GGTA1、CMAH、β4Gal、ROSA26、GHR、AAVS1)或者转基因可以靶向任何已知的“安全港”基因座,或任何可能提供有益基因表达谱的预定基因座,或者其中预定基因座也可能使优选基因失活且与此同时插入和敲除有益于移植结果。在另一个实施方案中,基因编辑可以用于产生双链断裂,其启动DNA修复机制以产生小插入、缺失或核酸取代(插入缺失),其导致靶位点处的基因激活或敲除;在这种情况下,插入缺失可以在细胞或所得克隆猪中在一个预定基因座(例如GGTA1、CMAH、B4GalNT2)处产生,同时在另一个基因座处具有基因编辑增强的多顺反子载体敲入。

[0366] 在具体实施方案中,基因编辑用于同时(使用多个Crispr-Cas9指导RNA、TALEN或ZFN(或其组合))使猪基因组中的一个、两个或三个内源基因座(例如,GGTA1、CMAH、B4GalNT2、GHR中的一个或全部)失活,并且其中这些基因编辑增强的修饰中的一个或更多个还导致具有在至少三个启动子控制下的至少六种转基因的多顺反子载体在一个或更多个这样的天然或修饰的天然基因座处的靶向插入。

[0367] 在一些实施方案中,CRISPR/Cas9介导的基因编辑包括:诱导型启动子或诱导型系统、四环素/多西环素调节系统;包含U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2];TRE3Gp[CAS9];

CAGpr[tTA];CAGpr[hCD46-2A-hCD55的多顺反子载体;或SEQ ID NO:9的核苷酸序列。在一些实施方案中,诱导型启动子控制生长激素受体基因的表达。

[0368] 1.锌指核酸酶/TALEN

[0369] 在一个实施方案中,利用锌指核酸酶(ZFN)掺入转基因。锌指核酸酶是非特异性DNA切割基序与序列特异性锌指蛋白的融合体。核酸酶活性是FokI细菌限制性内切酶的衍生物,能够产生单链断裂。ZFN通过使两个DNA结合域和两个FokI酶二聚化来产生具有18bp特异性的双链断裂。在另一个实施方案中,使用转录激活剂样效应核酸酶(TALEN)掺入转基因。

[0370] TALEN的功能与ZFN类似,通过将FokI核酸内切酶系链至DNA结合域来产生双链断裂。在该过程中,已报道TALEN定向诱变的靶向效率达到73.1%,双等位基因敲除率为27.8%。TALEN与ZFN的区别可能在于其易于基因设计、成本降低以及靶向频率略有提高。在一个实施方案中,本发明利用将ZFN和TALEN直接注射至猪合子中,这可以引入内源基因或小插入或缺失或核苷酸取代,并且产生具有期望的基因修饰的仔猪。

[0371] 2.CRISPR/CAS9核酸酶

[0372] 在另一个实施方案中,利用CRISPR/CAS 9核酸酶掺入转基因。CRISPR/Cas9源自细菌防御机制,其通过RNA指导的靶向来切割外源DNA。在细菌中,外源DNA被消化并插入CRISPR基因座,由此产生CRISPR RNA(crRNA)。然后,这些短RNA序列与基因组中的同源序列(可能是外来序列)缔合。在同源基因组序列的3’末端后接适当的“原型间隔子相邻基序”(PAM)时,Cas9核酸内切酶产生双链断裂。PAM间隔子有助于防止CRISPR基因座本身被靶向。CRISPR/Cas9系统已被证明在细菌之外也有用,并且于2013年首次用于从猪基因组中去除αGal。最常用的系统源自化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes),其具有NGG的3’PAM序列,其中N代表任何核苷酸。该系统允许在由GN19NGG组成的任何猪基因组序列中产生突变事件。

[0373] CRISPR/Cas9系统还可以与同源定向修复(HDR)结合使用,HDR是天然存在的核酸修复系统,其由DNA中存在双链断裂(DSB)启动(Liang et al.1998)。更特别地,CRISPR/Cas9系统可以用于产生靶向双链断裂,它可以用于控制HDR基因组工程技术的特异性(Findlay et al.2014;Mali et al.February 2014;Ran et al.2013),并且可以用于修改许多生物体(包括哺乳动物和人)的基因组(Sander andYoung,2014)。

[0374] 在RNA指导的切割DNA的特定位点以产生双链断裂后,可以插入感兴趣的DNA片段或DNA构建体。该供体模板、片段或构建体具有期望的插入或修饰,与切割的DNA的平末端同源的DNA片段位于侧翼。因此,细胞的天然DNA修复机制可以用于插入期望的遗传物质,利用同源驱动重组与已知产生高度靶向的双链断裂的任何基因组编辑技术组合,高精度地编辑靶细胞的基因组。以这种方式进行的基因组修饰可以用于插入新基因,称为“增强的同源驱动插入或敲入”,被描述为插入DNA并同时敲除现有基因(Mali et al.Feb 2013)。

[0375] 与先前的位点特异性核酸酶相比,CRISPR/Cas系统具有多种优势。最重要的是,Cas9核酸内切酶代表第一种DNA切割的未系链方法。它可以自由地与多个指导RNA缔合,从而实现在单次转染内同时靶向多个基因座。这允许在单个细胞上有效组合多种基因敲除。在2013年,在单次反应中完成了GGTA1、GGTA1/iGb3S、GGTA1/CMAH和GGTA1/iGb3S/CMAH纯合敲除细胞的产生。CRISPR/Cas9系统已成功用于在各种脊椎动物中生成转基因动物,包括斑

马鱼、猴、小鼠、大鼠和猪,参见Withworth et al.,Biol.Reprod.91(3):78,pp.1-13[2014]和Li et al.;Xenotransplantation 22(1),pp.20-31[2015]。

[0376] 靶向效率,或实现期望突变的百分比,是评估基因组编辑工具的最重要参数之一。Cas9的靶向效率相比之下优于更成熟的方法,例如TALEN或ZFN。例如,在人细胞中,定制设计的ZFN和TALEN仅实现1%至50%范围的效率。相反,已报道Cas9系统在斑马鱼和植物中的效率高达>70%,并且在诱导多能干细胞中的效率范围为2-5%。

[0377] 在一个实施方案中,本发明可以利用CRISPR/Cas9系统通过将特别设计用于将感兴趣的基因靶向“体外”来源的合子的CRISPR微注射来生成转基因猪(例如,有蹄类动物、猪动物)。

[0378] 在另一个实施方案中,本发明可以利用CRISPR/Cas9系统通过用特别设计用于靶向感兴趣的基因的CRISPR修饰体细胞供体细胞、随后进行SCNT来生成转基因猪(例如,有蹄类动物、猪动物)。

[0379] 在另一个实施方案中,本发明可以利用CRISPR/Cas9系统通过靶向现有基因修饰的特定区域/序列来生成转基因猪(例如,有蹄类动物、猪动物)。更具体的实施方案,靶向新霉素基因序列。

[0380] 在另一个实施方案中,本发明可以利用基因组编辑系统(例如TALEN、锌指或CRISPR/Cas9系统)通过靶向现有基因修饰的特定区域/序列来生成转基因猪(例如,有蹄类动物、猪动物)。更具体的实施方案,靶向单个基因座,其可以是天然基因座、修饰的天然基因座或转基因基因座(例如,着陆区)。

[0381] 在另一个实施例中,CRISPR/Cas9系统可以用于利用同源驱动重组,通过插入侧翼具有与双链断裂同源的DNA的臂或区段的大的DNA片段或构建体来靶向现有基因修饰的特定区域/序列来生成转基因猪(例如,有蹄类动物、猪动物)。

[0382] 在一些实施方案中,CRISPR/Cas9介导的基因编辑包含:诱导型启动子或诱导型系统、四环素/多西环素调节系统;包含U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2];TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA];CAGpr[hCD46-2A-hCD55]的多顺反子载体;或SEQ ID NO:9的核苷酸序列。在一些实施方案中,诱导型启动子控制生长激素受体基因的表达。

[0383] D.位点特异性重组酶

[0384] 在示例性实施方案中,利用位点特异性重组酶掺入转基因。特异性重组酶技术广泛用于在细胞DNA的特定位点进行缺失、插入、易位和倒位。它允许DNA修饰靶向特定的细胞类型或由特定的外部刺激引发。它在真核和原核系统中均可实施。有几种重组系统可以有效地用于基因工程策略,Flp-FRT和Cre-loxP重组酶系统是可逆的,因此有利于位点特异性整合和切除。整合酶介导基因组整合过程,其催化高度位点特异性的重组反应,从而导致DNA的精确整合、切除和/或倒位。丝氨酸(ΦC31、Bxb1、R4)和酪氨酸整合酶(λ、P22、HP1)是目前应用于基因组工程的两个主要整合酶家族。广义上,位点特异性重组的过程涉及重组酶与重组酶底物的结合,通过蛋白-蛋白相互作用使它们紧密接近。在该过程中,底物被切割,并且DNA末端在链交换反应中重排,从而DNA主链重新连接产生重组产物。在大多数情况下,丝氨酸整合酶使用简单的att位点催化高效的不可逆重组。

[0385] 为了利用高效率位点特异性重组酶,对接位点或着陆区包含附接位点,用于重组酶底物结合位点,例如,att位点;或重组系统,例如Flp-FRT和Cre-loxP可以被引入到细胞

系和/或动物系的期望的基因座处。对接载体插入靶基因组是随机的或经由同源重组的。这允许连续几轮的质粒整合,其中质粒或载体可以含有不同的转基因和/或另外的DNA序列。反过来,重组系统(例如Flp/FRT)也可以用于去除非期望的载体和标志物序列。

[0386] E.用于产生转基因动物的载体

[0387] 可以设计核酸靶向载体构建体以实现细胞中的同源重组。在一个实施方案中,使用启动子陷阱设计靶向载体,其中在靶向基因座处的整合允许插入的转基因的开放阅读框利用内源或天然启动子来驱动插入的基因(或插入的选择性标志物;例如Neo或Puro)表达。在具体实施方案中,使用"poly(A)捕获"设计靶向载体。与启动子捕获不同,poly(A)捕获载体捕获更广谱的基因,包括在靶细胞(即成纤维细胞或ES细胞)中不表达的那些基因。polyA捕获载体包括组成型启动子,其驱动缺乏polyA信号的选择性标志物基因表达。替换polyA信号的是剪接供体位点,其被设计为剪接为下游外显子。在该策略中,选择性标志物基因的mRNA可以在捕获内源基因的polyA信号后稳定,无论其在靶细胞中的表达状态如何。在一个实施方案中,构建了靶向载体,其包括缺乏聚腺苷酸化信号的选择性标志物。

[0388] 这些靶向载体可以通过任何合适的方法(包括但不限于转染、转化、病毒介导的转导或用病毒载体感染)引入哺乳动物细胞中。在一个实施方案中,靶向载体可以含有与感兴趣的基因组序列同源的3'重组臂和5'重组臂(即侧翼序列)。3'重组臂和5'重组臂可以被设计为使得它们位于基因组序列的至少一个功能区的3'末端和5'末端的侧翼。功能区域的靶向可以使其失活,从而导致细胞无法产生功能蛋白。在另一个实施方案中,同源DNA序列可以包括一个或更多个内含子和/或外显子序列。除了核酸序列之外,表达载体还可以含有选择性标志物序列,例如增强型绿色荧光蛋白(eGFP)基因序列、起始和/或增强子序列、polyA-尾序列和/或提供用于在原核和/或真核宿主细胞中表达构建体的核酸序列。选择性标志物可以位于5'重组臂和3'重组臂序列之间。

[0389] 可以通过将DNA引入细胞来产生细胞的靶向基因座的修饰,其中DNA与靶基因座具有同源性并且包括标志物基因,允许选择包含整合的构建体的细胞。靶载体中的同源DNA将与靶基因座处的染色体DNA重组。标志物基因可以位于同源DNA序列、3'重组臂和5'重组臂两侧的侧翼。本领域已描述用于构建靶向载体的方法,参见,例如,Dai et al.,Nature Biotechnology 20:251-255,2002;WO 00/51424。在此类实例中,选择性标志物基因可以是无启动子的新霉素磷酸转移酶(Neo)基因,其不仅导致Neo的靶向插入和表达(通过捕获和利用内源猪αGal基因启动子),而且因GGTA1催化结构域的所述靶向插入和中断导致靶基因座(例如GGTA1)功能失活。

[0390] 多种酶可以催化外来DNA插入宿主基因组。病毒整合酶、转座酶和位点特异性重组酶介导病毒基因组、转座子或噬菌体整合至宿主基因组中。具有这些特性的酶的广泛集合可以源自多种来源。逆转录病毒结合了一些有用的特征,包括其基因组相对简单、易于使用以及整合至宿主细胞基因组中的能力,允许在转导的细胞或其后代中长期表达转基因。因此,它们已被用于大量基因疗法方案中。基于慢病毒载体的载体一直是基因疗法和转基因应用的有吸引力的候选者,腺相关病毒也是如此,其是小DNA病毒(细小病毒),与辅助病毒(例如腺病毒、单纯疱疹病毒或人巨细胞病毒)一起在哺乳动物细胞中共复制。病毒基因组基本上仅由两个ORF(rep,非结构蛋白,和cap,结构蛋白)组成,通过选择性剪接和选择性启动子使用,衍生出(至少)七种不同的多肽。在辅助病毒存在的情况下,rep蛋白介导AAV基因

组的复制。在不存在辅助病毒的情况下,发生整合以及由此导致的潜在的病毒感染。

[0391] 转座子也很有意思。这些是可移动DNA区段,其可见于在多种生物体中。尽管在许多原核系统和昆虫中发现了活性转座子,但脊椎动物中不存在功能性的天然转座子。果蝇P元件转座子作为基因组工程工具已使用多年。睡美人转座子是从鲑科鱼类中发现的非功能性转座子副本建立的,并且在哺乳动物细胞中比原核或昆虫转座子中具有显著更高的活性。

[0392] 位点特异性重组酶是催化仅具有有限程度的序列同源性的DNA区段之间的DNA链交换的酶。它们与长度在30个至200个核苷酸之间的识别序列结合,切割DNA主链,交换所涉及的两个DNA双螺旋并重新连接DNA。在一些位点特异性重组系统中,单个多肽足以执行所有这些反应,而其他重组酶需要不同数量的辅助蛋白来完成这些任务。位点特异性重组酶可以分类为两个具有不同生化特性的蛋白家族,即酪氨酸重组酶(其中DNA共价连接至酪氨酸残基)和丝氨酸重组酶(其中共价连接发生在丝氨酸残基处)。用于基因组修饰方法的最常用酶是Cre(源自大肠杆菌噬菌体P1的酪氨酸重组酶)和phiC31整合酶(源自链霉菌噬菌体phiC31的丝氨酸重组酶)。其他几种噬菌体来源的位点特异性重组酶(包括Flp、λ整合酶、噬菌体HK022重组酶、噬菌体R4整合酶和噬菌体TP901-1整合酶以及bxb1整合酶)已成功用于介导将基因稳定插入哺乳动物基因组中。最近,已从链霉菌噬菌体中纯化出位点特异性重组酶。phiC31重组酶是解离酶家族的成员并且介导噬菌体整合。在该过程中,噬菌体attP位点与细菌基因组中相应的attB位点重组。交换生成两个位点attL和attR,在不存在辅助蛋白的情况下,它们不再是重组酶作用的靶标。该反应也发生在哺乳动物细胞中,因此可以用于介导治疗基因的位点特异性整合。酪氨酸重组酶的位点特异性很难通过直接蛋白工程来修饰,因为催化结构域和DNA识别结构域紧密交织。因此,特异性的变化常常伴随着活性的丧失。丝氨酸重组酶可能更适合工程化,并且通过将天然DBD替换为人锌指转录因子Zif268的锌指结构域,对Tn3解离酶的高活性衍生物进行了修饰。所得嵌合蛋白(称为Z-解离酶)的DNA位点特异性已转换为Zif268的DNA位点特异性。锌指蛋白可以通过体外蛋白进化进行修饰,以识别任何DNA序列,因此,这种方法可以开发嵌合重组酶,其能将治疗基因整合至精确的基因组位置。增强或介导重组的方法包括位点特异性重组和同源重组的组合、AAV载体介导的重组和锌指核酸酶介导的重组(参考:Geurtset.al.,Science,325:433,2009)。

[0393] 如本文所用,术语“载体”是指为插入的核酸提供有用的生物学或生化特性的核酸分子(优选DNA)。根据本发明的“表达载体”包括在将载体转化到细胞中时能够增强已插入或克隆到载体中的一种或更多种分子的表达的载体。此类表达载体的实例包括噬菌体、自主复制序列(ARS)、着丝粒,和能够在体外或细胞中复制或被复制或者能够将期望的核酸区段传送至动物细胞内的期望位置的其他序列。可用于本发明的表达载体包括染色体来源、游离体来源和病毒来源的载体,例如源自细菌质粒或噬菌体的载体,以及源自其组合的载体,例如粘粒和噬菌粒或基于病毒的载体(例如腺病毒、AAV、慢病毒)。载体可以具有一个或更多个限制性核酸内切酶识别位点,在这些位点处可以以可确定的方式切割序列而不损失载体的必要生物学功能,并且可以将核酸片段剪接到其中以实现其复制和克隆。

[0394] 载体可以进一步提供引物位点,例如用于PCR、转录和/或翻译起始和/或调节位点、重组信号、复制子、选择性标志物等。显然,也可以应用不需要使用同源重组、转座或限

制性酶(例如但不限于PCR片段的UDG克隆(美国专利号5,334,575)、TA克隆。RT-PCR、克隆(Invitrogen Corp.,Carlsbad,CA))的插入期望需核酸片段的方法来将核酸克隆到根据本发明使用的载体中。

[0395] 可以通过将DNA引入细胞来产生在靶基因座处纯合的细胞,其中DNA与靶基因座具有同源性并且包括标志物基因,允许选择包含整合的构建体的细胞。靶载体中的同源DNA将与靶基因座处的染色体DNA重组。标志物基因可以位于同源DNA序列、3'重组臂和5'重组臂两侧的侧翼。本领域已描述用于构建靶向载体的方法,参见,例如,Dai et al.(2002) Nature Biotechnology 20:251-255;WO 00/51424,FIG.6;和Gene Targeting:A Practical Approach.Joyner,A.Oxford University Press,USA;2.sup.nd ed.Feb.15, 2000。

[0396] 可以制备各种构建体用于靶基因座处的同源重组。通常,构建体可以包括至少25bp、50bp、100bp、500bp、1kbp、2kbp、4kbp、5kbp、10kbp、15kbp、20kbp或50kbp的与靶基因座同源的序列。

[0397] 确定靶DNA序列的同源性程度可以涉及多种考虑因素,例如靶基因座的大小、序列的可用性、靶基因座处双交换事件的相对效率以及靶序列与其他序列的相似性。靶向DNA可以包括这样的序列,其中基本上同基因的DNA位于基因组中待修饰的相应靶序列的期望序列修饰的侧翼。基本上同基因的序列可以与相应的靶序列具有至少约95%、97-98%、99.0-99.5%、99.6-99.9%或100%同一性(除了期望的序列修饰之外)。靶向DNA和靶DNA优选地可以共享至少约75个、150个或500个100%相同的碱基对的DNA段。因此,靶向DNA可以源自与被靶向细胞系密切相关的细胞;或者靶向DNA可以源自与被靶向细胞相同的细胞系或动物的细胞。

[0398] 合适的选择性标志物基因包括但不限于:赋予在某些培养基底物上生长的能力的基因,例如tk基因(胸苷激酶)或hprt基因(次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶),其赋予在HAT培养基(次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷)上生长的能力;细菌gpt基因(鸟嘌呤/黄嘌呤磷酸核糖基转移酶),其允许在MAX培养基(霉酚酸、腺嘌呤和黄嘌呤)上生长。参见Song et al.(1987) Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.84:6820-6824。另见Sambrook et al.(1989)Molecular Cloning--ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor, N.Y.,见chapter 16。选择性标志物的其他实例包括:赋予化合物(例如抗生素)抗性的基因、赋予在选择的底物上生长能力的基因、编码产生可检测信号(例如发光)的蛋白(例如绿色荧光蛋白、增强型绿色荧光蛋白(eGFP))的基因。多种此类标志物是已知的和可获得的,包括例如抗生素抗性基因,例如新霉素抗性基因(neo)(Southern,P.,and P.Berg,(1982) J.Mol.Appl.Genet.1:327-341);和潮霉素抗性基因(hyg)(Nucleic Acids Research 11: 6895-6911(1983)和Te Riele et al.(1990)Nature348:649-651)。

[0399] 可用于本发明方法的另外的报告基因包括乙酰羟酸合酶(AHAS)、碱性磷酸酶(AP)、β半乳糖苷酶(LacZ)、β葡萄糖醛酸酶(GUS)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白(RFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、青色荧光蛋白(CFP)、辣根过氧化物酶(HRP)、荧光素酶(Luc)、胭脂碱合酶(NOS)、章鱼碱合酶(OCS)及其衍生物。可获得赋予对氨苄西林、博来霉素、氯霉素、庆大霉素、潮霉素、卡那霉素、林可霉素、杀稻瘟菌素(blasticidin)、zeocin、甲氨蝶呤、草胺膦(phosphinothricin)、嘌呤霉素(puromycin)和

四环素抗性的多种选择性标志物。

[0400] 测定报告基因的抑制的方法是本领域熟知的,并且包括但不限于荧光测定方法(例如荧光光谱、荧光激活细胞分选(FACS)、荧光显微镜术)、抗生素抗性测定。

[0401] 还可以使用选择性标志物的组合。为了使用标志物的组合,可以克隆HSV-tk基因,使其位于靶向DNA外部(如有需要,可以将另一个选择性标志物置于相反的侧翼)。将DNA构建体引入靶向的细胞后,可以基于合适的抗生素选择细胞。选择性标志物也可以用于负选择。负选择标志物通常杀死表达它们的细胞,因为表达本身有毒,或者产生导致有毒代谢物的催化剂,例如单纯疱疹病毒I型胸苷激酶(HSV-tk)或白喉毒素A。通常,负选择标志物被掺入靶向载体中,使得其在精确重组事件后丧失。类似地,常规选择性标志物(例如GFP)可以用于负选择,例如,使用FACS分选所选转基因的插入,如果在细胞表面上以显著水平表达,则可以用作功能获得或丧失的“选择性标志物”。使用插入的或靶向的转基因作为选择工具可以进行正选择,而无需使用添加的荧光标志物(例如GFP、RFP)或抗生素选择基因。在某些情况下,转基因的靶向插入可以使靶基因座失活,这样可以对功能丧失进行监测或选择,例如,GGTA1基因座的失活将消除或减少靶细胞与凝集素(IB4)的结合,或者B4GalNT2的失活将消除或减少DBA凝集素对靶细胞的结合,并且在每种情况下靶向整合均可以在缺乏这种凝集素结合的细胞中进行分选或富集。

[0402] 缺失可以是至少约50bp,更通常至少约100bp,并且通常不超过约20kbp,其中缺失通常可以包括编码区的至少一部分,其包括一个或更多个外显子的一部分、一个或更多个内含子的一部分,并且可以包括或可以不包括侧翼非编码区的一部分,特别是5-非编码区(转录调节区)。因此,同源区可以延伸超出编码区进入5’-非编码区或进入3’-非编码区。插入一般不能超过10kbp,通常不超过5kbp,一般至少50bp,更通常至少200bp。

[0403] 同源区可以包括突变,其中突变可以进一步使靶基因失活,提供读框移动或改变关键氨基酸,或者突变可以纠正功能失调的等位基因等。通常,突变可以是细微变化,不超过同源侧翼序列的约5%,或者甚至是单个核苷酸变化,例如外显子活性位点中的点突变。在期望产生基因突变时,可以将标志物基因插入内含子中,以在转录时从靶基因上切除。

[0404] 确定靶DNA序列的同源性程度可以涉及多种考虑因素,例如靶基因座的大小、序列的可用性、靶基因座处双交换事件的相对效率以及靶序列与其他序列的相似性。靶向DNA可以包括这样的序列,其中基本上同基因的DNA位于基因组中待修饰的相应靶序列的期望序列修饰的侧翼。基本上同基因的序列可以与相应的靶序列具有至少约95%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%、或95%至100%、97-98%、99.0-99.5%、99.6-99.9%或100%同一性(除了期望的序列修饰之外)。在特定实施方案中,靶向DNA和靶DNA可以共享至少约75个、150个或500个100%相同的碱基对的DNA段。因此,靶向DNA可以源自与被靶向细胞系密切相关的细胞;或者靶向DNA可以源自与被靶向细胞相同的细胞系或动物的细胞。

[0405] 可以根据本领域已知的方法制备构建体,可以将各种片段放在一起,引入到适当的载体中,克隆,分析,然后进一步操作,直至获得期望的构建体。可以对序列进行各种修饰,以实现限制性分析、切除、探针识别等。可以根据需要引入沉默突变。在各个阶段,可以采用限制性分析、测序、聚合酶链反应扩增、引物修复、体外诱变等。

[0406] 可以使用细菌载体制备构建体,包括原核复制系统,例如大肠杆菌可识别的起点,在每个阶段可以克隆和分析构建体。可以采用与用于插入的标志物相同或不同的标志物,

其可以在引入靶细胞之前去除。一旦含有构建体的载体完成,就可以对其进行进一步操作,例如通过在同源序列中缺失细菌序列、线性化、引入短缺失。最终操作后,可以将构建体引入细胞中。

[0407] 可以用于使DNA或RNA构建体进入宿主细胞的技术包括磷酸钙/DNA共沉淀、将DNA显微注射至细胞核中、电穿孔、细菌原生质体与完整细胞融合、转染、脂转染、感染、粒子轰击或本领域技术人员已知的任何其他技术。DNA或RNA可以是单链或双链、线性或环状、松弛或超螺旋DNA。对于用于转染哺乳动物细胞的各种技术,参见,例如,Keown et al.,Methods in Enzymology Vol.185,pp.527-537(1990)。

[0408] 以下载体作为示例提供。细菌:pBs、pQE-9(Qiagen)、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBsKS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a(Stratagene);pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia)。真核:pWLneo、pSv2cat、pOG44、pXT1、pSG(Stratagene)pSVK3、pBPv、pMSG、pSVL(Pharmiacia)。此外,可以使用任何其他质粒和载体,只要它们在宿主中可复制且可存活。本领域已知的载体和市售的载体(及其变体或衍生物)可以根据本发明进行工程化以包括一个或更多个重组位点用于本发明的方法。此类载体可以获得自,例如,Vector Laboratories Inc.、Invitrogen、Promega、Novagen、NEB、Clontech、Boehringer Mannheim、Pharmacia、EpiCenter、OriGenes Technologies Inc.、Stratagene、PerkinElmer、Pharmingen和Research Genetics。其他感兴趣的载体包括真核表达载体,例如pFastBac、pFastBacHT、pFastBacDUAL、pSFV和pTet-Splice(Invitrogen),pEUK-C1、pPUR、pMAM、pMAMneo、pBI101、pBI121、pDR2、pCMVEBNA和pYACneo(Clontech),pSVK3、pSVL、pMSG、pCH110和pKK232-8(Pharmacia、Inc.),p3'SS、pXT1、pSG5、pPbac、pMbac、pMC1neo,和pOG44(Stratagene、Inc.),以及pYES2、pAC360、pBlueBacHis A、B和C、pVL1392、pBlueBaclll、pCDM8、pcDNA1、pZeoSV、pcDNA3 pREP4、pCEP4和pEBVHis(Invitrogen、Corp.)及其变体或衍生物。

[0409] 其他载体包括pUC18、pUC19、pBlueScript、pSPORT、粘粒、噬菌粒、YAC(酵母人工染色体)、BAC(细菌人工染色体)、P1(大肠杆菌噬菌体)、pQE70、pQE60、pQE9(quagan)、pBS载体、PhageScript载体、BlueScript载体、pNH8A、pNH16A、pNH18A、pNH46A(Stratagene)、pcDNA3(Invitrogen)、pGEX、pTrsfus、pTrc99A、pET-5、pET-9、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia)、pSPORT1、pSPORT2、pCMVSPORT2.0和pSY--SPORT1(Invitrogen)及其变体或衍生物。还可以使用病毒载体,例如慢病毒载体(参见,例如,WO 03/059923;Tiscornia et al.PNAS100:1844-1848(2003))。

[0410] 另外的感兴趣的载体包括来自Invitrogen的pTrxFus、pThioHis、pLEX、pTrcHis、pTrcHis2、pRSET、pBlueBacHis2、pcDNA3.1/His、pcDNA3.1(-)/Myc-His、pSecTag、pEBVHis、pPIC9K、pPIC3.5K、pA081S、pPICZ、pPICZA、pPICZB、pPICZC、pGAPZA、pGAPZB、pGAPZC、pBlueBac4.5、pBlueBacHis2、pMelBac、pSinRep5、pSinHis、pIND、pIND(SP1)、pVgRXR、pcDNA2.1、pYES2、pZEr01.1、pZEr0-2.1、pCR-Blunt、pSE280、pSE380、pSE420、pVL1392、pVL1393、pCDM8、pcDNA1.1、pcDNA1.1/Amp、pcDNA3.1、pcDNA3.1/Zeo、pSe、SV2、pRc/CMV2、pRc/RSV、pREP4、pREP7、pREP8、pREP9、pREP 10、pCEP4、pEBVHis、pCR3.1、pCR2.1、pCR3.1-Uni和pCRBac;来自Pharmacia的lamda.ExCell、.λ.gt11、pTrc99A、pKK223-3、pGEX-1.λ.T、pGEX-2T、pGEX-2TK、pGEX-4T-1、pGEX-4T-2、pGEX-4T-3、pGEX-3X、pGEX-5X-1、pGEX-5X-2、

pGEX-5X-3、pEZZ18、pRIT2T、pMC1871、pSVK3、pSVL、pMSG、pCH110、pKK232-8、pSL1180、pNEO和pUC4K;来自Novagen的pSCREEN-1b(+)、pT7Blue(R)、pT7Blue-2、pCITE-4-abc(+)、pOCUS-2、pTAg、pET-32L1C、pET-30LIC、pBAC-2cp LIC、pBACgus-2cp LIC、pT7Blue-2 LIC、pT7Blue-2、.λ.SCREEN-1、.λ.BlueSTAR、pET-3abcd、pET-7abc、pET9abcd、pET11abcd、pET12abc、pET-14b、pET-15b、pET-16b、pET-17b-pET-17xb、pET-19b、pET-20b(+)、pET-21abcd(+)、pET-22b(+)、pET-23abcd(+)、pET-24abcd(+)、pET-25b(+)、pET-26b(+)、pET-27b(+)、pET-28abc(+)、pET-29abc(+)、pET-30abc(+)、pET-31b(+)、pET-32abc(+)、pET-33b(+)、pBAC-1、pBACgus-1、pBAC4x-1、pBACgus4x-1、pBAC-3cp、pBACgus-2cp、pBACsurf-1、plg、Signal plg、pYX、Selecta Vecta-Neo、Selecta Vecta-Hyg和Selecta Vecta-Gpt;来自Clontech的pLexA、pB42AD、pGBT9、pAS2-1、pGAD424、pACT2、pGAD GL、pGAD GH、pGAD10、pGilda、pEZM3、pEGFP、pEGFP-1、pEGFP--N、pEGFP-C、pEBFP、pGFPuv、pGFP、p6xHis-GFP、pSEAP2-基础、pSEAP2-对照(Contral)、pSEAP2-启动子、pSEAP2-增强子、p.β.gal-基础、p.β.gal-对照、p.β.gal-启动子、p.β.gal-增强子、pCMV、pTet-Off、pTet-On、pTK-Hyg、pRetro-Off、pRetro-On、pIRES1neo、pIRES1hyg、pLXSN、pLNCX、pLAPSN、pMAMneo、pMAMneo-CAT、pMAMneo-LUC、pPUR、pSV2neo、pYEX4T-1/2/3、pYEX-S1、pBacPAK-His、pBacPAK8/9、pAcUW31、BacPAK6、pTrip1Ex、2.λ.gt10、.λ.gt11、pWE15和.λ.Trip1Ex;来自Stratagene的ΛZAP II、pBK-CMV、pBK-RSV、pBluescript II KS+/-、pBluescript II SK+/-、pAD-GAL4、pBD-GAL4 Cam、pSurfscript、ΛFIX II、ΛDASH、ΛEMBL3、ΛEMBL4、SuperCos、pCR-Scrigt Amp、pCR-Script Cam、pCR-Script Direct、pBS+/-、pBC KS+/-、pBC SK+/-、Phagescript、pCAL-n-EK、pCAL-n、pCAL-c、pCAL-kc、pET-3abcd、pET-11abcd、pSPUTK、pESP-1、pCMVLacI、pOPRSVI/MCS、pOPI3 CAT、pXT1、pSG5、pPbac、pMbac、pMC1neo、pMC1neo PolyA、pOG44、pOG45、pFRT.β.GAL、pNEO.β.GAL、pRS403、pRS404、pRS405、pRS406、pRS413、pRS414、pRS415和pRS416。

[0411] 另外的载体包括,例如,pPC86、pDBLeu、pDBTrp、pPC97、p2.5、pGAD1-3、pGAD10、pACt、pACT2、pGADGL、pGADGH、pAS2-1、pGAD424、pGBT8、pGBT9、pGAD-GAL4、pLexA、pBD-GAL4、pHISi、pHISi-1、placZi、pB42AD、pDG202、pJK202、pJG4-5、pNLexA、pYESTrp及其变体或衍生物。

[0412] 在示例性实施方案中,载体是双顺反子载体。双顺反子载体包含启动子和两种转基因。在具体实施方案中,双顺反子载体包含启动子和通过2A序列连接的两种转基因。该实施方案实现来自单个转录物的多种功能性转基因的共表达。更具体地,该实施方案利用短(18-24aa)切割肽“2A”(其允许所连接的开放阅读框的共表达)以由单个转录物2A载体系统表达功能性转基因。

[0413] 在示例性实施方案中,载体是多顺反子载体(MCV)。在一个实施方案中,MCV包含启动子和至少六种转基因。在具体实施方案中,MCV包含由2A肽序列连接的六种转基因,其在至少三个启动子的控制下。该实施方案允许来自单个转录物的多种功能性转基因的共表达。更具体地,该实施方案利用短(18-24aa)切割肽“2A”(其允许所连接的开放阅读框的共表达)以由单个转录物2A载体系统表达功能性转基因。

[0414] 在示例性实施方案中,载体是包含至少两个双顺反子单元的2A-肽MCV载体,其中每个双顺反子单元含有2种转基因。在具体实施方案中,一个双顺反子单元由组成型或普遍

存在的启动子(例如CAG)控制,并且第二双顺反子单元由内皮或其他组织特异性或诱导型启动子系统控制。在某个实施方案中,在单个基因座处仅插入至少六种转基因,但其中每种转基因由其自身的启动子控制,或者每个单个基因座插入由总共至少三个启动子控制。在示例性实施方案中,载体是6-基因MCV,其包含至少两种抗凝剂并且更具体地至少三种抗凝剂。在示例性实施方案中,载体是6-基因MCV载体,其包含至少两种抗凝剂和补体抑制剂,并且更具体地,包含三种抗凝剂和补体抑制剂。在示例性实施方案中,载体是6-基因MCV载体,其包含两种抗凝剂、补体抑制剂和免疫抑制剂。

[0415] F.调节序列

[0416] 用于产生本发明的动物的载体构建体可以包括调节序列,包括但不限于可操作地连接至该序列的启动子-增强子序列、“2A”肽技术和对接载体。在一些实施方案中,切割肽选自由T2A、P2A、F2A和E2A组成的组。大量合适的载体和启动子是本领域技术人员已知的,并且是可商购获得的。

[0417] 在具体实施方案中,本发明提供了物、组织和细胞,其在内皮细胞中表达至少一种转基因(与在第二相同或不同启动子控制下的至少一种转基因组合),更具体地在内皮细胞中表达至少两种、至少三种或至少六种转基因。为了靶向表达至特定组织,使用包括内皮细胞表达特异性启动子的载体培育动物。在具体实施方案中,表达受主要在内皮中有活性的启动子控制。

[0418] 1.启动子

[0419] 在一个实施方案中,核酸构建体含有与待表达的转基因序列可操作连接的调节序列。在一个实施方案中,调节序列可以是启动子序列。在一个实施方案中,启动子可以是可调节启动子。在此类系统中,例如,可以使用药物来调节肽是否在动物、组织或器官中表达。例如,当器官或组织是猪的一部分时,可以阻止表达,但一旦将猪移植至人体内一段时间,则诱导表达以克服细胞免疫应答。此外,表达水平可以通过可调节的启动子系统来控制,以确保不发生受体免疫系统的免疫抑制。此外,基因敲除可以通过诱导型启动子系统(例如CRISPR-CAS9介导的基因编辑中的四环素诱导型CAS9)选择性实现(参见Zhang et al.,Comput Struct Biotechnol J.,2019,(17):1171-1177)。可调节启动子系统可以选自但不限于以下基因系统:金属硫蛋白启动子,可由金属(例如铜)诱导(参见Lichtlen and Schaffner,Swiss Med.Wkly.,2001,131(45-46):647-52);四环素调节系统(参见Imhofet al.,J Gene Med.,2000,2(2):107-16);蜕皮激素调节系统(参见Saez et al.,Proc Natl Acad Sci USA.,2000,97(26):14512-7);细胞色素P450诱导型启动子,例如CYP1A1启动子(参见Fujii-Kuriyama et al.,FASEB J.,1992,6(2):706-10);米非司酮诱导型系统(参见Sirin andPark,Gene.,2003,323:67-77);香豆素激活系统(参见Zhao et al.,Hum Gene Ther.,2003,14(17):1619-29);大环内酯诱导型系统(对大环内酯抗生素(例如雷帕霉素(rapamycin)、红霉素、克拉霉素和roxitiromycin)有反应)(参见Weber et al.,Nat Biotechnol.,2002,20(9):901-7;Wang et al.,Mol Ther.,2003,7(6):790-800);乙醇诱导型系统(参见Garoosi et al.,J Exp Bot.,2005,56(416):163542;Roberts et al.,Plant Physiol.,2005,138(3):1259-67);链阳菌素(streptogramin)诱导型系统(参见Fussenegger et al.,Nat Biotechnol.,200018(11):1203-8)亲电子诱导型系统(参见Zhu and Fahl,Biochem Biophys Res Commun.,2001,289(1):212-9);尼古丁诱导型系统(参见

Malphettes et al.,Nucleic Acids Res.,2005,33(12):e107)、免疫诱导型启动子、细胞因子应答启动子(例如由IFN-γ、TNF-α、IL-1、IL-6或TGF-β(或其他次级途径)诱导的启动子),因此可以与免疫或炎症反应相关或响应于免疫或炎症反应而被开启或上调。

[0420] 在具体实施方案中,动物包括内皮特异性启动子,例如猪ICAM-2或鼠Tie-2启动子,并且进一步包括增强子元件(例如,鼠Tie-2增强子或CMV增强子)。在其他实施方案中,启动子可以是进一步包括增强子元件的遍在型启动子元件。在具体元件中,遍在型启动子是CAG(CMV增强子、鸡β-肌动蛋白启动子、兔β-球蛋白内含子),其与内皮特异性Tie-2增强子元件组合使用(Tie2-CAG)。对于Tie2-CAG,预期转基因将以组成型和遍在型的方式表达,但在内皮细胞中的表达水平比其他体细胞更高。在一些实施方案中,启动子与增强子元件组合使用,增强子元件是与该启动子内在相关或共定位的DNA非编码或内含子区域。在另一个特定实施方案中,增强子元件是与ICAM-2启动子组合使用的ICAM-2。其他遍在型启动子包括但不限于以下:病毒启动子(如CMV和SV40),还有鸡β肌动蛋白和γ-肌动蛋白启动子、GAPDH启动子、H2K、CD46启动子、GGTA1、泛素和ROSA启动子。

[0421] 2.多顺反子系统

[0422] 在具体实施方案中,双顺反子载体包括两种转基因和主要在内皮细胞中有活性的启动子或在所有器官、组织和细胞中遍在表达转基因的组成型启动子。在其他实施方案中,多顺反子载体(MCV)中的至少六种转基因在至少三个启动子的控制下。启动子可以是外源的、天然的,或外源的和天然的组合。在一些实施方案中,至少六种转基因由多顺反子载体编码,任选地其中多顺反子载体包含至少三个双顺反子单元。在一些实施方案中,每个双顺反子单元包含驱动经由切割肽连接至第二转基因的第一转基因的启动子。在一些实施方案中,第一双顺反子单元包含至少两种抗凝转基因,第二双顺反子包含至少两种补体抑制剂转基因;并且第三双顺反子单元包含至少一种细胞保护转基因和至少一种免疫抑制转基因。在一些实施方案中,切割肽选自由T2A、P2A、F2A和E2A组成的组。

[0423] 在具体实施方案中,双顺反子载体包括两种转基因和在所有器官、组织和细胞中遍在表达转基因的组成型启动子。在具体实施方案中,双顺反子载体包括两种转基因和控制器官、组织和细胞中表达的组织特异性启动子。在示例性实施方案中,载体是六基因MCV,其包含在内皮特异性启动子控制下的至少两种抗凝剂。在示例性实施方案中,载体是六基因MCV,其包含在组成型启动子控制下的至少一种补体抑制剂转基因和在内皮细胞特异性启动子控制下的至少一种抗凝转基因。在示例性实施方案中,载体是六基因MCV,其包含在组成型启动子控制下的至少一种补体抑制剂转基因和在第二组成型启动子控制下的至少一种抗凝基因。

[0424] 在示例性实施方案中,载体是六基因MCV载体,其包含在内皮细胞启动子控制下的抗凝转基因和免疫抑制转基因。在示例性实施方案中,载体是双基因MCV载体,其包含在至少两个单独的启动子控制下的总共两种基因;或者在选定的实施方案中,载体具有串联的多种转基因,各自具有其自身的启动子,并且全部整合至单个基因座中。

[0425] 在一些实施方案中,多顺反子(MCV)载体包含选自由以下组成的组的双顺反子单元:驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪TBM启动子(pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD47转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD47-2A-hHO1]);驱动经由2A肽连接至人DAF转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-

2A-hDAF]);Poly-A信号融合至猪TBM启动子,其驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因(PolyA/pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]);驱动经由2A肽连接至人HO-1转基因的人CD59转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD59-2A-hHO1]);驱动经由2A肽连接至人EPCR转基因的人TBM转基因的猪EPCR启动子(pEPCRpr[hTBM-2A-hEPCR]);驱动经由2A肽连接至人CD47转基因的人CD46转基因的CAG启动子(CAGpr[hCD46-2A-hCD47]);驱动第一GHR gRNA的第一U6启动子,连接至驱动第二GHR gRNA的第二U6启动子(U6p[GHRgRNA-1];U6p[GHRgRNA-2]),其中第一gRNA和第二gRNA相同或不同;驱动Cas核酸内切酶的TRE3G启动子,经由绝缘子连接至驱动tTA的CAG启动子(TRE3Gp[CAS9];CAGpr[tTA]);和其组合。

[0426] 在一些实施方案中,多顺反子(MCV)载体包含:pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD47-2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];PolyA-pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD47-2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-2A-hDAF];pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-P2A-hHO1];和CAGpr[hCD46-P2A-hDAF];or PolyA-pTBMpr[hTBM];CAG pr[hCD47-P2A-hHO1];pEPCRpr[hEPCR];和CAGpr[hCD46P-2A-hDAF];pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]、CAGpr[hCD59-P2A-hHO1]和CAGpr[hCD46-2A-hCD47];pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]、CAGpr[hCD59-2A-hHO1]和CAGpr[hCD46-2A-hCD55];U6p[GHRgRNA-1]、U6p[GHRgRNA-2]、TRE3Gp[CAS9]、CAGpr[tTA]和CAGpr[hCD46-2A-hCD55]。在一些实施方案中,MCV包含选自SEQ ID NO:7;SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO;14的核苷酸序列。

[0427] 3.增强子

[0428] 在其他实施方案中,在核酸构建体中使用增强子元件以促进以组织特异性方式增加转基因的表达。增强子是显著改变基因转录效率的外部元件(Molecular Biology ofthe Gene,Fourth Edition,pp.708-710,Benjamin Cummings Publishing Company,Menlo Park,Calif.COPYRGT.1987)。在具体实施方案中,pdx-1增强子(也称为IPF-1、STF-1和IDX1(Gerrish K et al.,Mol.Endocrinol.,2004,18(3):533;Ohlsson et al.,EMBO J.1993Nov.,12(11):4251-9;Leonard et al.,Mol.Endocrinol.,1993,7(10):1275-83;Miller et al.,EMBO J.,1994,13(5):1145-56;Serup et al.,Proc Natl Acad Sci USA.,1996,93(17):9015-20;Melloul et al.,Diabetes,2002,51Suppl 3:S320-5;Glick et al.,J Biol Chem.,2000,275(3):2199-204;GenBankAF334615.))与ins2启动子组合使用,用于转基因的胰腺特异性表达。在某些实施方案中,动物在启动子与增强子元件组合的控制下表达转基因。

[0429] G.基因修饰的细胞的选择

[0430] 本发明提供了制备包含至少六种转基因的转基因猪的方法,其包括以下步骤:(i)用单个多顺反子载体转染猪细胞,该单个多顺反子载体包含(a)至少两种补体抑制剂转基因;(b)至少一种免疫抑制转基因;(c)至少一种细胞保护转基因;和(d)至少两种抗凝转基因;(ii)通过在单个基因组基因座处掺入和表达多顺反子载体来产生包含至少六种转基因的多转基因(即转基因)猪细胞;(iii)通过将该多转基因猪细胞的细胞核注射至重建的体细胞核移植(SCNT)来生成多转基因猪合子;和(iv)允许该多转基因猪合子成熟为多转基因猪。在一些实施方案中,猪细胞和多转基因猪缺乏α1,3半乳糖基转移酶的表达。

[0431] 在一些实施方案中,多转基因细胞具有基因修饰,其是靶向的转基因插入或整合(即经由同源重组)至细胞基因组中的结果。在一些实施方案中,多转基因细胞具有基因修

饰,其是非靶向(随机)整合至细胞基因组中的结果。在一些实施方案中,多转基因细胞可以在适当选择的培养基中生长以识别在适当的整合位点处包含至少六种转基因的多转基因细胞。然后,可以通过限制性分析、电泳、Southern分析、聚合酶链反应或本领域已知的其他技术进一步分析那些显示期望表型的多转基因细胞。通过识别在靶基因位点处显示出适当插入的片段,(或者,在非靶向应用中,其中随机整合技术已产生期望的结果),可以识别其中已发生同源重组(或期望的非靶向整合事件)以使靶基因失活或以其他方式修饰靶基因的细胞。

[0432] 选择性标志物基因或其他正选择剂或免疫荧光的存在实现了将靶构建体整合至宿主基因组。然后,可以通过限制性消化分析、电泳、Southern分析、聚合酶链反应等进一步分析那些显示期望表型的多转基因细胞,以分析DNA从而确定是否发生同源重组或非同源重组。这可以通过以下方式确定:采用针对插入物的探针,然后对插入物侧翼的5'区和3'区域进行测序以确定是否存在延伸超出构建体侧翼区域的基因,或者在引入此类缺失时识别缺失的存在。还可以使用与构建体内的序列互补以及与构建体外部和靶基因座处的序列互补的引物。如此,如果发生同源重组,则只能获得两个引物均存在于互补链中的DNA双链体。例如,通过证明引物序列或预期大小的序列的存在,支持同源重组的发生。

[0433] 用于筛选同源重组事件的聚合酶链反应是本领域技术人员已知的,例如,如Kim and Smithies,(1988)Nucleic Acids Res.16:8887-8903;和Joyner et al.(1989)Nature338:153-156中所述。从第一轮靶向(或非靶向(随机)整合至基因组中)获得的细胞系可能是整合等位基因的杂合子。纯合性(两个等位基因均被修饰)可以通过多种方式实现。一种方法是培养许多细胞,其中一个拷贝已经修饰,然后使用不同的选择性标志物使这些细胞经历另一轮靶向(或非靶向(随机)整合)。替代地,可以通过对修饰的等位基因杂合的动物进行育种来获得纯合子。

[0434] 在一些情况下,可能需要具有两个不同的修饰的等位基因。这可以通过连续几轮的基因靶向(或随机整合)或通过对杂合子进行育种来实现,其中每个杂合子均携带一个期望的修饰的等位基因。具有有效靶向的双链断裂的基因组编辑事件允许频繁的双等位基因靶向事件,使得在单次转染(或胚胎或合子靶向策略)中,可以高频率实现纯合性敲除或敲入事件。这种基因编辑增强的(例如Crispr-CAS9核酸酶)基因靶向或同源依赖性修复事件可以包括单等位基因或杂合基因以及双等位基因或纯合基因敲除(通过小核苷酸插入、缺失、取代,另称为插入缺失),还有基因插入,包括单个转基因的单等位基因和双等位基因插入/敲入、多转基因串(在其自身的启动子或双顺反子或多顺反子下的转基因串)或多顺反子载体(包括在至少2个启动子控制下的6-转基因多顺反子载体,其中所述启动子可以是组成型的或组织特异性的(例如,CAG、Tie-2和Icam-2))。替代地,通过使用多种基因编辑核酸酶(例如Crispr/Cas9),人们可以期望有效地产生具有基本基因型组合(即GGTA1敲除或GGTA1/CD46)的细胞(经由转染或感染)或合子(同时经由显微注射),其中一个基因修饰可以包括敲入(例如,在GGTA1处)或随机插入6-基因MCV(在至少三个启动子的控制下),并且同时在另一个基因座处进行核酸酶介导的插入缺失(单等位基因或双等位基因,例如,GGTA1、GHR、CMAH、B4GalNT2),或者在优选的实施方案中,在两个不同基因座(着陆区、安全港或GGTA1、B4GalNT2、GHR、CMAH、ROSA26、AAVS1或其他预定基因座,包括天然基因座或修饰的天然基因座)处靶向插入多转基因载体(双顺反子或6-基因MCV),例如在GGTA1处靶向插

入6-基因MCV,以及在第二基因座(例如,CMAH或B4GalNT2)处靶向同源重组(或基因编辑增强)插入双顺反子或6-基因MCV。在某些实施方案中,使用选择技术,通过暴露于极高水平的选择剂以从杂合细胞获得同源敲除细胞。这种选择可以例如通过使用抗生素(例如遗传霉素(G418))实现。

[0435] 然后,可以经由基因型或表型分析来选择或识别已转染或以其他方式接受适当载体的细胞。在一个实施方案中,细胞被转染,在适当选择的培养基中生长以识别含有整合的载体的细胞。选择性标志物基因的存在表明转染细胞中存在转基因构建体。然后,可以通过限制性分析、电泳、Southern分析、聚合酶链反应等进一步分析那些显示出期望表型的细胞,以分析DNA,从而验证转基因整合至宿主细胞基因组中。还可以使用与转基因序列互补的引物。用于筛选同源重组和随机整合事件的聚合酶链反应是本领域已知的,参见,例如,Kim and Smithies,Nucleic Acids Res.16:8887-8903,1988;和Joyner etal.,Nature 338:153-156,1989。Thomas and Capecchi,supra,1987;Nicholas and Berg(1983)in Teratocarcinoma Stem Cell,eds.Siver,Martin and Strikland(Cold Spring Harbor Lab.,Cold Spring Harbor,N.Y.(pp.469-497);和Linney and Donerly,Cell 35:693-699,1983已证明突变型多瘤增强子和驱动新霉素基因的胸苷激酶启动子的特定组合在胚胎干细胞和EC细胞中均具有活性。

[0436] 可以通过多种方法来识别已经历同源重组的细胞。在一个实施方案中,选择方法可以检测是否存在针对细胞的免疫应答,例如通过人抗gal抗体。在优选的实施方案中,选择方法可以利用插入的或靶向的转基因作为选择工具以实现正选择,而不使用添加的荧光标志物(例如GFP、RFP)或抗生素选择基因。在某些情况下,转基因的靶向插入可以产生细胞表面蛋白,可以将其与适当的转基因特异性荧光标记的细胞一起分选以获得期望转基因的阳性表达。可选地,可以使靶基因座失活,使得功能的丧失可被监测或选择,例如,GGTA1基因座的失活将消除或减少靶细胞与凝集素(IB4)的结合,或者B4GalNT2的失活将消除或减少DBA凝集素与靶细胞的结合,并且在每种情况下,可以在缺乏这种凝集素结合的细胞中分选或富集靶向整合。在每种情况下,转基因在细胞表面的表达允许选择用于进一步分析的细胞。

[0437] 在其他实施方案中,选择方法可以包括评估暴露于细胞或组织时人血液中的凝血水平。通过抗生素抗性进行的选择最常用于筛选。该方法可以检测靶向载体上的抗性基因的存在,但不能直接指示整合是靶向重组事件还是随机整合。可选地,标志物可以是荧光标志物基因,例如GFP或RFP,或者是可经由细胞分选或FACs分析在细胞表面上检测到的基因。某些技术,例如PolyA和启动子陷阱技术,增加了靶向事件的可能性,但同样,不提供表明已实现期望的表型的直接证据。此外,可以使用负选择形式来选择靶向整合;在这些情况下,细胞致死因子(例如Tk或白喉A毒素)的基因以仅靶向事件才能使细胞避免死亡的方式插入。然后,可以对通过这些方法选择的细胞进行基因破坏、载体整合以及最后的基因耗竭分析。在这些情况下,由于选择是基于检测靶向载体整合而不是基于改变的表型,因此只能检测到靶向敲除,而不是点突变、基因重排或截短或其他此类修饰。

[0438] 可以通过以下技术进一步完成表征,包括但不限于:PCR分析、Southern印迹分析、Northern印迹分析、特异性凝集素结合测定和/或测序分析。还可以完成表型表征,包括通过在各种测定(包括免疫荧光、免疫细胞化学、ELISA测定、流式细胞术、western印迹、细胞

中RNA转录测试(例如通过RT-PCR))中结合抗小鼠抗体。可以通过Southern分析和PCR测定基因型。通过PBMC和内皮细胞的流式细胞术监测基因表达,并且通过免疫组化、Q-PCR(定量聚合酶链反应)和Western印迹分析监测细胞和器官中的基因表达。转基因特异性生物活性测定将定量和表征补体抑制、血小板聚集、激活蛋白C形成、ATP酶活性、因子Xa切割、混合淋巴细胞反应(MLR)和细胞凋亡。

[0439] 在其他实施方案中,GTKO动物或细胞含有另外的基因修饰。基因修饰不仅可以包括同源靶向,还可以包括外源基因的随机整合,单个基因座处的一组或一串基因的共整合,任何类型基因的突变、缺失和插入。另外的基因修饰可以通过进一步基因修饰从本文所述的转基因细胞和动物获得的细胞或通过将本文所述的动物与已进一步基因修饰的动物育种来进行。此类动物可以经修饰以消除αGT基因、CMP-Neu5Ac羟化酶基因(参见,例如,美国专利号7,368,284)、iGb3合酶基因(参见,例如,美国专利公开号2005/0155095)和/或1,4N-乙酰氨基半乳糖转移酶(β4GalNT2;参见,例如,Estrada JL et al.,Xenotransplantation 22:194-202[2015])Forssman合酶基因(参见,例如,美国专利公开号2006/0068479)的至少一个等位基因的表达。

[0440] 在另外的实施方案中,本文所述的动物还可以含有基因修饰以表达感兴趣的转基因,更具体地选自由免疫调节剂、抗凝剂和细胞保护转基因组成的组的人转基因。在优选的实施方案中,除了多转基因整合(靶向或随机,但超过至少4种基因,并且其中至少4种基因由至少三个启动子控制)之外,还可以实现猪vWF基因座的基因修饰,包括敲除(缺乏功能)、插入缺失以及同时敲除基因组中的猪vWF序列,或包括靶向敲入和将部分或全部的指定的猪vWF外显子(例如外显子22-28)用来自人vWF基因序列的人外显子22-28对应物替换。

[0441] 为了实现这些另外的基因修饰,在一个实施方案中,细胞可以经修饰以含有多个基因修饰。在其他实施方案中,动物可以一起育种以实现多个基因修饰。在一个特定实施方案中,根据本文所述的程序、序列和/或构建体产生的动物(例如猪)可以与缺乏αGal表达的动物(例如猪)一起育种(例如,如WO 04/028243中所述)。

[0442] 在另一个实施方案中,可以消除或降低负责异种移植物排斥反应的另外基因的表达。此类基因包括但不限于CMP-NEUAc羟化酶基因(CMAH)、β-4GalNT2、异红细胞糖苷酯3(iGb3)合酶基因和Forssman合酶基因。

[0443] 此外,编码负责抑制补体介导的裂解的补体相关蛋白的基因或cDNA也可以在本发明的动物和组织中表达。此类基因包括但不限于CD59、DAF(CD55)和CD46(参见,例如,WO 99/53042;Chen et al.Xenotransplantation,Volume 6Issue 3Page 194-August 1999,其描述了表达CD59/DAF转基因的猪;Costa C et al,Xenotransplantation.2002January;9(1):45-57,其描述了表达人CD59和H-转移酶的转基因猪;Zhao L et al.;Diamond L E et al.Transplantation.2001Jan.15;71(1):132-42,其描述了人CD46转基因猪。)

[0444] 另外的修饰可以包括化合物(例如抗体)的表达,其下调细胞对细胞粘附分子的表达,例如标题为"通过下调细胞粘附分子抑制异种移植物排斥反应"的WO 00/31126中所述,以及其中阻止信号2共刺激的化合物,例如通过向器官受体施用来自异种供体生物体的可溶形式的CTLA-4,例如,如标题为"通过阻断T细胞共刺激信号2(B7/CD28相互作用)的免疫抑制"的WO 99/57266中所述。

[0445] H.核移植

[0446] 在一些实施方案中,制备包含至少六种转基因的转基因猪的方法包括通过将本发明的多转基因猪细胞的细胞核注射至重建的体细胞核移植(SCNT)细胞中来生成多转基因猪合子。本文所述的基因修饰动物或转基因动物(例如有蹄类动物或猪)可以使用本领域已知的任何合适的技术来产生。这些技术包括但不限于(例如,原核的和/或细胞质的)显微注射、卵子或合子的电穿孔和/或体细胞核移植(SCNT)。本领域已知的任何另外的技术可以用于将转基因或多转基因或MCV载体引入动物体内。此类技术包括但不限于原核显微注射(参见,例如,Hoppe,P.C.and Wagner,T.E.,1989,美国专利号4,873,191);细胞质显微注射(参见例如Whitworth et al.,2014):逆转录病毒介导的基因转移至种系中(参见,例如,Van der Putten et al.,1985,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 82:6148-6152);胚胎干细胞中的基因靶向(参见,例如,Thompson et al.,1989,Cell56:313-321;Wheeler,M.B.,1994,WO 94/26884);胚胎的电穿孔(参见,例如,Lo,1983,Mol Cell.Biol.3:1803-1814);转染;转导;逆转录病毒感染;腺病毒感染;腺病毒相关感染;脂质体介导的基因转移;裸DNA转移;和精子介导的基因转移(参见,例如,Lavitrano et al.,1989,Cell 57:717-723)。有关此类技术的综述,参见,例如,Gordon,1989,Transgenic Anithals,Intl.Rev.Cytol.115:171-229。在具体实施方案中,CTLA4和/或CTLA4-Ig融合基因在有蹄类动物中的表达可以经由这些技术来实现。

[0447] 1.卵子或合子的电穿孔

[0448] 在一个实施方案中,编码转基因的构建体的显微注射可以用于产生转基因动物。在一个实施方案中,将本发明的核酸构建体或载体显微注射至合子的原核中。在一些实施方案中,可以将构建体或载体注射至合子的雄性原核中。在另一个实施方案中,可以将构建体或载体注射至合子的雌性原核中。在进一步的实施方案中,可以将构建体或载体、CRISPR、编码Cas9的信使RNA(mRNA)和gRNA(单指导RNA)注射至受精卵母细胞的细胞质中,以实现由这种基因编辑核酸酶处理后的修复错误导致的基因敲除或基因失活(插入、缺失、取代),或可以用于在此类合子中实现转基因或多基因载体的靶向敲入,导致基因修饰的稳定传递(参考,Whitworth 2014?)。在另一个实施方案中,可以用现有的转基因体细胞启动核移植,并且在胚胎重建和融合之后,在有或没有转基因载体、或多基因载体或MCV的情况下,可以将基因编辑核酸酶(例如Crispr/Cas9)注射至重建的核移植胚胎的细胞质中,使得在二倍体胚胎中,以及胚胎移植后随后的转基因猪中发生基因编辑事件。

[0449] 转基因构建体或载体的显微注射可以包括以下步骤:供体雌性的超数排卵;手术取出卵子,使卵子受精;将转基因转录单元注射至受精后的受精卵母细胞的细胞质中(例如,推定的在受精后约14小时合子),并且将转基因胚胎引入假孕宿主母体(通常是相同物种)的生殖道。参见例如美国专利号4,873,191,Brinster,et al.1985.PNAS 82:4438;Hogan,et al.,in“Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual”.Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.,1986.Robertson,1987,in Robertson,ed.“Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells a Practical Approach” IRL Press,Evnsham.Oxford,England.Pedersen,et al.,1990.“Transgenic Techniques in Mice—A Video Guide”,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.。转基因猪通常通过将转基因构建体或载体显微注射至猪胚胎中来产生,参见Withworth et al.,Biol.Reprod.91(3):78,1-13[2014]。

[0450] 在一个实施方案中,可以通过从每只仔猪尾部的组织中分离基因组DNA并用转基因特异性探针对约5微克的该基因组DNA进行核酸杂交分析来检测转基因的存在。在具体的实施方案中,转基因动物可以根据本领域技术人员已知的任何方法来产生,例如,如Bleck et al.,J.Anim.Sci.,76:3072[1998]中所公开的;也描述于美国专利号6,872,868;6,066,725;5,523,226;5,453,457;4,873,191;4,736,866;和/或PCT公开号WO/9907829。

[0451] 在一个实施方案中,原核显微注射方法可以包括将本发明的含有转基因的构建体或载体的至少约50个、100个、200个、300个、400个或500个拷贝连接至选择的启动子,例如,如本文所公开的,然后可以通过细玻璃针将外来DNA注射至受精卵中。在一个实施方案中,可以将DNA注射至合子的雄性原核中。猪合子是不透明的,并且核结构的可视化可能很困难。在一个实施方案中,猪合子的原核或细胞核可以在离心后观察到,例如,在15000g下离心3mm。原核的注射可以在放大和使用标准显微注射装置的情况下进行。可以用钝的保持移液管保持合子,并且用注射移液管穿透透明带、质膜和原核包膜。钝的保持移液管可以具有小直径,例如约50um。注射移液管可以具有比保持移液管更小的直径,例如约15um。DNA整合在复制过程中发生,作为宿主DNA的修复功能。然后,可以根据本领域技术人员已知的任何技术将这些含有外来DNA的卵植入代孕母体内以妊娠胚胎。

[0452] 在一些实施方案中,可以在受精后12小时对合子进行原核显微注射。这些基因的摄取可能延迟几个细胞周期。其结果是,根据摄取的细胞周期,只有某些细胞谱系可能携带转基因,从而产生嵌合子代。如果需要,可以对嵌合动物进行育种以形成真正的种系转基因动物。

[0453] 在示例性实施方案中,细胞质显微注射方法可以通过细玻璃针将靶向至少一种或更多种被靶向的天然基因、或修饰的天然基因座的CRISPR、编码Cas9的mRNA和gRNA注射至受精卵中。在特定的实施方案中,靶向至少一种或更多种被靶向基因(例如GGTA1、B4GalNT2、CMAH),并且包括多个指导RNA的CRISPR以及编码Cas9的mRNA和gRNA可以被注射至合子的细胞质中。

[0454] 2.体细胞核移植

[0455] 本发明提供了通过SCNT克隆含有某些转基因的有蹄类动物(例如猪)的方法。通常,猪可以通过核移植过程生产,包括以下步骤:获得期望的分化猪细胞作为供体细胞核的来源;从猪获取卵母细胞;将所述卵母细胞去核;将期望的分化细胞或细胞核转移至去核卵母细胞中,例如,通过融合或注射,以形成SCNT单元;激活所得的SCNT单元;以及将所述培养的SCNT单元转移至宿主猪中,使得SCNT单元发育成胎仔。

[0456] 核移植(nuclear transfer)技术或核移植(nuclear transplantation)技术是本领域已知的(参见,例如,Dai et al.Nature Biotechnology 20:251-255;Polejaeva et al Nature407:86-90(2000);Campbell,et al.,Theriogenology 68Suppl 1:S214-31(2007);Vajta,et al.,Reprod Fertil Dev 19(2):403-23(2007);Campbell et al.(1995)Theriogenology,43:181;Collas et al.(1994)Mol.Report Dev.,38:264-267;Keefer et al.(1994)Biol.Reprod.,50:935-939;Sims et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,90:6143-6147;WO 94/26884;WO 94/24274,和WO 90/03432,美国专利号4,944,384,5,057,420,WO 97/07669,WO 97/07668,WO 98/30683,WO 00/22098,WO 004217,WO 00/51424,WO 03/055302,WO 03/005810,美国专利号6,147,276,6,215,

041,6,235,969,6,252,133,6,258,998,5,945,577,6,525,243,6,548,741,以及Phelps et al.(Science 299:411-414(2003))。

[0457] 在一些实施方案中,含有本发明转基因的有蹄类动物细胞(例如猪细胞)可以用作供体细胞以提供用于核移植至去核卵母细胞中的细胞核以产生克隆的转基因动物。在一个实施方案中,有蹄类动物细胞无需表达转基因蛋白即可用作核移植的供体细胞。在一个实施方案中,猪细胞可以经工程化以表达来自含有启动子的核酸构建体或载体的转基因。替代地,猪细胞可以经工程化以通过同源重组在内源启动子的控制下表达转基因。在一个实施方案中,转基因核酸序列可以在组织特异性启动子、组织特异性增强子或两者的控制下插入基因组中。在另一个实施方案中,转基因核酸序列可以在组成型启动子的控制下插入基因组中。

[0458] 在某些实施方案中,提供了靶向载体,其被设计成允许在体细胞中进行靶向的同源重组。可以将这些靶向载体转化至哺乳动物细胞中,以通过同源重组靶向感兴趣的内源基因。在一个实施方案中,靶向构建体将转基因核苷酸序列和选择性标志物基因插入内源基因中,以便与上游序列处于阅读框内并产生活性融合蛋白。可以使用本发明的方法用构建体转化细胞,并且通过选择性标志物的手段来选择细胞,然后筛选重组体的存在。

[0459] 将已经修饰以含有本发明的转基因的供体细胞核转移至受体猪卵母细胞中。该方法的使用不限于特定的供体细胞类型。供体细胞可以如Wilmut et al.(1997)Nature 385:810;Campbell et al.(1996)Nature 380:64-66;或Cibelli et al.(1998)Science 280:1256-1258中所述。原则上可以采用可以成功用于核移植的所有正常核型的细胞,包括胚胎、胎仔和成体体细胞。胎仔成纤维细胞是一类特别有用的供体细胞。通常合适的核移植方法描述于Campbell et al.(1995)Theriogenology 43:181,Collas et al.(1994)Mol.Reprod.Dev.38:264-267,Keefer et al.(1994)Biol.Reprod.50:935-939,Sims et al.(1993)Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 90:6143-6147,WO-A-9426884,WO-A-9424274,WO-A-9807841,WO-A-9003432,美国专利号4,994,384和美国专利号5,057,420,Campbell et al.,(2007)Theriogenology 68Suppl 1,S214-231,Vatja et al.,(2007)Reprod Fertil Dev 19,403-423)。

[0460] 还可以使用分化的或至少部分分化的供体细胞。供体细胞也可以,但不是必须处于培养状态,并且可以是静止的。静止的核供体细胞是可以被诱导进入静止或在体内以静止状态存在的细胞。现有技术方法还在克隆程序中使用胚胎细胞类型(参见,例如,Campbell et al.(1996)Nature,380:64-68)和Stice et al.(1996)Biol.Reprod.,2054:100-110)。在具体实施方案中,成纤维细胞(例如猪成纤维细胞)可以经基因修饰以含有感兴趣的转基因。

[0461] 用于分离卵母细胞的方法是本领域熟知的。本质上,这可以包括从猪的卵巢或生殖道中分离卵母细胞。猪卵母细胞的容易获得的来源是屠宰场材料。对于技术(例如猪IVF(体外受精)、SCNT)的组合,卵母细胞通常必须在体外成熟后才能用作核移植的受体细胞,并且它们可以被精子细胞授精发育成胚胎。该过程通常需要从哺乳动物卵巢(例如从屠宰场获得的牛卵巢)收集未成熟(前期I)卵母细胞,并且在受精或去核之前在成熟培养基中使卵母细胞成熟,直至卵母细胞达到中期II阶段,这在牛卵母细胞的情况下通常发生在抽吸后约18-24小时,而在猪卵母细胞的情况下通常发生在约35-55小时。这段时间称为成熟期。

[0462] 中期II阶段的卵母细胞可以是受体卵母细胞,在这个阶段,认为卵母细胞可以或已经充分“激活”从而如同处理受精精子一样处理引入的细胞核。体内成熟的中期II阶段卵母细胞已成功用于核移植技术。本质上,可以在发情开始后35小时至48小时或39-41小时或注射人绒毛膜促性腺激素(hCG)或类似激素后,通过手术从非超数排卵或超数排卵猪中收集成熟的中期II卵母细胞。

[0463] 经过固定时间的成熟期后,可以将卵母细胞去核。在去核之前,可以将卵母细胞取出并置于适当的培养基中,例如含有每毫升1毫克透明质酸酶的HECM或TCM199,在去除卵丘细胞之前。然后,可以对剥离的卵母细胞进行极体筛选,并且选择中期II卵母细胞(根据极体的存在确定),然后用于核移植。随后进行去核。

[0464] 去核可以通过已知的方法进行,例如美国专利号4,994,384中所述。例如,可以将中期II卵母细胞置于HECM或TCM199中,任选地含有每毫升7-10微克细胞松弛素B,用于立即去核,或者可以置于合适的培养基中,例如胚胎培养基(例如PZM或Crlaa),加10%发情牛血清,然后再去核,例如不超过24小时后或16-18小时后。

[0465] 可以使用微量移液器通过显微手术去除极体和邻近的细胞质来完成去核。然后,可以对卵母细胞进行筛选,以识别那些已成功去核的卵母细胞。筛选卵母细胞的一种方法是在合适的保持培养基中用每毫升3-10微克的33342Hoechst染料对卵母细胞进行染色,然后在紫外线照射下观察卵母细胞小于10秒。然后,可以将已成功去核的卵母细胞置于合适的保持培养基(例如HECM或TCM 199)中。

[0466] 然后,可以将与去核卵母细胞同一物种的单个哺乳动物细胞转移至用于产生NT单元的去核卵母细胞的卵周间隙中。哺乳动物细胞和去核卵母细胞可以用于根据本领域已知的方法产生NT单元。例如,可以通过电融合来融合细胞。通过提供足以引起质膜瞬时击穿的电脉冲来实现电融合。质膜的分解时间极短,因为膜迅速重新形成。因此,如果两个相邻的膜被诱导破裂并且在重组时脂质双层混合,则两个细胞之间可以打开小通道。由于如此小的开口的热力学不稳定性,它不断扩大,直至两个细胞合二为一。参见,例如,Prather等人的美国专利号4,997,384。可以使用多种电融合介质,包括例如蔗糖、甘露醇、山梨醇和磷酸盐缓冲溶液。例如,融合培养基可以包含280毫摩尔(mM)甘露醇溶液,含有0.05mM MgCl.sub.2和0.001mM CaCl.sub.2(Walker et al.,Cloning and Stem Cells.2002;4(2):105-12)。融合还可以使用仙台病毒作为融合剂来完成(Graham,Wister Inot.Symp.Monogr.,9,19,1969)。此外,细胞核可以直接注射至卵母细胞中,而不是使用电穿孔融合。参见,例如,Collas and Barnes,(1994)Mol.Reprod.Dev.,38:264-267。融合后,将所得融合NT单元置于合适的培养基中直至激活,例如,HECM或TCM199,直至1-4小时后激活。通常激活可以在其后不久进行,例如小于24小时后,或对于牛NT约4-9小时后,以及对于猪NT约1-4小时后。

[0467] NT单元可以通过已知的方法激活。此类方法包括,例如,在亚生理温度下培养NT单元,本质上通过对NT单元施加冷的或实际冷却温度冲击。这可以通过在室温下培养NT单元来最方便地完成,室温相对于胚胎通常暴露的生理温度条件而言是冷的。替代地,可以通过应用已知的激活剂来实现激活。例如,在受精过程中精子对卵母细胞的穿透已被证明可以激活前体卵母细胞,从而在核移植后产生更多数量的有活力的妊娠和多个遗传学上相同的小牛。此外,处理(例如电击和化学冲击)可以用于激活融合后的NT胚胎。参见,例如,Susko-

Parrish等人的美国专利号5,496,720。另外,卵母细胞中二价阳离子水平的增加和卵母细胞中细胞蛋白磷酸化的减少可以同时或依次影响激活。这通常可以通过将二价阳离子(例如镁、锶、钡或钙)例如以离子载体的形式引入卵母细胞细胞质中来进行影响。增加二价阳离子水平的其他方法包括使用电击、乙醇处理和笼式螯合剂处理。可以通过已知方法减少磷酸化,例如,通过添加激酶抑制剂,例如,丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂,例如6-二甲基-氨基嘌呤、星形孢菌素、2-氨基嘌呤和鞘氨醇。

[0468] 可选地,可以通过将磷酸酶(例如磷酸酶2A和磷酸酶2B)引入卵母细胞来抑制细胞蛋白的磷酸化。然后,可以培养激活的NT单元,直至它们达到适合转移至雌性受体的大小,或替代地,可以将它们立即转移至雌性受体。

[0469] 适合于胚胎培养和成熟的培养基是本领域熟知的。可以用于胚胎培养和维持的已知培养基的实例包括Ham's F-10+10%胎牛血清(FCS)、组织培养基-199(TCM-199)+10%胎牛血清、Tyrodes-白蛋白-乳酸-丙酮酸(TALP)、Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(PBS)、Eagle's Whitten's培养基、PZM、NCSU23和NCSU37。参见Yoshioka K,Suzuki C,Tanaka A,Anas I M,Iwamura S.Biol Reprod.(2002)January;66(1):112-9和Petters RM,Wells K D.JReprodFertil Suppl.1993;48:61-73。

[0470] 此后,可以洗涤培养的NT单元,然后将其置于孔板中含有的合适培养基中,该孔板可以任选地含有合适的汇合饲养层。合适的饲养层包括,例如,成纤维细胞和上皮细胞。NT单元在饲养层上培养,直至NT单元达到适合转移至雌性受体或者适合获得可以用于产生细胞集落的细胞大小。NT单元可以培养直至至少约2个至400个细胞、约4个至128个细胞、或至少约50个细胞。可选地,NT单元可以立即转移至受体雌性。

[0471] 本发明中用于胚胎移植和受体动物管理的方法是胚胎移植行业中使用的标准程序。同步移植对于本发明的成功是重要的,即NT胚胎的阶段与受体雌性的发情周期同步。参见,例如,Siedel,G.E.,Jr.(1981)"Critical review of embryo transfer procedures with cattle in Fertilization and Embryonic Development in Vitro,L.Mastroianni,Jr.and J.D.Biggers,ed.,Plenum Press,New York,N.Y.,page 323。猪胚胎移植可以根据本领域已知的方法进行。作为参考,参见Youngs et al."Factors Influencing the Success of Embryo Transfer in the Pig,"Theriogenology(2002)56:1311-1320。

[0472] J.多转基因动物育种群

[0473] 本发明的动物(或胎仔)可以根据以下方式进行繁殖,包括但不限于选自以下的组:SCNT,自然育种,使用来自现有细胞系、胎仔或动物的细胞经由SCNT再衍生核供体——任选地在NT、顺序(sequential)核移植、人工生殖技术(ART)或这些方法或本领域已知的其他方法的任何组合之前向这些细胞添加另外的转基因。通常,"育种(breeding)"或"育种(bred)"是指任何繁殖方式,包括自然方式和人工方式。此外,本发明提供了通过本文公开的方法产生的动物的所有后代。应当理解,在某些实施方案中,此类后代对于本文所述的基因可以变得纯合。

[0474] 在一个实施方案中,通过多顺反子载体设计产生的基因修饰动物可以与通过不同的多顺反子载体产生的动物育种。具体地,每个多顺反子载体将由四种不同的转基因和两个不同的启动子/增强子系统组成。

[0475] 在另一个实施方案中,具有不同多顺反子载体、由此具有不同转基因的转基因动物可以一起育种,并且具有等于八种不同转基因的基因集(repertoire),其中这些基因的表达处于其不同启动子/增强子系统的控制下。

[0476] K.基因修饰的器官、器官碎片、组织或细胞

[0477] 在一个实施方案中,本发明是源自本文公开的转基因动物(例如,猪动物)的器官、器官组织或细胞。在某些实施方案中,器官是肺。在某些实施方案中,组织是肺组织。在选定的实施方案中,器官是肾脏、心脏、肺、胰腺或肝脏。在其他实施方案中,组织源自肝脏(包括分离的肝细胞,或肝源性干细胞)、脂肪(包括脂肪细胞或间充质干细胞)、心脏组织(包括心脏瓣膜、心包、心血管或其他衍生物(有活力的或无活力的),源自皮肤、真皮或结缔组织、骨、骨衍生物或其他矫形组织、硬脑膜、血管或任何其他组织,包括来自有活力的或无活力的其他器官。

[0478] 本发明的供体动物(例如,猪动物)可以处于任何发育阶段,包括但不限于胎仔、新生仔、幼仔和成年仔。在一些实施方案中,器官或组织分离自成年猪转基因动物。在替代的实施方案中,器官或组织分离自胎仔或新生仔转基因动物(参见例如Mandel(1999)J.Mol.Med.77:155-60;Cardona,et al.(2006)Nat.Med.12:304-6)。

[0479] 在示例性实施方案中,供体动物的年龄可以是10岁、9岁、8岁、7岁、6岁、5岁、4岁、3岁、2岁或1岁以下。在一个实施方案中,器官或组织或组织分离自6岁以下的转基因动物。在另一个实施方案中,器官或组织分离自3岁以下的转基因动物。供体动物可以是0岁至2岁、2岁至4岁、4岁至6岁、6岁至8岁、或8岁至10岁之间的任何年龄。在另一个实施方案中,器官或组织分离自胎仔或新生仔阶段。在另一个实施方案中,器官或组织分离自新生仔至6个月龄的转基因猪。在一个实施方案中,器官或组织分离自胎仔至2岁的转基因动物。在具体实施方案中,器官或组织分离自6个月龄至2岁的转基因动物,并且在更具体实施方案中,7个月龄至1岁的转基因动物。在一个实施方案中,器官或组织分离自2-3岁的转基因动物。在另一个实施方案中,器官或组织分离自体重(而非年龄)匹配的转基因动物,以向人移植受体提供最佳尺寸的器官或组织,从而所述猪器官或组织从基于受体/患者的年龄、体重和/或性别定制的供体动物获得。

[0480] 在某些实施方案中,通过手术切除供体转基因心脏、肾脏、肺或其他组织。手术切除后,供体肾脏、心脏、肺或组织可以在移植前进行进一步处理或评价。

[0481] L.“异种器官预调节”或免疫调节(immune conditioning)

[0482] 移植的肺的长期存活率低于其他器官,包括心脏、肾脏和肝脏。器官移植后的这种较差结果可能与多种因素有关,其中缺血再灌注(IRI)损伤是炎症损伤,主要由供体心脏骤停后脑死亡引起的缺血引起,但也包括一些因素,例如获取过程中器官取出的持续时间、器官冷藏等。

[0483] 例如,在血流恢复时,异种器官(例如,肺组织)的再氧合加剧缺血再灌注(IRI)损伤。进一步的损害乃至损伤是,与其他移植器官相比,新移植的异种器官(例如,肺)在手术后可能继续暴露于环境抗原。存活率的下降可以部分归咎于这种随后的环境抗原暴露。已被提出,移植的异种器官(例如,肺)近乎连续地暴露于环境抗原会产生独特的情况,其中免疫识别途径被激活,对炎症、组织损伤和IRI后果的敏感性增加,从而导致排斥反应。

[0484] 因此,本公开的一个方面提供了增强和/或增加异种器官存活率的方法。

[0485] 1.异种肺

[0486] 在一些实施方案中,异种器官是肺。在该实施方案中,用高渗压的无细胞血清灌注肺,该血清通过从血管外隔室抽出液体来使水肿的肺脱水,从而可以改善气体交换并且可以使最初被判断为不适合移植的肺变得可用。

[0487] 在示例性实施方案中,考虑了肺移植物耐受诱导的策略,经由离体肺灌注修复肺的非限制性实例,更具体地,用补充有AdhIL-10的STEEN溶液灌注肺作为基因治疗以增强移植肺的长期存活。在一个进一步的实施方案中,耐受性可以通过“混合嵌合”,从胸骨、胸腺收集的骨髓(有或没有CD47)来诱导。

[0488] 离体肺灌注(EVLP)可以用于评价和修复从供体中取出的肺,从而可以改善边缘(marginal)/损伤肺的功能,并且可以在受体植入之前识别显著的、持续的功能障碍。

[0489] 将肺置于离体回路(Toronto XVIVO™系统)中,并且用Steen Solution™常温灌注2h至4h,以进行生理重新评估。关于肺利用的决定,在离体灌注评估期间δpO2(pO2肺静脉pO2-肺动脉pO2)>400mmHg的肺被认为是可移植的。以下肺被排除,不用于移植:如果pO2<400mmHg或显示出以下任何功能参数劣化>10%:肺血管阻力(PVR)、动态顺应性或气道压力。如果根据肺移植外科医生的临床判断认为肺不适合移植,则也将其排除,不用于移植。

[0490] 此外,可以将抗炎细胞因子输注至肺以促进损伤修复,并且利用载体介导的白介素(IL)-10转移来减少促炎细胞因子产生、促进细胞间肺泡上皮紧密连接的恢复、改善氧合和降低血管阻力。还可以输注抗生素来抑制/消除感染。

[0491] 在一个实施方案中,离体肺灌注可以用作将由腺-IL10载体一致表达的IL-10递送至异种肺的递送机制。该实施方案通过在常规免疫抑制的较低暴露下提供对早期炎症的极好控制,有利于来自转基因动物的肺移植。此外,可以在肺移植时给予抗IL6r(抗生素)和常规免疫抑制,并且在一段时间(~4个月)后重复使用耐受调节方案,作为成功停止常规免疫抑制的方法。

[0492] 混合嵌合体的诱导使用在移植前5-7天期间的强化的非清髓性预处理方案;试图将其缩短以适应已故供体环境的需求的做法毒性太大且难以耐受。尽管尚未在临床上得到证明,但通过耗竭$CD8^+$记忆T细胞,然后安排骨髓移植时间以最小化促炎细胞因子,从而“延迟”耐受诱导已被用于非人灵长类肾脏移植实验。

[0493] 2.异种心脏-非缺血性心脏保存(NIHP)

[0494] 在一些实施方案中,异种器官是心脏。IRI可以对心脏移植后的存活率产生有害影响。克服心脏移植IRI的一种策略是利用非缺血性心脏保存(NIHP)系统。NIHP是用于地面和空中运输的便携式设备,其可以用于防止潜在的损伤,例如与寒冷、静态异种、供体猪心脏保存和/或储存(例如XVIVO心脏保存系统)相关的损伤。NIHP可以如本领域技术人员已知的那样进行。

[0495] 例如,心脏切除术后,心脏随即在XVIVO心脏盒中灌注含有人红细胞的冷的(8℃)氧合的心脏停搏营养-激素溶液。猪供体心脏可以安全保存24h。使用NIHP系统也可以将内皮收缩功能保留至少8h。本发明人使用本文所述的方法和多转基因动物观察到,使用XVIVO心脏保存系统进行原位异种心脏移植后可再现的存活期为至少200天。诱导全身麻醉后,对手术部位进行无菌准备和无菌铺巾。麻醉团队将监测和记录血压(外周袖带或通过左股动脉或右股动脉接入的动脉管线)、体温、心率和氧饱和度、呼气末CO2。然后,从柄状体到剑突

进行中线切口,并且使用电灼控制出血。胸骨在其中线分开,再次用电灼术控制出血。盐水或Ringers乳酸盐用于补充液体损失,维持接近正常的血压。切开心包囊,暴露心脏,全身肝素化(100IU/kg,iv)后,控制主动脉和肺动脉。接下来,在闭塞升主动脉后,使用基于冷(8℃)血液的XHS心麻痹*(80mL/kg)使心脏停搏。将心脏向尾部牵拉(retract),并且在无名动脉水平处将颅腔静脉(CVC)和主动脉分开。接下来,将心脏向颅背侧牵拉,依次控制IVC、半奇静脉、肺动脉(PA)和肺静脉,然后在心包反射水平上分开。然后,将心脏转移至XVIVO心脏盒进行静态非缺血冷(8℃)灌注。

[0496] XHS溶液(如下所述制剂)可以与新鲜猪血混合,然后输注至供体猪心脏以在供体心脏切除术之前使心脏立即骤停。在无菌条件下,切除的供体心脏然后可以连接至XVIVO心脏盒系统(XHBS;XVIVO Perfusion,Gothenburg,Sweden)进行灌注保存持续至约1-4小时,以模拟临床应用所需的保存。温度可以维持在8℃,并且压力维持在20mmHg。对于灌注保存,XHS溶液可以与受试者(例如,狒狒或人)的血液(15%Hgb)混合。在植入过程中,每15分钟将XHS/血液灌注液以60cc的体积在60秒内施用至闭塞的升主动脉。

[0497] V.处理方法

[0498] 本发明提供了用于异种移植的方法,其包括向有需要的受试者施用源自本发明的转基因猪动物的猪器官、组织或细胞。可以使用本领域已知的任何方法将转基因器官、细胞或组织(例如,心脏、肾脏、胰腺、肝脏或肺)移植至受试者体内。

[0499] 在一些实施方案中,受试者是非人灵长类动物或人。在一些实施方案中,器官选自由心脏、肺、肝脏和肾脏组成的组。在一些实施方案中,组织选自由血管组织、视网膜组织、神经组织和角膜组织组成的组。在一些实施方案中,用于异种移植的方法进一步包括在器官、组织或细胞的异种移植之后向受试者施用临床相关的免疫抑制方案。

[0500] 本文所述的发明涵盖本文所述的器官、器官碎片、组织或细胞的异种移植方法。在示例性实施方案中,该方法包括但不限于向受试者施用本文所述的供体动物的器官、器官碎片、组织或细胞。供体动物可以是猪。受试者或宿主可以是灵长类动物,例如,非人灵长类动物(NHP),包括但不限于狒狒。宿主可以是人,特别是患有可能受移植治疗影响的疾病或病症的人。

[0501] 在示例性实施方案中,该方法包括但不限于向宿主施用来自供体动物的组织(例如,本文所述的修饰的转基因)。供体动物可以是猪。宿主可以是灵长类动物,例如非人灵长类动物(NHP),包括但不限于狒狒。宿主可以是人,特别是患有需要异种移植的疾病或病症的人。

[0502] 有利地,本公开提供的转基因器官、细胞或组织(例如,心脏、肾脏、胰腺、肝脏或肺)组织相对于本领域已知的异种移植物具有改进的功能。在一个实施方案中,与野生型器官、细胞或组织,或源自本领域已知的转基因动物的转基因器官、细胞或组织相比,所述转基因器官、细胞或组织在猪到人异种移植的离体模型中具有提高的存活率。在具体实施方案中,与野生型器官、细胞或组织,或源自本领域已知的转基因动物的转基因器官、细胞或组织相比,所述转基因器官、细胞或组织存活至少约90分钟、至少约120分钟、或至少约150分钟、至少约180分钟、至少约210分钟、至少约240分钟、至少约270分钟、至少约300分钟、至少约330分钟、至少约360分钟或更多分钟。在具体实施方案中,与野生型器官、细胞或组织,或源自本领域已知的转基因动物的转基因器官、细胞或组织相比,转基因器官、细胞或组织

存活至少约1、至少约3、至少约5、至少约7、至少约14、至少约20、或至少约30、至少约50、至少约60、至少约70、至少约80、至少约90或更多。在另一个具体实施方案中，转基因肺的存活时间是野生型器官、细胞或组织，或源自本领域已知的转基因动物的转基因器官、细胞或组织的至少约2倍、至少约4倍、至少约8倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍或至少约100倍长。

[0503] 在另一个实施方案中，本文所述的转基因器官、细胞或组织在生命支持体内模型中具有改善的功能和存活能力。在具体实施方案中，本文所述的转基因器官、细胞或组织支持生命(例如，在生命支持模型中的狒狒中)至少约10小时、至少约20小时、至少约30小时或约30小时或更长时间。在另一个具体实施方案中，所述转基因器官、细胞或组织的存活时间是野生型器官、细胞或组织，或源自本领域已知的转基因动物的转基因器官、细胞或组织的至少约2倍、至少约4倍、至少约8倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍或至少约100倍长。

[0504] 本发明的另一种方法是异种移植的方法，其包括本文提供的转基因器官、细胞或组织(例如，心脏、肾脏、胰腺、肝脏或肺)。在一些实施方案中，将转基因器官、细胞或组织(例如，心脏、肾脏、胰腺、肝脏或肺)移植至灵长类动物中，并且移植的转基因器官、细胞或组织存活至少约1周、至少约2周、至少约3周、至少约4周、至少约5周、至少约6周、至少约7周、至少约8周、至少约9周、至少约10周、至少约11周或至少约12周或更多周。

[0505] 在一些实施方案中，移植的转基因器官、细胞或组织存活至少约1个月、至少约2个月、至少约3个月、至少约4个月、至少约5个月、至少约6个月、至少约7个月、至少约8个月、至少约9个月、至少约10个月、至少约11个月或至少约12个月或更多个月。

[0506] 在一些实施方案中，移植有本文所述的转基因器官、细胞或组织的受试者比移植有源自野生型猪动物的器官、组织或细胞的受试者存活长至少30天。在一些实施方案中，移植有本文所述的转基因器官、细胞或组织的受试者比移植有源自野生型猪动物的器官、组织或细胞的受试者存活长至少60天。在一些实施方案中，受试者可以是哺乳动物。在一个实施方案中，哺乳动物选自人、非人灵长类动物、猴或狒狒。

[0507] 在一些实施方案中，转基因器官、细胞或组织可以是心脏、肾脏或肺或其碎片。在一些实施方案中，转基因器官、细胞或组织可以在移植之前转移至离体灌注处理系统。

[0508] 本发明的另一种方法是异种移植方法，其中将本文提供的转基因肺或肺组织移植至灵长类动物中，并且移植的肺或组织存活如上所述的一段时间。在一个实施方案中，使用肺异种移植的生命支持模型来评估肺功能。在一个实施方案中，生命支持模型包括从灵长类动物中取出一个肺并将来自本发明的猪供体的单个肺移植至该灵长类动物受体中。在另一个实施方案中，生命支持模型包括从灵长类动物中取出双肺并将来自本发明的猪供体的双肺移植至该灵长类动物受体中。在另一个实施方案中，可以从灵长类动物中取出肺和心脏，并且用本发明的猪肺和心脏替换。在本发明的实施方案中，可以评估灵长类动物中的生命支持肺功能的持续时间。在一些实施方案中，灵长类动物是人或非人灵长类动物。

[0509] 为了评估生命支持肺功能的持续时间，可以从猪收获本发明的基因修饰的猪肺。可以切除心肺块，并且可以准备一个肺、两个肺或两个肺和心脏用于移植至灵长类动物体内。

[0510] 灵长类动物受体可以被镇静并维持在全身麻醉下。然后，可以使用本领域已知的

方法从灵长类动物中取出一个肺、两个肺或心脏和肺(参见,例如,Nguyen et al The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery May 2007;133:1354-63和Kubicki et al International Journal ofSurgery 2015:1-8),移植至灵长类动物中,然后可以对灵长类动物进行再灌注。在移植物再灌注之前和之后,可以在预定时间点连续收集血液和组织活检标本以进行体外分析。主动脉和左肺动脉上的血管流量探头(Transonic Systems Inc,Ithaca,NY)可以分别连续测量心输出量和流向移植器官的流量。在仅移植一个肺而第二个肺仍是原生灵长类动物肺的模型中,可以逐渐阻断流向原生肺的血流,以评估移植肺支持生命的能力。移植物存活可以定义为支持生命的肺功能的持续时间。对于长期存活实验,将流量探头置于主动脉和一根肺动脉上,可以监测通过肺移植物的血流。国际心肺移植学会建议在此类模型中持续实现三个月的生命支持功能,从而考虑进行人体试验(Kubicki et al International Journal ofSurgery 2015:1-8)。

[0511] 在一些实施方案中,将源自本发明的转基因动物的转基因肺或肺组织移植至灵长类动物中。在一些实施方案中,移植后,灵长类动物(即需要移植的受试者)需要减少的免疫抑制疗法或不需要免疫抑制疗法。减少的免疫抑制疗法或不进行免疫抑制疗法包括但不限于与其他方法所需的剂量相比减少(或完全消除)免疫抑制药物/药剂的剂量;与其他方法所需的相比,减少(或完全消除)免疫抑制药物/药剂的类型数量;与其他方法所需的时间相比,减少(或完全消除)免疫抑制疗法的持续时间;和/或与其他方法所需的相比,减少(或完全消除)免疫抑制维持。

[0512] 本发明提供了治疗或预防肺病的方法,其中将本文提供的转基因肺或肺组织移植至有需要的受试者(即灵长类动物)中,并且在移植后,灵长类动物具有改善的肺功能。与移植前的水平相比或与使用其他方法达到的水平相比,接受移植的灵长类动物的肺功能可有所改善。

[0513] 在一些实施方案中,受体(宿主)在移植时可以部分或完全免疫抑制或根本不免疫抑制。在一些实施方案中,该方法进一步包括在源自本发明的转基因动物的器官、组织或细胞的异种移植之后向受试者施用临床相关的免疫抑制方案。在一些实施方案中,可以在移植之前、期间和/或之后使用的免疫抑制剂和/或药物是本领域技术人员已知的任何药物,并且包括但不限于KPL-404(Kiniksa Pharmaceuticals)、TNX-1500(Tonix Pharmaceuticals Holding Corp.)、MMF(吗替麦考酚酯(Cellcept))、ATG(抗胸腺细胞球蛋白)、抗CD154(CD40L)、抗CD20抗体、抗CD40(2C10R4抗体疗法)。参见Mohiuddin MM.et al.,Apr 5;7:11138.[2016],阿仑单抗(alemtuzumab,Campath)、CTLA4-Ig(Abatacept/Orencia)、贝拉西普(belatacept,LEA29Y)、西罗莫司(Rapimune)、他克莫司(Prograf)、达克珠单抗(daclizumab,Zenapax)、巴利昔单抗(Simulect)、英夫利西单抗(Remicade)、环孢素、脱氧精胍菌素(deoxyspergualin)、可溶性补体受体1、眼镜蛇毒、甲泼尼龙、FTY720、依维莫司、抗CD154-Ab、来氟米特、抗IL-2R-Ab、雷帕霉素和人抗CD154单克隆抗体。一种或多于一种免疫抑制剂/药物可以一起使用或序贯使用。一种或多于一种免疫抑制剂/药物可以用于诱导疗法或维持疗法。在诱导和维持阶段可以使用相同或不同的药物。在一个实施方案中,达克珠单抗(Zenapax)用于诱导疗法,并且他克莫司(Prograf)和西罗莫司(Rapimune)用于维持疗法。在另一个实施方案中,达克珠单抗(Zenapax)用于诱导疗法,并且低剂量他克莫司(Prograf)和低剂量西罗莫司(Rapimune)用于维持疗法。在一个实施方

案中,阿仑单抗(Campath)用于诱导疗法。参见Teuteberg et al.,Am J Transplantation,10(2):382-388.2010;van der Windt et al.,2009,Am.J.Transplantation9(12):2716-2726.2009;Shapiro,The Scientist,20(5):43.2006;Shapiro et al.,N Engl J.Med.355:1318-1330.2006。免疫抑制也可以使用非药物方案实现,包括但不限于全身照射、胸腺照射,全部和/或部分脾切除,“混合嵌合”,从胸骨、胸腺收集骨髓(Sachs,2014)。这些技术还可以与一种或更多种免疫抑制药物/药剂组合使用。

[0514] A.单肺移植

[0515] 如果受体进行单个肺移植,他/她将在右侧或左侧进行开胸切口,具体取决于待替换的肺。供体肺到达手术室后,外科医生将切除患病肺。受体将使用另一个肺进行通气。如果剩余的肺无法交换足够的氧气,外科医生可能将受体置于心肺旁路中。他们的血液将通过体外的机器过滤,将氧气带入他们的血液并去除二氧化碳。

[0516] 将使用三个连接来连接新肺。这些连接称为吻合。首先,将供体肺的主支气管连接至受体的支气管。然后,连接血管——首先是肺动脉,然后是肺静脉。最后,缝合切口,受体将被送往重症监护室,他/她将在那里睡眠约12小时至24小时。

[0517] B.双侧或双肺移植

[0518] 如果双肺均被移植(双侧移植),外科医生将在每个乳房下方做一个切口,称为前胸廓切开术,或者在乳房底部从右侧到左侧做一个切口。这称为横向胸骨切开术。在双侧肺移植中,每个肺均被单独替换。外科医生首先切除功能最差的肺。除非需要部分心肺旁路,否则受体将使用剩下的肺进行通气。一旦第一个肺被移除,将使用三个连接来连接供体肺。供体支气管连接至受体的主支气管,然后连接血管——首先是肺动脉,然后是肺静脉。受体的第二个患病肺被移除,另一个新肺以同样的方式连接。一旦第二个肺完全连接,恢复血流。

[0519] 可以允许足够的时间用于植入,例如,1周、3周等。

[0520] C.评估成功植入

[0521] 可以使用本领域技术人员已知的任何技术来确定成功植入。这些技术可以包括但不限于供体C-肽水平评估、组织学研究、静脉内葡萄糖耐量测试、外源胰岛素需求测试、精氨酸刺激测试、胰高血糖素刺激测试、IEQ/kg(胰岛当量/kg)需求测试、测试受体正常血糖的持续性、测试免疫抑制需求以及测试移植的胰岛的功能(参见Rood et al.,Cell Transplantation,15:89-104.2006;Rood et al.,Transplantation,83:202-210.2007;Dufrane and Gianello,Transplantation,86:753-760.2008;van der Windt et al.,2009,Am.J.Transplantation,9(12):2716-2726.2009)。可以使用一种或更多种技术来确定植入是否成功。成功植入可以是指相对于不治疗,或者在一些实施方案中,相对于其他移植方法(即植入比使用其他方法/组织进行移植时更成功)。在某些情况下,成功植入是通过评估供体C-肽水平(包括添加免疫抑制的生命支持功能)来确定的。

[0522] D.终末期器官衰竭:肺、心脏和肾脏疾病

[0523] 本发明提供了治疗有需要的受试者的疾病或病症的方法,其包括将源自本发明的转基因猪的器官、细胞或组织(例如,心脏、肾脏、胰腺、肝脏或肺)植入受试者。在一些实施方案中,疾病或病症选自肺病、心脏病或肾病。

[0524] 在一些实施方案中,疾病或病症是肺病。肺病可以是晚期肺病。在一个实施方案

中,晚期肺病可以与原发性肺高压(PAH)、慢性阻塞性肺病(COPD)、间质性肺病(ILD)、结节病、支气管扩张、特发性肺纤维化(IPD)、囊性纤维化(CF)、α1-抗胰蛋白酶缺乏症。

[0525] 如本领域技术人员所理解的,原发性肺高压(PAH)是指肺动脉中的高血压。如本领域技术人员所理解的,囊性纤维化是指隐性遗传的遗传疾病,意味着父母双方均需要具有缺陷基因。约30,000名美国人患有CF,并且约1,200万人携带该基因但未受其影响。CF患者经常患有呼吸道问题,包括支气管炎、支气管扩张、肺炎、鼻窦炎(鼻窦炎症)、鼻息肉(鼻内生长)或气胸(肺塌陷)。CF的症状包括频繁喘息或肺炎、带有粘稠粘液的慢性咳嗽、持续性腹泻、咸味皮肤和生长不良。

[0526] 如本领域技术人员将理解的,慢性阻塞性肺病(COPD)是指可由哮喘、慢性支气管炎或肺气肿引起的。慢性阻塞性肺病患者随时间慢慢失去呼吸能力。慢性阻塞性肺病(COPD)的症状包括从慢性咳嗽和咳痰到重度致残性呼吸急促。

[0527] 如本领域技术人员所理解的,α1-抗胰蛋白酶疾病/α-1抗胰蛋白酶缺乏症是遗传性病况,其中缺乏α-1抗胰蛋白酶——保护肺的蛋白——导致早发性肺病。吸烟大大增加了这种风险。α-1相关肺气肿的首发症状通常出现在20岁至40岁之间,包括活动后呼吸短促、运动能力下降和喘息。

[0528] 如本领域技术人员所理解的,间质性肺病(ILD)是通用术语,包括多种慢性肺病症,例如特发性肺纤维化、结节病、嗜酸性肉芽肿、Goodpasture综合征、特发性肺含铁血黄素沉着症和Wegener肉芽肿病。在人患有ILD时,肺部受到四种方式的影响:1)肺组织受损,2)肺部气囊壁发炎,3)间质(气囊之间的组织)开始形成疤痕和4)肺部变得僵硬。

[0529] 如本领域技术人员所理解的,结节病是指涉及可以在多个器官中形成为结节的炎症细胞(肉芽肿)的异常聚集的疾病。肉芽肿最常位于肺或其相关淋巴结。如本领域技术人员所理解的,支气管扩张是指气道的不可逆扩张。随着气道变宽,气道变得不那么坚硬并且更容易塌陷。清除分泌物也变得更加困难。支气管扩张可能在出生时出现,也可能在以后因受伤或其他疾病(最常见的是囊性纤维化)而出现。它可以发生在任何年龄,但最常见的是从童年开始。支气管扩张的症状包括咳嗽、发烧、虚弱、体重减轻和疲劳。

[0530] 在一些实施方案中,疾病或病症是心脏疾病或病症。最终可能需要心脏移植的心脏疾病或病症选自由冠心病、心力衰竭、扩张型心肌病、冠状动脉疾病、限制型心肌病、肥厚性心肌病、瓣膜性心脏病、先天性心脏病组成的组。

[0531] 如本文所用,冠心病是指脂肪物质在供应心脏的动脉中积聚,其阻塞或中断流向心脏的血流。如本文所用,心力衰竭是指在心脏不能将足够的血液泵送至身体其他部位时发生的严重健康病况。心力衰竭是患者接受心脏移植的主要原因。如本文所用,扩张型心肌病是指心脏的左心室变大并变弱以致其不能正确泵血的病况。如本文所用,冠状动脉疾病是指常见形式的心脏病,其中脂肪沉积使向心脏供血的动脉变窄。冠状动脉疾病随时间弱化心肌。这种弱化可能导致心肌梗塞(心脏病发作)。如本文所用,限制型心肌病是指罕见形式的心肌病,其中心脏的下腔室(心室)异常僵硬并且不能在心脏泵送时正常收缩以充满血液。如本文所用,肥厚性心肌病是指心肌变得太厚并影响心脏泵血方式的遗传疾病。如本文所用,瓣膜性心脏病是指瓣膜形成异常或停止正常功能的病况。如本文所用,先天性心脏病是指人的心脏从出生起就不能正常工作的病况。许多患有先天性心脏病的人现在都能很好地存活到成年。

[0532] 在一些实施方案中,移植可以涉及单肺或双肺(双侧)。在一些实施方案中,移植还可以涉及心肺移植或心脏-肺移植,即在患有终末期心脏和肺病的患者中同时进行心脏和肺的手术置换。对于特定疾病状态的患者,该手术仍是可行的治疗替代方案。需要进行心肺移植的终末期心肺衰竭的原因包括先天性心脏病和特发性原因,包括以下:不可修复的先天性心脏异常伴肺高压(Eisenmenger综合征)、原发性肺高压伴不可逆性右心衰竭;仅涉及心脏和肺的结节病。

[0533] 在一些实施方案中,疾病或病症是肾病。最终可能需要心脏移植的肾病或病症可以是终末期肾病。终末期肾病在肾脏丧失约90%的过滤能力时发生。在肾单位受损时,肾脏失去过滤能力。这意味着体内的废物和化学物质含量很高且危及生命。在肾脏失去约90%的过滤能力时,人就被认为患有终末期肾病,因为体内积聚的废物和化学物质水平很高并危及生命。

[0534] 终末期肾病的已知且常见原因可以包括糖尿病、高血压(high blood pressure)、高压(hypertension)、肾动脉狭窄、多囊肾病、先天性病症和/或免疫病症。在一些情况下,糖尿病(例如,糖尿病肾病)患者的血糖持续升高。高血糖会损害肾脏中的过滤器,导致长期肾脏损害,最终导致肾衰竭。这称为糖尿病肾病。肾脏微小血管中的高血压会损害并阻碍过滤过程。肾动脉狭窄是指将血液输送到肾脏的一根或多根动脉变窄,导致动脉闭塞。多囊肾病是由肾脏离子通道(例如TRP通道)缺陷引起的遗传性病况。其导致肾脏内形成了几个大的囊肿或空腔,导致肾脏随时间增大并丧失功能。在超过90%的肾功能受损时,一些先天性肾脏缺陷就会显现。系统性红斑狼疮(SLE)SLE是自身免疫性疾病,其中免疫系统攻击自身组织,导致受影响的器官产生广泛炎症和组织损伤。它可以影响关节、皮肤、大脑、肺、肾脏和血管。

[0535] 在一些实施方案中,该方法进一步包括向受试者施用一种或更多种治疗剂。在一些实施方案中,一种或更多种治疗剂选自抗排斥反应剂、抗炎剂、免疫抑制剂、免疫调节剂、抗微生物剂、抗病毒剂及其组合。

[0536] VI.另外的实施方案

[0537] 在第一方面,本发明提供了转基因猪,其包含至少六种转基因,其中在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子的控制下,并且其中该猪缺乏α1,3半乳糖基转移酶的表达。

[0538] 单个基因座可以是任何合适的基因座。在一个实施方案中,单个基因座是未修饰的天然基因座。在替代的实施方案中,单个基因座是修饰的天然基因座。基因座可以通过任何合适的方式进行修饰,包括但不限于由基因编辑工具介导的插入、缺失或取代。在某些实施方案中,修饰的天然基因座包括转基因DNA。转基因DNA可以是,例如,选择性标志物基因。在一些实施方案中,转基因DNA是着陆区——如本文进一步所述。在具体实施方案中,单个基因座是AAVS1、ROSA26、CMAH、β4GalNT2、GHR或GGTA1。根据该实施方案,该基因座可以是天然的或修饰的。

[0539] 在示例性实施方案中,单个基因座是天然GGTA1或修饰的天然GGTA1。在某些实施方案中,修饰的天然GGTA1基因座包括选择性标志物基因,例如neo。在其他实施方案中,修饰的天然GGTA1基因座包括由基因编辑工具介导的插入、缺失或取代。在其他实施方案中,修饰的天然GGTA1基因座包括着陆区以促进基因靶向。

[0540] 启动子可以变化。在示例性实施方案中,启动子是内源的、外源的或其组合。在示例性实施方案中,启动子是组成型的或可调节的或其组合。在某些实施方案中,至少一个启动子是可调节的(例如,组织特异性或诱导型启动子)。

[0541] 在示例性实施方案中,转基因猪包含六种转基因,其中六种转基因表达为第一多顺反子、第二多顺反子和第三多顺反子,并且其中第一启动子控制第一多顺反子的表达,第二启动子控制第二多顺反子的表达,并且第三启动子控制第三多顺反子的表达。在示例性实施方案中,转基因猪包含六种转基因,其中至少六种转基因中的每一个均由专用的启动子控制。

[0542] 在具体实施方案中,转基因猪包含至少六种转基因,其中在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子的控制下,其中至少一个启动子是组成型的(例如,CAG)并且至少一个启动子是组织特异性的(例如,内皮特异性启动子,例如ICAM-2),并且其中该猪缺乏α1,3半乳糖基转移酶的表达。

[0543] 在另一个具体实施方案中,转基因猪包含至少六种转基因,其中在单个基因座处掺入和表达至少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子的控制下,其中至少两个启动子是组成型的并且其中该猪缺乏α1,3半乳糖基转移酶的表达。

[0544] 转基因可以变化。在示例性实施方案中,转基因是抗凝剂、补体抑制剂、免疫调节剂、细胞保护转基因或其组合。

[0545] 在某些实施方案中,至少一种转基因是抗凝剂。在一个实施方案中,抗凝剂是TBM、TFPI、EPCR或CD39。在具体实施方案中,至少两种转基因是抗凝剂。在某些实施方案中,至少一种转基因是补体调节剂,例如补体抑制剂。在一个实施方案中,补体抑制剂是CD46、CD55或CD59。

[0546] 在某些实施方案中,至少一种转基因是免疫调节剂。免疫调节剂可以是,例如,免疫抑制剂。在一个实施方案中,免疫抑制剂是猪CLTA4-IG或CIITA-DN。在具体实施方案中,至少一种转基因是CD47。

[0547] 在示例性实施方案中,转基因动物包含至少一个另外的基因修饰,即除了表达多种转基因和缺乏αGal的表达之外。另外的基因修饰可以变化。在示例性实施方案中,至少一个基因修饰是基因敲除,基因敲入,基因替换,点突变,基因、基因片段或核苷酸的缺失、插入或取代,大基因组插入,或其组合。在某些实施方案中,单个基因座不是GGTA1并且至少一个另外的基因修饰包括α1,3半乳糖基转移酶基因的敲除。

[0548] 在其他实施方案中,另外的基因修饰涉及掺入和表达至少一种另外的转基因。在一个实施方案中,另外的转基因是人CD46基因、人HLA-3和/或人源化vWF或嵌合猪-人vWF基因。在某些实施方案中,至少一个另外的基因修饰是猪vWF基因座的修饰以减少或消除人血小板的自发聚集。

[0549] 在某些实施方案中,至少一个另外的基因修饰是猪基因的敲除。在某些实施方案中,猪基因可以是β4GalNT2、CMAH、异红细胞糖苷酯3合酶、Forrsman合酶或vWF。在某些实施方案中,至少一个另外的基因修饰涉及掺入和表达至少两种或更多种另外的转基因。在一个实施方案中,在单个第二基因座处掺入和表达两种或更多种另外的转基因。

[0550] 在示例性实施方案中,转基因猪包含至少六种转基因,其中在第一单个基因座(例如,GGTA1)处掺入和表达至少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子的控制下,和(ii)

在至少一个启动子的控制下在第二单个基因座(例如,β4GalNT2或CMAH)处掺入和表达至少两种转基因,并且其中该猪缺乏α1,3半乳糖基转移酶的表达。

[0551] 在第二方面,本发明是源自本发明的第一方面的转基因猪的器官或器官碎片。在示例性实施方案中,器官是肺、肝脏、心脏或胰腺。在示例性实施方案中,器官碎片是肺碎片、肝脏碎片、心脏碎片或胰腺碎片。在第三方面,本发明是源自本发明的第一方面的转基因猪的组织。在示例性实施方案中,组织是上皮组织或结缔组织。在第四方面,本发明是源自本文公开的转基因猪的细胞。在示例性实施方案中,细胞是胰岛细胞。

[0552] 在第五方面,本发明是制备表达至少六种转基因但缺乏α1,3半乳糖基转移酶的表达的转基因猪的方法,其包括(i)在猪基因组内的单个基因座处掺入至少六种转基因,这些转基因在至少三个启动子的控制下,以提供多基因猪基因组;(ii)允许包含多基因猪基因组的细胞成熟为转基因猪。

[0553] 在示例性实施方案中,所述猪基因组是体细胞猪基因组并且所述细胞是猪合子,并且其中猪合子通过体细胞核移植(SCNT)提供并且通过显微注射将多基因猪基因组转移至重建的SCNT合子中。

[0554] 任选地,体细胞基因组和/或多基因猪基因组可以包括一个或更多个另外的基因修饰。在一个实施方案中,至少一个基因修饰选自基因敲除,基因敲入,基因替换,点突变,基因、基因片段或核苷酸的缺失、插入或取代,大基因组插入,或其组合。

[0555] 在示例性实施方案中,猪基因组选自由配子猪基因组、合子猪基因组、胚胎猪基因组或囊胚猪基因组组成的组。任选地,猪基因组或多基因猪基因组包含至少一个另外的基因修饰。在一个实施方案中,至少一个基因修饰选自基因敲除,基因敲入,基因替换,点突变,基因、基因片段或核苷酸的缺失、插入或取代,大基因组插入,或其组合。

[0556] 掺入的方法可以变化。在示例性实施方案中,掺入涉及生物转染、化学转染、物理转染、病毒介导的转导或转化或其组合。在具体实施方案中,掺入涉及细胞质显微注射。在另一个具体实施方案中,掺入涉及原核显微注射。与本发明的第一方面一致,单个基因座可以变化。

[0557] 在示例性实施方案中,单个基因座包括转基因DNA。在具体实施方案中,转基因DNA是包括至少一种多核苷酸修饰酶的一个或更多个识别位点的着陆区。多核苷酸修饰酶可以变化。在某些实施方案中,多核苷酸修饰酶是工程化核酸内切酶、位点特异性重组酶、整合酶或其组合。

[0558] 在一个实施方案中,工程化核酸内切酶是锌指核酸酶、转录激活子样效应核酸酶或成簇规则间隔短回文重复序列/Cas9核酸酶。

[0559] 在一个实施方案中,位点特异性重组酶是λ整合酶、Cre重组酶、FLP重组酶、γ-δ解离酶、Tn3解离酶、ΦC31整合酶、Bxb1整合酶、R4整合酶或其组合。在一个实施方案中,单个基因座是选自GGTA1、CMAH、β4GalNT2、GHR、AAVS1基因座和ROSA26的天然基因座或修饰的基因座。

[0560] 在实施方案中,单个基因座不是GGTA1基因座并且另外的基因修饰包含敲除α1,3半乳糖基转移酶基因。本发明设想作为另外的基因修饰的其他敲除包括猪β4GalNT2基因、CMAH基因、β4GalNT2基因、vWF或其组合的敲除。在示例性实施方案中,至少一个另外的基因修饰涉及掺入和表达至少一种另外的转基因。在某些实施方案中,转基因是人CD46、人HLA-

E、人源化vWF、嵌合猪-人vWF或完全人vWF。在第六方面,本发明是通过本发明的第五方面的方法产生的转基因猪或生产群。

[0561] 在第七方面,本发明是将本发明的转基因猪育种成第二转基因猪的方法,其中第二转基因猪的特征在于一个或更多个基因修饰。在示例性实施方案中,第二转基因猪的特征在于一个或更多个基因修饰,例如基因敲除,基因敲入,基因替换,点突变,基因、基因片段或核苷酸的缺失、插入或取代,大基因组插入,或其组合。

[0562] 在第八方面,本发明是通过本发明的第七方面的方法产生的转基因猪或生产群。

[0563] 在第九方面,本发明提供了用于治疗有需要的受试者的方法,通过将至少一种源自本发明的转基因猪的器官、器官碎片、组织或细胞植入受试者体内。在示例性实施方案中,器官或器官碎片是肺或肺碎片、肾脏或肾脏碎片、肝脏或肝脏碎片、胰腺或胰腺碎片,或其组合。

[0564] 在具体实施方案中,器官是肺。在另一个具体实施方案中,器官碎片是肺碎片。在示例性实施方案中,将肺或肺碎片植入患有晚期肺病的受试者体内。在示例性实施方案中,将肺或肺碎片植入患有与慢性阻塞性肺病(COPD)、特发性肺纤维化(IPD)、囊性纤维化(CF)、α1-抗胰蛋白酶疾病或原发性肺高压相关的晚期肺病的受试者中。在某些实施方案中,该方法涉及向受试者施用一种或更多种另外的治疗剂。一种或更多种治疗剂可以变化。在一个实施方案中,治疗剂是抗排斥反应剂、抗炎剂、免疫抑制剂、免疫调节剂、抗微生物剂和抗病毒剂及其组合。

[0565] 在第十方面,本发明提供了转基因猪,其具有猪vWF基因座的基因修饰,并且缺乏α1,3半乳糖基转移酶的表达。转基因猪可以包含一个或更多个另外的基因修饰。在示例性实施方案中,转基因猪具有猪vWF基因座的基因修饰并且掺入和表达至少六种转基因,并且缺乏α1,3半乳糖基转移酶的表达。

实施例

[0566] 本技术通过以下实施例进一步说明,这些实施例不应被解释为以任何方式进行限制。提供本文的实施例以说明本技术的优点并且进一步帮助本领域普通技术人员制备或使用本技术的组合物和系统。这些实施例决不应被解释为限制本技术的范围,本技术的范围由所附权利要求限定。这些实施例可以包括或并入上述本技术的任何变型、方面或实施方案。上述变型、方面或实施方案还可以各自包括或并入本技术的任何或所有其他变型、方面或实施方案的变型。

[0567] 实施例1:6基因载体的生成

[0568] 载体构建。合成多个双顺反子单元,其由共享单个启动子的、通过2A肽序列连接的两(2)种转基因组成。两种形式的2A序列P2A(66bp)和T2A(55bp)用于连接大量双转基因单元,以允许两个基因由一个启动子共表达。启动子是组成型CAG启动子(CMV增强子、鸡肌动蛋白启动子、兔b-球蛋白内含子1)、内皮特异性猪TBM启动子(pTBMpr)、内皮特异性猪ICAM-2启动子或Tie2内皮特异性增强子与CAG启动子的组合。构建了人转基因对(通过2A序列连接),包括血栓调节蛋白(TBM)、EPCR、CD59、CD47、HO1、CD46和CD55(DAF)。图1A-B和图2A-2H中显示了本发明的载体的示例性实施方案。“靶向臂”(阴影线)位于每个载体的侧翼,“靶向臂”由与期望的载体插入位点处(也带有阴影线)的基因组序列同源的独特DNA序列组成。

CRISPR/Cas9 RNP用于在靶位点切割基因组DNA,以促进同源定向修复(HDR)。如本文所用,载体图中的hCD55与hDAF同义。

[0569] B200载体(SEQ ID NO:11)是包含三个双顺反子单元的多顺反子载体(MCV),并且命名为pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]/CAGpr[hCD47-2A-hHO1]/CAGpr[hCD46-2A-hDAF],用于在CMAH处进行HDR的靶向臂位于其侧翼(图1A-B;图2A)。第一双顺反子单元((pTBMpr)[hTBM-2A-hEPCR])含有经由2A肽与人内皮蛋白C受体(EPCR)cDNA连接的人血栓调节蛋白(TBM)cDNA,并且两种转基因均由猪血栓调节蛋白启动子(pTBMpr)驱动。第二双顺反子单元(CAGpr[hCD47-2A-hHO1])含有经由2A肽与人血红素氧基因1(HO-1)cDNA连接的人分化簇47(CD47)cDNA,并且两种转基因均由CAG启动子(CAGpr)驱动。第三双顺反子单元(CAGpr[hCD46-2A-hDAF])含有经由2A肽与人分化簇55(CD55或DAF)cDNA连接的人分化簇46(CD46)cDNA,并且两种转基因均由CAG启动子(CAGpr)驱动。靶向臂位于B200载体的侧翼,用于在CMAH基因座处进行同源驱动重组(HDR)。

[0570] 为了生成B200载体(SEQ ID NO:11),分两个步骤克隆猪TBM启动子(图1A-B;图2A)。首先(步骤1),使用引物TBM pr 4774F-CCCTCCTTCCCACAAAGCTT(SEQ ID NO:1)、TBMpr 9157R-ACTGGCATTGAGGAAGGTCG(SEQ ID NO:2)从猪基因组扩增猪TBM启动子区的4266bp基因组片段,并且克隆为含有hTBM-2A-hEPCR;CAGpr[hCD47-2A-hHO1](SEQ ID NO:3)的载体(CMAH基因座的HDR靶向臂位于侧翼)中的PshAI/FseI限制性片段。在步骤2中,使用引物TBMpr 738F-CCCACACACAACCAGAGACA(SEQ ID NO:5)、TBMpr 4311R-GTGCAGGTATGTGGCCTCTT(SEQ ID NO:6)从猪基因组扩增pTBM启动子的3267bp基因组片段(步骤1中克隆的片段的上游;(SEQ ID NO:4)),并且作为PshAI片段克隆到步骤1中生成的构建体中。最终载体含有6种基因,其通过将CAGpr[hCD46-2A-hDAF]片段插入来自步骤2的载体的SwaI位点生成。这种设计使我们能够同时使CMAH基因失活并从允许的基因座表达转基因。

[0571] B201载体(SEQ ID NO:12)是包含三个双顺反子单元的MCV,并且命名为PolyA/pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR]/CAGpr[hCD47-2A-hHO1]/CAGpr[hCD46-2A-hDAF],用于在GGTA1/Neo基因座处进行HDR的靶向臂位于其侧翼。(图1A-B;图2B)。在一些情况下,已观察到由内皮特异性猪TBM启动子驱动的转基因的混杂表达。这可能是载体插入活跃转录基因座(如CMAH)的结果。为了解决这个问题,在pTBM启动子的启动子序列上游添加Poly A序列。基因组中的Poly A序列充当活性基因转录的终止子。所以,为了避免对pTBM启动子驱动的人转基因表达产生基因座特异性影响,通过在猪TBM启动子的前面(5')添加牛生长激素(GH)polyA序列,分多个步骤对B200载体进行进一步修饰。此外,用GGTA1/Neo HDR臂替换B200载体的CMAH HDR以生成B201载体。这些修饰促进hTBM和hEPCR转基因的更加可调节的内皮特异性表达。

[0572] B202载体(SEQ ID NO:13)是由两个双顺反子单元(CAGpr[hCD47-2A-hHO1]和CAGpr[hCD46-2A-hDAF]),以及命名为1)PolyA/pTBMpr[hTBM]和2)pEPCRpr[hEPCR]的两个单顺反子单元组成的MCV。用于在GGTA1/Neo处进行HDR的靶向臂位于载体的侧翼(图1A;图2C)。在这个对B200载体的下一次迭代中,猪EPCR启动子被克隆到含有hEPCR/CAGpr[hCD46-P2A-hDAF]构建体的载体中。如本文所用,DAF意指CD55。随后,将含有猪EPCRpr[hEPCR];CAGpr[hCD46-2A-hDAF]的片段插入带有GGTA1/Neo HDR靶向臂的含有PolyA/pTBMpr.hTBM和CAGpr[hCD47-2A-hHO1]的载体的SwaI限制性位点。如本文所用,pTBMpr意指猪

(procine)/猪(pig)血栓调节蛋白启动子。因此,B202载体(SEQ ID NO:13)含有两种人转基因(hTBM和hEPCR),由它们相应的猪启动子序列调节,这允许它们响应于特定刺激而独立表达。该独特的设计允许在一个片段中使用两种不同的内皮特异性启动子,并且人转基因的表达由其相应的猪启动子驱动。

[0573] B209载体(SEQ ID NO:14)是包含三个双顺反子单元的MCV,并且命名为pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-2A-hHO1];CAGpr[hCD46-2A-hDAF],用于在CMAH处进行HDR的靶向臂位于其侧翼(图1A;图2D)。为了在多转基因载体中容纳另外的补体抑制剂,在B200载体中用hCD59替换hCD47。这种独特的设计允许同时使CMAH基因座失活并且从允许的基因座表达转基因。B209具有三种补体抑制剂,而其他载体仅具有两种。另外的序列如表2所示。

[0574] B212载体(SEQ ID NO:7)是包含三个双顺反子单元的MCV,并且命名为pTBM(short)pr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-2A-hHO1];CAGpr[hCD46-2A-hCD47],用于GGTA1/Neo的靶向臂位于其侧翼(图1B;图2E)。B212含有两种补体抑制剂(CD459和CD46),并且CD47置于第三双顺反子中,位于CD46的第二位。hTBM-2A-hEPCR双顺反子的表达由短版本的pTBM启动子(4266bp,如上文B200的步骤1中所述进行克隆)驱动。如图2E所示,hTBM-2A-hEPCR双顺反子由较短版本(4157bp)的pTBM启动子驱动,而不是其他载体中使用的较长版本(7954bp)。已显示pTBM启动子的短版本和长版本之间的hTBM和hEPCR表达水平相似。此外,驱动hTBM-2A-hEPCR的短pTBM启动子已被证明支持狒狒中的异种移植物的长期(>6个月)存活。hCD47转基因被移至第三双顺反子中的第二位置以使其适度表达。

[0575] B214载体(SEQ ID NO:8)是包含三个双顺反子单元的MCV,并且命名为PolyA/pTBMpr[hTBM-2A-hEPCR];CAGpr[hCD59-2A-hHO1];CAGpr[hCD46-2A-hDAF],用于GGTA1/Neo的靶向臂位于其侧翼(图1B;图2F)。与此处描述的其他载体不同,B212缺乏CD47。此外,B214在最末端的5'末端具有PolyA序列,以阻断载体中启动子受上游内源GGTA1启动子的干扰,如B201的更多描述。如图2F所示,B214由与B209中相同的三个双顺反子([hTBM-2A-hEPCR]/CAGpr[hCD59-2A-hHO1]/CAGpr[hCD46-2A-hCD55])组成,并且用于在GGTA1/Neo基因座处(而不是CMAH基因座处)进行HDR的靶向臂位于其侧翼。此外,B214具有5'Poly A序列(如B201中),以最小化上游GGTA1启动子对表达的影响。

[0576] B217载体(SEQ ID NO:9)是包含五个表达单元(U6启动子[GHRgRNA-1]/U6启动子[GHRgRNA-2]/,TRE3G[CAS9]/CAGpr[tTA]/CAGpr[hCD46-2A-hCD55])的MCV,用于在GGTA1/Neo基因座处进行HDR的靶向臂位于其侧翼。B217载体被设计成诱导猪GHR基因的条件敲除。GHRKO猪生长和成熟缓慢。生成B217是为了在猪以正常生长速度生长到期望体型后允许有条件的GHRKO。为了实现该目的,B217含有靶向猪GHR基因的两种组成型表达的sgRNA、组成型表达的四环素反式激活因子(tTA)和四环素/多西环素诱导型CAS9。B217还具有CAG-hCD46-2A-hDAF双顺反子,以促进B217转染细胞的FACS和补体抑制。最后,用于在GGTA1/Neo处进行HDR的靶向臂位于B217的侧翼(图1B;图2G)。

[0577] 如图2G所示,B217被设计为使用诱导型Tet-On系统产生猪GHR的条件敲除。为了实现该目的,两种GHR特异性sgRNA由U6启动子组成型表达。CAG启动子用于驱动四环素控制的反式激活因子(tTA)的组成型表达。CAS9表达由多西环素诱导型tet响应元件(第3代;TRE3G)驱动。此外,B17包括CAG驱动的hCD46-2A-hDAF双顺反子(CAGpr[hCD46-2A-hCD55]),并且用于在GGTA1/Neo基因座处进行HDR的靶向臂位于侧翼。B217载体可以用于从单个基因

座表达补体抑制剂和诱导型GHR敲除系统。

[0578] B217载体提供了制备GHRKO猪的新方法,并且重要的是,克服GHRKO表型的一些局限性。目前,通过在SCNT之前在成纤维细胞中创建缺失突变体来制备GHRKO猪。产生的猪出生时患有GHRKO,因此生长和成熟非常缓慢,这增加了达到适合提供器官的体型和育种性成熟所需的时间。B217载体提供了克服这些局限性的新方法,可以生成出生时带有野生型GHR的猪。然后,可以让猪生长到器官供体体型,然后用四环素/多西环素处理以激活CAS9表达以诱导GHRKO敲除。

[0579] 如图2H所示,表达B217载体的转基因猪的器官将具有GHRKO,从而达到移植后限制器官生长的目的。种猪将不经四环素/多西环素处理,作为GHR野生型猪生长和成熟,并且将B217载体传递给其子代,这些子代可以用作GHRKO器官供体或GHR野生型种猪。B217载体提供了获得具有完整GHR(+/+)的转基因猪用于育种和GHR(-/-)编辑猪用于移植的机会。文献中已经描述了携带GHR敲除的转基因猪的生长缓慢和生殖健康相关问题(Hinrichs et al.,Mol Metab.2018(11)113-128)。B217的使用将产生转基因猪,其中GHR可以在有条件的基础上被敲除,以加速猪的产生,用于猪群扩大和器官提供(图10)。

[0580] 通过喂食四环素/多西环素来诱导GHRKO,以上调TRE3G启动子以表达CAS9,以与GHR sgRNA复合以创建GHRKO。sgRNA与我们在猪成纤维细胞中成功敲除GHR所用的相同。B217将与其他载体(例如上述载体)一起添加至猪中,使猪成为用于器官移植的条件性GHRKO猪。可选地,这些猪可以饲养至成熟(其中GHR仍为野生型)用于育种和畜群扩大。

[0581] 质粒纯化。本公开的六-基因载体是很大的质粒(各自具有至少约30Kb)。六-基因载体的大小给细菌转化、质粒扩增和纯化带来了挑战。由于表达转基因的载体是标准载体(即不是BAC或YAC),因此这种大小的质粒需要对标准质粒纯化方案进行一些独特的改变,以获得高质量的DNA(OD 260/OD280:1.8-2.0),产量为0.5-1mg,浓度为1.0-2.0mg/ml。如果没有这些改变,则不可能制备用于转染的DNA片段。因此,本发明人设计了非常规的新方案来培养和纯化本公开的六-基因载体。用于具有至少30Kb的质粒的新的和改进的纯化标准包括以下步骤。

[0582] 步骤1。在电感受态Stbl4大肠杆菌(Thermofisher Scientific)中进行质粒构建,以使用标准程序提高大质粒的转化效率。从这里开始,开发了新的非标准方案来实现高浓度的DNA转染。由单菌落组成的小量制备培养物生长过夜。根据标准方案,将培养的菌落大规模接种到液体培养物中(200-500ml)。然而,该标准方案始终无法扩增大质粒。因此,开发了新型可选方法。在这种方法中,替代地,将单个小量制备菌落的质粒DNA重新转化到大肠杆菌中,其中12个阳性菌落用于接种4ml起始培养物6小时。

[0583] 步骤2。使用2ml起始培养物接种2升培养物16小时。羧苄青霉素是更稳定的氨苄青霉素类似物,用于过夜培养中的选择,以最小化标准培养条件下经常出现的液体培养基中大质粒的不稳定性。

[0584] 步骤3。收获细菌并测定细菌沉淀物的重量。先前的经验表明,为了在后续步骤中获得良好的质粒产量,需要8克的沉淀物重量。

[0585] 步骤4。按照标准方案(Qiagen质粒纯化手册02/2021,Mega Kit)中的描述,用50ml P1、P2和P3溶液进行碱裂解,并进行修改:裂解后,通过离心和过滤分离碎片,用0.7体积的异丙醇沉淀裂解物,并将沉淀物重新悬浮于TE中。然后,将DNA溶液通过QIAGEN-tip 500柱

(用于极低拷贝质粒纯化的Qiagen方案)。通过限制酶消化模式分析和二代测序对每个纯化质粒进行质量控制。

[0586] 片段分离。为了分离含有的六种人转基因的线性片段(靶向臂位于侧翼),在总体积1.9ml中用限制性内切酶PacI和AsiSI(New England Biolabs)各900单位消化约200mg的纯化的质粒DNA持续5小时。沉淀并重悬于300ul TE后,将消化的质粒上样至8孔1%低熔点琼脂糖凝胶(凝胶尺寸:11'W x 14'L x 0.8'H)中,并通过35伏特电泳分离18-20小时。随后从凝胶切下至少约26Kb的线性片段并使用β-琼脂酶(New England Biolabs)从琼脂糖中纯化DNA。该方法通常产生35-70mg线性片段,浓度为0.5-1.0mg/ul。通过限制性模式分析、琼脂糖电泳中的大小测定和二代测序来确认纯化片段的完整性。通过所有质量控制标准的片段用于后续转染实验。

[0587] 实施例2:基因修饰的成纤维细胞的生成

[0588] 一般方法。将所有修饰引入GGTA1 KO猪胎仔成纤维细胞中,该成纤维细胞源自动物系(例如猪),其中GGTA1通过NeoR插入诱变被敲除。参见Dai et al.,Nat Biotechnol.2002;20:251-5(2002)。使用Lonza 2B或4D系统通过电穿孔进行转染。DNA载体片段与Cripr/Cas9核糖核蛋白颗粒(RNP)共转染,旨在在预期载体整合位点切割基因组DNA,以促进同源定向修复(HDR)。旨在生成插入缺失用于敲除编码非Gal异种抗原(CMAH和B4GalNT2)的基因的其他RNP经常与载体片段共转染,如下所述。在CMAH的情况下,RNP用于促进一个等位基因上的HDR并且在另一个等位基因上生成敲除插入缺失。Crispr/Cas9 RNP还用于敲除生长激素受体基因(GHr)。在一些情况下,为了最小化因大量转染DNA和RNP造成的细胞应激和死亡,在间隔3-4天的两次单独转染中引入试剂,以允许细胞恢复。再培养3-4天以允许载体表达转基因,通过用抗hCD46的抗体染色来富集摄取了片段的细胞。使用BD FACSAria细胞分选仪收集hCD46染色阳性的细胞,以有限稀释接种到10cm板中,并培养10-14天。然后,选择由单细胞克隆(SCC)组成的集落进行扩增和DNA分析。经确认符合预期设计的集落用于通过体细胞核移植(SCNT)来培育猪。

[0589] B200载体的转染。使用Lonza2B系统用GHR01和B4GalRNP转染胎仔成纤维细胞,以敲除GHR和β4GalNT2基因。三天后,再次转染细胞,这次使用B200载体片段和CMAHRNP(图2A)。再过三天,用hCD46抗体对细胞进行染色,并通过FACS收集阳性细胞,进行SCC,筛选以确认预期的修饰,并用于SCNT(表3)。总共出生67只猪,其中17只存活并具有正确的预期基因型(表4)。

[0590] 表3使用B200生成SCC

[0591]

	集落		
细胞系	SCC数量	基因分型数量	用于NT的数量
A5882-11	67	18	4
A4991-13	56	4	1
总计	123	22	5

[0592] 表4:使用B200生成猪

[0593]

		#受体		出生	
	#胚胎	ET	产仔	总计	存活
种源*	5312	28	11	43	13
重新克隆*	2428	13	5	24	4
总计	7740	41	16	67	17

[0594] 种源*是指直接从B200修饰的成纤维细胞克隆的第一代猪;并且重新克隆*是指从第一代B200猪克隆的猪

[0595] 转染B201载体生成8基因猪。为了生成具有八个修饰(包括GGTA1KO、β4GalNT2KO和B201的六种转基因)的猪,使用Lonza2B系统用B201片段和RNP转染胎仔成纤维细胞以敲除β4GalNT2基因。三天后,细胞用hCD46抗体染色,通过FACS富集,进行SCC,筛选以确认预期修饰,并用于SCNT。

[0596] 转染B201载体生成9基因猪。为了生成具有九个修饰的猪,包括GGTA1KO、β4GalNT2KOGHRKO(但缺乏CMAHKO)以及B201的六种转基因,使用Lonza4d系统用B201片段和生长激素(GHR)以及β4GalNT2RNP转染胎仔成纤维细胞,以敲除GHR和β4GalNT2基因。四天后,细胞用hCD46抗体染色并通过FACS富集,进行SCC,筛选以确认预期修饰,并用于SCNT。

[0597] 转染B201载体生成10基因猪。使用Lonza4d系统用B201片段和GHR以及β4GalNT2RNP转染胎仔成纤维细胞,以敲除GHR和β4GalNT2基因。三天后,使用Lonza2b系统用CMAHRNP转染细胞(图2B)。三天后,细胞用hCD46抗体染色并通过FACS富集,进行SCC,筛选以确认预期修饰,并用于SCNT。

[0598] B201的8、9和10个基因修饰的转染结果显示在表5中。总共76只猪出生时具有8、9和10个基因修饰,其中15只存活并具有正确的预期基因型(表6)。

[0599] 表5.使用B201生成SCC。数据包括具有8、9和10个基因修饰的SCC。

[0600]

	集落		
细胞系	SCC数量	基因分型数量	用于NT的数量
A5882-11	48	16	5
A4991-13	28	2	1
A366-2	28	4	1
总计	104	22	7

[0601] 表6.使用B201生成猪

[0602]

		#受体		出生	
	#胚胎	ET	产仔	总计	存活
种源	5951	32	14	76	15

[0603] B202载体的转染。使用Lonza2B系统用B202片段以及GHR、β4GalNT2和CMAHRNP转染胎仔成纤维细胞,以敲除GHR、β4GalNT2和CMAH的基因(图2C)。转染四天后,用抗CD46的抗体对细胞进行染色,并通过FACS富集,进行SCC,筛选以确认预期的修饰,并用于SCNT(表7)。总共出生17只猪,其中1只存活并具有正确的预期基因型(表8)。

[0604] 表7.使用B202生成SCC

[0605]

	集落		
细胞系	SCC数量	基因分型数量	用于NT的数量
A5882-11	18	6	3
A80-4:6	185	28	3
E421:4	60	15	1
总计	263	49	7

[0606] 表8.使用B202生成猪

[0607]

		#受体		出生	
	#胚胎	ET	产仔	总计	存活
种源	7343	41	8	17	1

[0608] B209载体的转染。使用Lonza2B系统用B209片段以及CMAH和β4GalNT2RNP转染胎仔成纤维细胞,以促进B209的HDR进入CMAH,并敲除CMAH和β4GalNT2基因。三天后,用hCD46抗体对细胞进行染色并通过FACS富集,进行SCC,筛选以确认预期的修饰。筛选集落并使用Lonza2B系统用GHRRNP转染具有预期设计的集落,以敲除GHR基因(图2D)。来自该转染的细胞没有进行GHRKO筛选,而是直接用于SCNT(表9)。总共出生23只猪,其中10只存活并具有正确的预期基因型(表10)。

[0609] 表9.用B209生成SCC

[0610]

	集落		
细胞系	SCC数量	基因分型数量	用于NT的数量
A5882-11	18	6	3
A80-4:6	185	28	3
E421:4	60	15	1
总计	263	49	7

[0611] 表10.用B209生成猪

[0612]

		#受体		出生	
	#胚胎	ET	产仔	总计	存活
种源	3510	19	5	23	10

[0613] 转染B212载体生成9基因猪。B212靶向Revivicor的GGTA1基因敲除猪中GGTA1基因座内的Neo序列。使用Lonza2B系统用B212片段转染三重敲除成纤维细胞(TKO;GGTA1KO、CMAHKO、βGalNT2KO)。三天后,用hCD46抗体对细胞进行染色并通过FACS富集,进行SCC,筛选以确认预期修饰,并用于SCNT。

[0614] 转染B212载体生成10基因猪。使用Lonza2B系统用B212片段转染四重敲除(QKO;GGTA1KO、CMAHKO、βGalNT2KO、GHRKO)成纤维细胞。三天后,用hCD46抗体对细胞进行染色并通过FACS富集,进行SCC,筛选以确认预期修饰,并用于SCNT。使用B212的9个和10个基因修饰的转染结果显示在表11中。总共39只猪出生时具有9个和10个基因修饰,其中15只存活并具有正确的预期基因型(表12)。总共出生39只猪,其中16只存活并具有正确的预期基因型。

[0615] 表11.用B212生成SCC。数据包括具有9个和10个基因修饰的SCC。

[0616]

	集落		
细胞系	SCC数量	基因分型数量	用于NT的数量
A366-2	46	13	6
63D:5	21	8	4
总计	67	21	10

[0617] 表12.使用B209生成猪

[0618]

		#受体		出生	
	#胚胎	ET	产仔	总计	存活
种源	2650	14	7	39	16

[0619] 实施例3:筛选细胞集落的基因型

[0620] 单细胞克隆集落的表征通过用于靶向和转基因分析的PCR、用于估计载体拷贝数的数字滴式PCR和用于基因敲除的插入缺失分析的基因组测序分析来完成。在96孔板中扩增约2000个细胞的单细胞克隆集落。通过向每个孔/样品中添加5μl裂解液来获得用于靶向、转基因和数字滴式PCR以及用于NextGen(MiSeq)测序分析的DNA。该板在65℃下循环10分钟,并在95℃下循环10分钟。对于靶向PCR、数字PCR和测序测定,各取出1μl裂解液。

[0621] 靶向(5'和3')PCR扩增跨越每个指定或靶向基因座处的HDR载体靶向位点的序列。靶向PCR测定设计利用与靶向载体外部、侧翼基因组序列中的基因组序列同源的一种PCR引物,以及与靶向载体中的序列同源的另一PCR引物。在电泳后在琼脂糖凝胶上观察时,该设计的测定识别靶向的集落。然后,通过数字滴式PCR分析正确靶向的集落,以估计载体中每个单独转基因的拷贝数。然后,对具有预期转基因拷贝数的靶向的集落进行适当的MiSeq分析,以识别插入缺失并确认指定的敲除(KO)编辑。

[0622] 实施例4:包含至少6种转基因的多转基因动物的生成

[0623] 体细胞核移植。根据Giraldo et al.Methods MolBiol.885:105-23(2012)详细描述的方法,通过SCNT由转基因成纤维细胞生成活猪。

[0624] 筛选仔猪的基因型。使用从尾猪活组织活检提取的DNA,通过如上所述针对细胞集落的靶向和转基因PCR分析、数字拷贝数PCR分析和基因组测序分析来进行转基因动物的基因型表征。此外,进行Southern印迹以确认完整载体的靶向性以及不存在随机整合。总体上,这些方法识别并确认靶向载体整合在靶向的等位基因处,载体是完整的,并且构建体没有另外地随机整合至基因组中。

[0625] 人转基因在猪组织中的表达。通过western印迹(图3A-C)和免疫组化染色(图7A-7E、图8A-8B、图9和图10)证实了来自每种载体的所有人转基因在心脏、肺和肾脏样品中的表达。图7A-7E、图8A-8B、图9和图10各自显示通过免疫组化针对转基因表达染色的组织切片。将新鲜组织样品固定在多聚甲醛中,包埋在石蜡块中,在切片机上切割,并固定在载玻片上。使用对转基因表达的每种蛋白具有人特异性的一抗来探测切片,然后使用与辣根过氧化物酶缀合的适当的二抗进行探测。用二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)可视化抗体结合蛋白,如棕色染色所示。每次染色运行中均包括阳性对照(先前已验证转基因表达的组织)和阴性对照(未用一抗处理),但这些未包括在图中。

[0626] 实施例5:猪组织中表达的人蛋白的功能分析

[0627] 使用补体依赖性细胞毒性(CDC)测定表征hCD46/hDAF功能。超急性排斥反应(HAR)几乎在未受保护的器官异种移植后立即发生。HAR是异种抗体与异种抗原结合、随后补体蛋白结合并激活以及细胞裂解的结果。补体抑制剂hCD46和hDAF的表达是在异种移植器官中阻断HAR的有效手段。因此,为了评估本公开的多顺反子载体系统的有效性,进行补体依赖性细胞毒性(CDC)测定以评估转基因hCD46和hDAF抑制猪主动脉内皮细胞(pAEC)中的人补体级联的能力。人血清(从三个供体合并)在培养基中稀释并应用于培养的pAEC。一小时后,将兔补体和Cytotox Red试剂添加至培养物中,Cytotox Red试剂在进入补体裂解的细胞后发出红色荧光。使用BioTek Cytation™5酶标仪对细胞进行成像和计数。细胞毒性百分比被读取为红细胞数/总细胞数×100(图4)。如图4和表1所示,在该测定中转基因hCD46和hDAF的表达几乎消除了补体诱导的细胞毒性。

[0628]

表 1:图 4 的 CDC 测定的定量

细胞系	血清处理	未处理
GTKO (n=1)	87.74[a]	1.52[b]
B200 (n=3)	3.73 ± 2.27[b]	2.22 ± 1.87[b]
B201 (n=4)	3.44 ± 2.06[b]	1.79 ± 2.57[b]
B202 (n=4)	2.24 ± 0.51[b]	.62 ± 0.57[b]

[0629] 使用激活蛋白C(APC)测定表征hTBM/hEPCR功能。血栓调节蛋白和EPCR是血管内皮细胞管腔表面的膜蛋白。在止血条件下,TBM与循环凝血酶结合形成TBM:凝血酶复合物,该复合物激活蛋白C以维持抗凝状态。虽然猪TBM可以结合人凝血酶,但pTBM:人凝血酶复合物是人蛋白C的较差激活剂。hTBM在猪器官中的转基因表达克服了这种不相容性并防止异种移植器官的移植后血栓形成。hEPCR的表达进一步增强蛋白C的激活,以维持抗血栓状态。

[0630] 因此,进行激活蛋白C(APC)测定,以评估转基因hTBM和hEPCR激活人蛋白C的能力。原代猪主动脉内皮细胞(pAEC)分离自B200、B201和B202转基因猪和GTKO(GGTA1KO,对照)猪。人内皮细胞系作为阳性对照。使用人激活蛋白C在测定当天新鲜制备标准曲线。每个测试孔中加入凝血酶和蛋白C,孵育1h,用水蛭素终止反应。然后,将等分试样转移至APC标准曲线板,将ChromogenixS-2366底物添加至所有孔中,立即在405nm处对其读数。将测定结果归一化至nMAPC/mg蛋白以用于最终分析(图5)。如图5所示,在该测定中,与GTKO对照相比,在B200、B201和B202pAEC中表达的转基因hTBM和hEPCR显著提高了APC水平。

[0631] 通过细胞凋亡测定表征hHO1功能。血红素蛋白在器官移植过程中缺血再灌注后释放,其中它们可以诱导移植器官发生细胞凋亡损伤。血红素加氧酶-1(HO-1)响应血红素蛋白而表达,并保护细胞免受血红素诱导的细胞凋亡。进行细胞凋亡测定以评估猪细胞表达的转基因hHO1的抗细胞凋亡功能。来自B201转基因猪和GTKO猪的原代pAEC用于半胱天冬酶3/7细胞凋亡测定。pAEC生长过夜至汇合,除了4uM半胱天冬酶-3/7Green检测试剂外,还将200uM氯化血红素应用于每个处理的培养孔。使用BioTekCytation™5酶标仪对细胞进行成像和计数。半胱天冬酶3/7+细胞百分比计算为绿色荧光细胞数/亮视野细胞总数×100。如图6所示,转基因hHO1提供了针对氯化血红素诱导的细胞凋亡的显著保护。

[0632] 用于本公开的发明的另外的方法可见于WO2017/044864,其通过引用以其全文并入。

[0633] 实施例6:B200支持移植至狒狒的猪心脏的长期存活

[0634] 将表达10个基因修饰(包括三种异种抗原基因敲除(GGTA1;CMAH、β4GalNT2)、限制移植后心脏生长的GHR敲除以及由载体B200表达的六种人转基因)的猪心脏移植至狒狒体内,以评价该基因型用于灵长类动物模型中异种移植的能力。心脏取自四月龄的猪,并由在猪到狒狒心脏异种移植方面拥有丰富经验的人心脏移植团队移植至狒狒受体中。通过适当的免疫抑制和术后护理,猪心脏在狒狒体内维持生命126天(表13)。心脏在衰竭前出现心室颤动,但没有观察到器官排斥反应的体征。免疫组化(图8A)表明所有转基因均在死后立即获得的心脏组织中表达。

[0635] 表达B200载体的转基因猪心脏也用于猪到狒狒原位异种心脏移植的临床前测试。狒狒携带猪心存活120天(表13)。通过IHC和western印迹(数据未显示),所有转基因均在外植心脏中表达。

[0636] 这些观察结果表明,B200载体在整个移植后期间在心脏中发挥了预期的功能。

[0637] 实施例7:B200支持移植至人患者体内的猪心脏的长期存活将来自具有与实施例6中的基因型相同的基因型的B200猪的猪心脏移植至人患者体内。该移植是世界上首例猪到人的器官异种移植,由实施例6中的同一团队根据FDA批准的同情使用紧急使用授权方案进行。这名57岁的患者患有终末期心力衰竭,但被认为不适合进行人心脏移植。猪心脏在再灌注时未出现HAR,并且在移植后第34天(图8B)和第50天进行的心肌活组织检查看起来正常并且没有显示抗体或细胞介导的排斥反应的体征。第56天的第三次活检表明抗体(但不是细胞)介导的排斥反应,可能是由于静脉注射免疫球蛋白(IVIG)治疗产生的抗猪抗体所致。尽管此后心脏功能减弱,但仍维持患者生命60天。第34天活组织检查(图8A)和第60天死后样品(图8B)的免疫组化显示所有六种转基因在两个时间点均表达。

[0638] 总之,结果表明基因修饰发挥了预期的作用。除第56天观察到的可能与IVIG有关的情况外,三种异种抗原的敲除以及hCD46和hDAF的转基因表达防止HAR并延迟抗体介导的排斥反应。没有观察到微血管血栓形成,这表明两种抗凝转基因hTBM和hEPCR能够有效维持通过毛细血管和其他小血管的血流。hCD47和hHO-1的表达与不存在细胞介导的排斥反应和炎症一致,表明这些转基因也有助于移植的成功。B200连同四个敲除发挥了预期的作用,维持移植至人患者体内的猪心脏的功能。参见,例如,Griffithetal.,N.Engl,J.Med.387(1):35-44(2022)和Plattet.al.,N.Engl.J.Med.387(1);77-78;以及表13。

[0639] 实施例7:B201在移植至狒狒后支持长期肾脏存活

[0640] 将具有B201、GHRKO和两种异种抗原敲除(GGTA1、β4GalNT2)的猪肾脏移植至狒狒体内,并支持生命长达120天,其中一个移植肾脏在66天时仍在持续运行且功能良好。两名受体的肾脏均未接受HAR,但其中一名受体在第120天时发现了延迟排斥反应的体征。免疫组化表明B201中的所有六种转基因均在移植后第120天获得的死后肾脏组织中表达(图9)。

[0641] 实施例8:B201在移植至狒狒后支持长期心脏存活

[0642] 将两个猪心脏(10个和9个修饰,后者是CMAH的野生型)移植至狒狒受体的异位位置(腹部)。内源性心脏留在原处,因此移植的心脏不用于支持生命。尽管如此,异位模型允许评估心脏的排斥反应、炎症、微血管血栓形成等。10基因心脏存活了118天。尸检时发现排斥反应体征,可能是由于对CMAH敲除导致的新抗原发生暴露和反应。9基因心脏在194天时运行良好,移植后第122天的心脏活检显示没有排斥反应体征。

[0643] 在另外的实验中,携带单拷贝B201载体的转基因猪被用于猪到狒狒异种心脏或异种肾脏移植的大量临床前测试(1个原位心脏、5个异位心脏和2个原位肾脏)。通过IHC和western印迹(数据未显示),所有转基因均在移植的心脏或肾脏中表达。

[0644] 实施例9:B209支持将猪心脏移植至人脑死亡死者的计划短期存活

[0645] 将来自B209猪的两个具有10个基因修饰的猪心脏移植至脑死亡的人受体中。两者均被设计为短期移植,授权时间至多72小时,主要是为了评估心脏是否避免HAR。两个心脏在整个72小时内均表现良好,没有出现HAR、炎症或微血管血栓形成的体征。这表明由B209表达的转基因以及异种抗原敲除可以保护人体内移植的猪心脏免受HAR的影响。免疫组化染色显示所有六种转基因在死后立即获得的心脏组织中表达(图10)。

[0646] 两只在CMAH基因座处携带单拷贝B209载体的转基因猪被用于猪到人(脑死亡受体)异种心脏移植的两个不同的临床前实验。通过IHC和western印迹,所有转基因均在外植心脏中表达。显示了代表性IHC图像(图9)。

[0647]

表 13：表达 B200 或 B201 载体的转基因猪的临床前应用

MCV	移植	持续时间（天）
B201	原位心脏	33
B201	异位心脏	>169（正在进行）
B201	肾脏	131
B201	异位心脏	<1
B201	肾脏	4
B201	异位心脏	113
B201	异位心脏	>8
B201	异位心脏	22
B200	原位心脏	126
B200	心脏	60
B209	心脏	3

B209	心脏	3

[0648]

表 2：序列

SEQ ID NO:	描述	序列
1	引物 TBM pr 4774F	ccctccttcccacaaagctt
2	**引物** TBMpr 9157R	actggcattgaggaaggtcg
5	引物 TBMpr 738F-	cccacacacaaccagagaca
6	引物 TBMpr 4311 R	gtgcaggtatgtggcctctt
11	**B200 载体**	aaatacatcattgcaatgaaaataaatgtttttattaggcagaatccagatgc tcaaggcccttcataatatcccccagtttagtagttggacttagggaacaaa ggaacctttaatagaaattggacagcaagaaagctctagctttagaagaac tcatcaagaagtctgtagaaggcaattctctgggagtcaggggctgcaatg ccatagagcactaggaacctgtctgcccactctccccctagctcttctgcta tgtccctggttgctagggcaatgtcctggtacctgtcagccactcccagcct gccacagtctatgaagccagagaaccttccattttcaaccatgatgttggga aggcaggcatccccatgagtcaccactaggtcctcaccatctggcatgga tgccttgagcctggcaaatagttcagcaggggccaggccctggtgttcttc atccaagtcatcttggtccaccaggccagcctccatcctggttctggccctc tctatcctgtgcttggcctggtggtcaaaggggcaggtggctgggtcaag ggtgtggagtcttctcatggcatcagccatgattgacactttctcagctgga gctaggtgagaggaaaggaggtcctgcccaggcacctcacctagtagga gccagtcccttccagcttctgtgaccacatcaaggacagctgcacagggg accccagttgttgccaaccaggagagtctggcagcctcatcctggagctc attgagagccccactgaggtctgtctttacaaaaaggactggcctgccttg ggctgaaagtctgaaaactgctgcatcagagcaaccaatggtctgctgtgc ccagtcatagccaaacagtctctcaacccaggcagctggagaacctgcat gtaggccatcttgttcaatcatgatggctcctcctgtcaggagaggaaaga gaagaaggttagtacaattgctatagtgagttgtattatactatgcttatgatta attgttaaactagggctgcagggttcatagtgccacttttcctgcactgcccc atctcctgcccaccctttcccaggcatagacagtcagtgacttaccaaactc acaggagggagaaggcagaagcttttgcaaaagcctaggctcatgaga caataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagta ttcaacatttccgtgtcgcccttattccctttttgcggcattttgccttcctgtttt tgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgg gtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttg agagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctg ctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggt cgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacag aaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgcca taaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggag gaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactc

[0649]

gccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacga
gcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactat
taactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggat
ggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctg
gctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtat
cattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatcta
cacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgct
gagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttact
catatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtg
aagatccttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttcc
actgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttt
ttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcg
gtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactgg
cttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagtta
ggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgcta
atcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggt
tggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaac
gggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccga
actgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaag
ggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacagga
gagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcc
tgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcag
gggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggtt
cctggccttttgctggccttttgctcacatggctcgacagatttaattaaacag
tgtgactagggaggcaaaacatacctactaaagggtggtagcataattcag
ttcttatgtgagtatgtgtatgtgtgtgagtatgtgcacatgcacatacatttta
aaaggtctgtaatatactaacatgttcatagtggttacacctagcttataggta
acatttttttcccctgtatccttgtttgtgtttatcaaattttcataacagtaatggt
agaaggagtacctgacatggtaccatacatgctctgggccctgcctaatttc
tcaatttcctttattgcccataccccattgcttgacaagcataagtccatact
ggcttgtttttcgttcctcagactcagtacaccatgtagctccatgccctggg
tctttgtatgtgctatttctactgcttagagtgctattgcccctgaccaccacgt
ggtcagcaacttctcttctgtgtctgtgtccatggtctatgattccagatgtcat
cttcactaactacccttctaatatgcccttccatcccacccgtcctcatcctta
ccccagccactctctatttggtggctctgttttatttttcttcctagctcatcactc
tttgaaatgaacttatttacttattcattatttgcttctttcactagaatgaatgctc
catgagagcagggacctgctttatcttgctcgccactgtattctcagtgccta
gaactacgtctggcacatagtaggtgctcaataaatatcgatcaaatgaaa
gaatgagcaaacgaacaaatgaacaacacgtgaggtaggcatcatgattc
cattcaacagaggagaaaaacagacttaaagaattgaagtggtggagctg
cattttgatcttgactgactccaacatccatgctcttgaccactgtgcatctcc
agagtgtaatgaacatactttacttttatattccaccaaaataacaaagccat
gcccatgttagtagagagttaatcgacagtgcccttaaaatatgcatgcacc
cagggtacaactatgcatgctgccctgtgttttcagttggatccaaatgaatt
gccgtaaacaaagaggggattcaatgtctttgactagtttgggatattttcct
agtaaccaactttgcaaaataaagccactaatgacaaggagctttgttctac
ttctgcatcactcaactgtcaatttttatctcttgcaagacttctaatctactaga
acttttgttttctgtgatttctgaacagagaagactaatccaaaccctgtcatt
ccagaggaatggaaagcccaattcattaaaaccgtcggcgcgttcagcct
aaagctttttctccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagactcat
gtctcctatgtctcatctaaatggatgaggtttgagagttcccatcacggcat

[0650]

		ggtggaaacgaatccgactaggagccataagttcacggcttcgatccctg gcctcgctcaggggttaaggatccggtgttgctgtgagctgtggtgtagg tcacagatgcggttcggatctggcgttgctgcggctgtggtgtaggctggt ggctgtagctccgatttgacccctagcctagggacctccatatgccgtggg tatggccctaaaaagccaaataaaataaaataagtaaatggttgaggtttga cacagaaagtttatttatttatgtatttacttatctttttttttttttttttgtctttct gctatttcttgggctgctcccgcggcatatggaggttcccaggctaggggt cgaattggagctacagccaccagcctacaccacagccgcagcaatgcca gatccgagccgcctctgtgacctacaccacagctcatggcaacgctggat cgttaacccactgagcaagggctgggaccgaacccgcaacctcatggttc ctagtcggattcgttaaccactgcgccatgacgggaactcctacttatctatt ttttaaagcatatggaagttcccaggctagggggttgaatcggagctgcaa ctgccggcttacaccacagccagagcaacgccggatctgagcagtgtct gggacctacaccacagctcacagccacaccggatcctcaatccactgaat gaggccaggaatcaaacctgtgtcctcatggatactagtcagattcatttcc gctgagcaatgacaggaactcctgacacagaaattttagattaaaattgaa gatgagccccttccttttgtacgacctttgtgtgcagattttcgaggataagtc cttgagcttgaagttttagggtcatggatcctcataacagtttcctggcctgtg aggcttggatctcagtataaacagaagtgctggcagcagtagacacagca gcagctgttttcaggaacaaatactgggcacctgccttgtggacctgcctg actccaccactctcttgggtatccacaaagtggacccagaggttcagagca gccctgggatccaaatttttttaatttatttttatctttattttttgtctttcgaaa tttttagggctacacccatgagatatggaggttcccaggctaagggtccaat cggagctacaactgccggcctacaccacagctcatggcaatgctggatcc ttaacccgctgagcgaggccagggatcaaacccacaacctcatgattcct agttggattcgttaaccactgagccacgatgggaactccctgggatgcaaa ttttgtcatctagccctaggatgtagctatcatcctgatttgagaagagaggc agagtctcaggtggcttctctctcatgaatgcagagctaagggtggccaca cgtacttgagttcatccgatgcacacagcattgtgctaaaatattgaccattt ggcccttttgctgacttttggtttgagggatatgaccttcatgagcatacaga ggataatatgtatgcatgtatgcatgtgtgtacacatgtgcgcatgcatgtat atacctgcataattatgtatttgtttatgtatgcaggtgcatgtgtatgtatatat ttattatttatttatttgggggccacacccatgacatttggaagttcctgggac agagattgaatcccagccacagctttgacctacgccatggacacagcaac actggattcttaacccccctgtgccacagcgggaactcctagaagatagtatt tcatgatgatatttgactaaaaataggggtcaggctttgaagtttaaataaatt cgaccagataaatggccatccaggaagttatactttgccttgttcaaatttgg accacggggaaggtggttggcgacatgtaacagaaatctgactccagtgc aggtttcgctcccgtgacgggaagcccagaggtgggcagccctaaggct ggggctctgatttcatgatgctcttagcatcttgagtcccttccctcttcttgct tttatctcagcctcgggctgctgcaccttctgtctttgtggtgagtctacctatt ccacttagctcggcttcagggtgtatttccacgacttcgttagagtaaggttg gggccagctgtgctctgccggcaggaggtgtgcttgcaggggccatgga tgtggccaggacctaatgtgacggtggggagcaggatggggatgaggat gtgaccacagagccttgggaaccacgtcatccacgtcatacactgagagc aggtggttctcatgcaggtgcatcagaatcccgaggacggcttgtccaaa cccagatggctgggcccaagccctgagctcccgatttgggaggccttgg ctgggccccgaaatctgccttcctgactagaccgagtgatgaatggtgttc atagacaagacatacactaacactggtcttgggggctccttgccacaccct gaaggggtccgtgaaactgacggggccagagaaggtgctggttcctcca tggaaggtctcagtgaggccattctgctgcccggctgggtcacgctgggg

[0651]

gagtgagggtgcatcccctcctgggatctggtcaaaggcagattctgattc
tggaagcacggggtagggccagagatgccaccttctaacaagcccccag
gtgaagatgttgacctgggaccttatggtgggggggtggcggagctcaag
gtggcagacacctccctctctctcaacctgtgtcacagcagggccatccta
ctggctctcgctcggccagagatggcgatgccagaacacactggggcag
ggtgtccacatttttgtcacttccactgagccctggggactgactcatttaaat
gacattctcaactctttggaaagaagctgggccagaaatggaaatggcag
caaacacttttgggaaacaggaagccaatttttttttttcaatcatgattttccc
cagattcagagactgcttaactcccaatgaaatacttttagattacgagctaa
aataccgaaaagctgtcaagctcaagaccacaggaaaacagccgaaga
acaaacaccatgagaaaacagtcacagagtgcctctgcggcggatttcaa
gttccagacttccttgctgtcagctgtgtgtacttgtcccgcctgcagtagga
ccagctggggtttaagtctgtaccatggacactgctgccaggattctcctct
gcatctgctgacttccagctcttcagggccagctggccataggagcataaa
ctgacatccagttccaggaggcagcatctgtccccatggcctgcaggaca
ccagatcagtagaggcccccagggccacctttcctgtgggggcccttgaa
gggacccgggaaggctggatcttgctaaagcttccacaagtcccttccaa
aggagagtaaattctaaacagaagcttttgccagtgcttctctgggatctgg
cttcaggattattcctagtctgaaaagtcttcctggtggtttggacacgggca
aatgcttggtgggtgggctggctctggatgcaggtgagtggggtcggaa
gttctccctccttcccacaaagcttgacggagccaggggcacccgcggg
cctgtggatgggagaggggtttctggtgacggactcaagtcttggcagcc
cctgaccccagagcaggctccctccccacagctgctctccgtgagtccttc
acttgcccaagttcaagatgtacccagttctggagctgccaaaccatcctg
catcctgatgtcagccacccaagttctggggtagctggtctgccacccagg
tggatgaaaagaggccacatacctgcaccagcatctgcgaatctctgaag
aacatcaataataaaaagacaactaacccagttaaaacacaggtagagaa
tctgaacagacattcatcggaagaagaattacgactggccaaaaagctcat
aaaaagatggtcaaagtcattggtcagggaaatgtaaatcaaaccgcattg
agataccatctcactccctctcggatggctggaatgaaaaaaaacctcttct
ttcctccctttcattgtcttggcacccttgtggaaattaattgactaaaattcat
gaaatacaaaaatttttaggagttcccgtcgtggctcagtggttaacaaatct
gactaggaaccatgaggtttcaggttcgattcctggcctcactcagtgggtt
agggatctggtgttgccatgagctgtggtgtaggtcacagacgcagctcg
gatcccgcattgctgtggctctggcgtaggccggcggctacagctctgatt
caacctctagcctgggaatagcccaagaaatggcaaaaagaccaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaactcgttttgagcatttttgcatgtgtacattgtccatt
tgtgtgccttccaagatttatttttggagtctcaactctgtcattgatttatgtctc
tccttaggccagaaccacactgttttggtgaccatggctttgtagtaaaattt
gaaatctgaaagtgtgagccctcctgttttgtttctcttctccatgattagtttg
gttattcagagtcccttgaatttccaggtgaattttaggattagcaggaaaatt
tctgcagagatggcagcagagatttttaatagggattatgttgaatctggag
gttaatttcagttttgctaccttgactgtattaagtcttccagtctataagcataa
gatgtctttttatttacttaggtcttttaaaatttctttgggcactcccattgtggt
gcatcggaaatgaatccgactagtatccacaagaacacaggttcaatccct
ggcattgctcagtgggttaaggatcctgcattgccatgaagaactgtggtg
gaggccagcagctgcagctctgatttgacccctagcctgggaacttccata
tgccttgggtatggccctaaaaagcaaactaagtaagtaagtaaataaata
aatgaataaataaaatttctttcaacattgtaattttgtaatttttgtaattttcaga
gcgtacattttgccctttcaatacattattcctacatattttattctttttgatactat
tataaatgaaatttataattaattcatttatatgaatttcattttcaatttgcatattg

[0652]

		ctactacaatagaaatgcacttttaattatttttatggccatactatatatatatg tgtgtgtgtgtgtatgtgtgtcattttactgtacagcagaaattgacacaacat tgtaaatcaactacacttaaaaaatgaagaaataaccacctgtgattatggct actgtgttggacactttaggcatccccccacccgtcccgccccacaccc ctgagtgctagtgacggatgttcccacccaggggggcctggagcctttatca ccagccatcgggaatcagaaccgtatctcacagtccccatgcctggagca cctggaattgtgcccttggactcgtgggtgttctgcttctcagtgggagaag cttaggttctaagtcagagcagggacagcccccatgtgctcaggacccag tgtgaaggggtctgcctcaggggacctgggggttacaagggtaagagaa ggtgttcatgttggaactagaagttctttttcactgctctgaagaaaaaagct gcctcccaccccttggtacagctcttctgctaacagtgaatcaggcagaacg tgttcaagaagtgacccagcctggtgggggccagacctgacccttgatgg tccctcaaccccctccgagggtcccgcccttcctttactgctttgttgtctgtcc tgagaggtttggctaatgtcgaaccaagggtgtggctggtcctgtccccttt cctgtctcacgcacccacctctgaagtctctgtagctggttccagccgggat ctggagccactcccccgccccaggcccagtggtacagactcttgcaga gtcgggggcccctgactcagccccaccgccagcgggatgtcaggccag cacccgccccactcccactgatctgggggggtgtctttccttcctccttcc aaaggagcctcagaccttcctgtggggcacgggggcagtgggattcagg aggctctgagtcagcaggccggcattgaggagtataaagggaccccagt tcctcccccttcacttgtggcttatcgccgccccaccctgccccaaggtca ctgcggtcagtacagtcctcagctgccagcaggtgcctgtctttacttgtga ggccgccacgctctcctgtttctccaggtctgggctctgttggaagtgggg gcccgacccccgggtaagatgggggatctgcgtgtcctgccctcagagg cctcctcctccccgcacccctaacccttcagcccaacaaggctggagatc tcccacatctttggcttcgttaagagttcaacagcgccgccacccggcatgt cgctgagcagaggatggcacagggtgttaaaaaaaaaaaaaaggttgcca cactccgttcggttttgggcccacccttccgcattcctggagcctgagtaag cggataaggctgtgaaagtgacagattcctgccacctccttccagcgctca tgcacagggaccgcccctcttcggtgtcctttgctgcacaagtgcatttgca cattcctgtctcaatctggtttctcccccttaaaagatgggaatgtgacctgct tggagcccctcgcctcgccagggcaccccatccgtcccttcaggggtgg agatggactgtccctctgcaaggctggatgaactcagaccaaacaggcca acttgctccccaaatacgcccacccctaccgggctgcaggaattcgcctgt caccactgctgaagggtgaccttgcagccctgagagcatccccatgactt gcccaccagatgaagtctggttgtggcaggtcgcgctcagggactcccg ggtcccacctgggggtgggaggatcctccttttgctcgtggtcgccccagc cacgccctcctttccaagcgccagtctccagagctccgtgccccggcgga ggcggtctggctctctcctccttgcccctctctccttgcccctagcagcccttc tcctaaaccctctgagcagcgggcacctcctcccgaggccctgggctaag tccccaccttcatctcaagccttcctccttgactccctcttcccagagttcct tgaaataggtggtaagtacacaccgatgacggaaaacaaagactaagag gttaaagagggctgaggattacggccccggtagggctgcgcgcgaggg ggtcgagtggccgggcggtcccgttgccgggcagacagaggtgcggtt ctcccgggcgcctgcgctgccggccccgcccggagccctcccagccgg cgcccagtttactcatcccggagaggtgatcccgggcgcgagggcggg cgcagggcgtccggagaacccagtaatccgagaatgcagcatcagccct tcccaccaggcacttccttccttttcccgaacgtccaggaagggggccg cgcacttataaactcgggccggacccgccggcctgtcagaggctgcctc gctggggctgcgcgcggcggccggacacatctggtccgagaccaacgc gagcgactgtcactggcagctccctgcgcctctcagccccggccgggcc

[0653]

		cctgcgcttggcgtgctgacaccatgcttggggtcctggtccttggcgcgc tggccctggccggcctggggttccccgcacccgcagagccgcagccgg gtggcagccagtgcgtcgagcacgactgcttcgcgctctacccgggccc cgcgaccttcctcaatgccagtcagatctgcgacggactgcggggccac ctaatgacagtgcgctcctcggtggctgccgatgtcatttccttgctactgaa cggcgacggcggcgttggccgccggcgcctctggatcggcctgcagct gccacccggctgcggcgaccccaagcgcctcgggcccctgcgcggctt ccagtgggttacgggagacaacaacaccagctatagcaggtgggcacg gctcgacctcaatggggctcccctctgcggcccgttgtgcgtcgctgtctc cgctgctgaggccactgtgcccagcgagccgatctgggaggagcagca gtgcgaagtgaaggccgatggcttcctctgcgagttccacttcccagccac ctgcaggccactggctgtggagcccggcgccgcggctgccgccgtctc gatcacctacggcaccccgttcgcggcccgcggagcggacttccaggc gctgccggtgggcagctccgccgcggtggctcccctcggcttacagcta atgtgcaccgcgccgcccggagcggtccaggggcactgggccaggga ggcgccgggcgcttgggactgcagcgtggagaacggcggctgcgagc acgcgtgcaatgcgatccctggggctccccgctgccagtgcccagccgg cgccgccctgcaggcagacgggcgctcctgcaccgcatccgcgacgca gtcctgcaacgacctctgcgagcacttctgcgttcccaaccccgaccagc cgggctcctactcgtgcatgtgcgagaccggctaccggctggcggccga ccaacaccggtgcgaggacgtggatgactgcatactggagcccagtccg tgtccgcagcgctgtgtcaacacacagggtggcttcgagtgccactgcta ccctaactacgacctggtggacggcgagtgtgtggagcccgtggacccg tgcttcagagccaactgcgagtaccagtgccagcccctgaaccaaactag ctacctctgcgtctgcgccgagggcttcgcgcccattccccacgagccgc acaggtgccagatgttttgcaaccagactgcctgtccagccgactgcgac cccaacacccaggctagctgtgagtgccctgaaggctacatcctggacga cggtttcatctgcacggacatcgacgagtgcgaaaacggcggcttctgct ccggggtgtgccacaacctccccggtaccttcgagtgcatctgcgggccc gactcggcccttgcccgccacattggcaccgactgtgactccggcaaggt ggacggtggcgacagcggctctggcgagcccccgcccagcccgacgc ccggctccaccttgactcctccggccgtggggctcgtgcattcgggcttgc tcataggcatctccatcgcgagcctgtgcctggtggtggcgcttttggcgct cctctgccacctgcgcaagaagcagggcgccgccagggccaagatgga gtacaagtgcgcggcccccttccaaggaggtagtgctgcagcacgtgcgg accgagcggacgccgcagagactcggatccggagagggcagaggaa gtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatcccggccctatgttgacaa cattgctgccgatactgctgctgtctggctgggccttttgtagccaagacgc ctcagatggcctccaaagacttcatatgctccagatctcctacttccgcgac ccctatcacgtgtggtaccagggcaacgcgtcgctgggggacacctaa cgcacgtgctggaaggcccagacaccaacaccacgatcattcagctgca gcccttgcaggagcccgagagctgggcgcgcacgcagagtggcctgca gtcctacctgctccagttccacggcctcgtgcgcctggtgcaccaggagc ggaccttggcctttcctctgaccatccgctgcttcctgggctgtgagctgcc tcccgagggctctagagcccatgtcttcttcgaagtggctgtgaatgggag ctcctttgtgagtttccggccggagagagccttgtggcaggcagacaccc aggtcacctccggagtggtcaccttcaccctgcagcagctcaatgcctaca accgcactcggtatgaactgcgggaattcctggaggacacctgtgtgcag tatgtgcagaaacatatttccgcggaaaacacgaaagggagccaaacaa gccgctcctacacttcgctggtcctgggcgtcctggtgggcagtttcatcat tgctggtgtggctgtaggcatcttcctgtgcacaggtggacggcgatgttg

[0654]

		agcgcggccgcttccctttagtgagggttaatgcttcgagcagacatgata agatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaa tgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgc aataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggg ggagatgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtaaa atccgataaggatcgatgggacagcccccccccaaagcccccagggat gtaattacgtccctcccccgctagggcagcagcgagccgcccggggctc cggtccggtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcggg gacagcccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaac gcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgggggggatacggggaaa atctagtgggacagcccccccccaaagcccccagggatgtaattacgtcc ctccccgctagggcagcagcgagccgcccggggctccggtccggtcc ggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgg gcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgct ctttgagcctgcagacacctgggggggatacggggaaaaatcgatgggac agcccccccccaaagcccccagggatgtaattacgtccctccccgctag ggcagcagcgagccgcccggggctccggtccggtccggcgctccccc gcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaa ggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctg cagacacctgggggggatacggggaaaatctagtgggacagccccccc caaagcccccagggatgtaattacgtccctccccgctagggcagcagc gagccgcccggggctccggtccggtccggcgctccccgcatccccga gccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaaggtggcacgg gatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgg ggggatacggggaaaaatcgatagcgataaggatccactagttattaata gtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgtta cataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccg cccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggact ttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcag tacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacgg taaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcct acttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatgggtcgaggtga gccccacgttctgcttcactctcccatctccccccctcccccacccccaat tttgtatttatttatttttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggg ggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgaggggcggggcg gggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgct ccgaaagtttccttttatggcgaggcggcggcggcggccctataaaa agcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgttgccttcgccccgtg ccccgctccgcgccgcctcgcgccgcccgccccggctctgactgaccg cgttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctccgggctgt aattagcgcttggtttaatgacggctcgtttcttttctgtggctgcgtgaaagc cttaaagggctccgggagggcccttttgtgcgggggggagcggctcggg gggtgcgtgcgtgtgtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggcccgcg ctgcccggcggctgtgagcgctgcgggcgcggcgcggggctttgtgcg ctccgcgtgtgcgcgaggggagcgcggccgggggcggtgccccgcg gtgcgggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcggggtgtgtg cgtgggggggtgagcaggggtgtgggcgcggcggtcgggctgtaac cccccctgcacccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgg gtgcggggctccgtgcggggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggc gggggtggcggcaggtgggggtgccgggcggggcggggccgcctc gggccggggagggctcgggggaggggcgcggcggccccggagcgc

[0655]

		cggcggctgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgccttttatggtaat cgtgcgagagggcgcagggacttcctttgtcccaaatctggcggagccg aaatctgggaggcgccgccgcaccccctctagcgggcgcgggcgaag cggtgcggcgccggcaggaaggaaatgggcggggagggccttcgtgc gtcgccgcgccgccgtcccttctccatctccagcctcggggctgccgca gggggacggctgccttcgggggggacggggcagggcggggttcggct tctggcgtgtgaccggcggctctagagcctctgctaaccatgttcatgcctt cttctttttcctacagctcctgggcaacgtgctggttgttgtgctgtctcatcat tttggcaaagaattccgctgcgactcggcggagtcccggcggcgcgtcct tgttctaacccggcgcgcccctcaggatgtggcccctggtagcggcgctgtt gctgggctcggcgtgctgcggatcagctcagctactatttaataaaacaaa atctgtagaattcacgttttgtaatgacactgtcgtcattccatgctttgttacta atatggaggcacaaaacactactgaagtatacgtaaagtggaaatttaaag gaagagatatttacacctttgatggagctctaaacaagtccactgtccccac tgactttagtagtgcaaaaattgaagtctcacaattactaaaaggagatgcct ctttgaagatggataagagtgatgctgtctcacacacaggaaactacacttg tgaagtaacagaattaaccagagaaggtgaaacgatcatcgagctaaaat atcgtgttgtttcatggttttctccaaatgaaaatattcttattgttattttcccaat ttttgctatactcctgttctggggacagtttggtattaaaacacttaaatataga tccggtggtatggatgagaaaacaattgctttacttgttgctggactagtgat cactgtcattgtcattgttggagccattcttttcgtcccaggtgaatattcatta aagaatgctactggccttggtttaattgtgacttctacagggatattaatatta cttcactactatgtgtttagtacagcgattggattaacctccttcgtcattgcca tattggttattcaggtgatagcctatatcctcgctgtggttggactgagtctct gtattgcggcgtgtataccaatgcatggccctcttctgatttcaggtttgagta tcttagctctagcacaattacttggactagtttatatgaaatttgtggcttccaa tcagaagactatacaacctcctaggaaagctgtagaggaacccctttaatgc attcaaagaatcaaaaggaatgatgaatgatgaaggatccggagccacga acttctctctgttaaagcaagcaggagacgtggaagaaaaccccggtcct atggagcgtccgcaacccgacagcatgccccaggatttgtcagaggccc tgaaggaggccaccaaggaggtgcacacccaggcagagaatgctgagt tcatgaggaactttcagaagggccaggtgacccgagacggcttcaagctg gtgatggcctccctgtaccacatctatgtggccctggaggaggagattgag cgcaacaaggagagcccagtcttcgcccctgtctacttcccagaagagct gcaccgcaaggctgccctggagcaggacctggccttctggtacgggccc cgctggcaggaggtcatcccctacacaccagccatgcagcgctatgtgaa gcggctccacgaggtggggcgcacagagcccgagctgctggtggccca cgcctacacccgctacctgggtgacctgtctgggggccaggtgctcaaaa agattgcccagaaagccctggacctgcccagctctggcgagggcctggc cttcttcaccttccccaacattgccagtgccaccaagttcaagcagctctac cgctcccgcatgaactccctggagatgactcccgcagtcaggcagaggg tgatagaagaggccaagactgcgttcctgctcaacatccagctctttgagg agttgcaggagctgctgacccatgacaccaaggaccagagcccctcacg ggcaccagggcttcgccagcgggccagcaacaaagtgcaagattctgcc cccgtggagactcccagagggaagcccccactcaacacccgctcccag gctccgcttctccgatgggtccttacactcagctttctggtggcgacagttg ctgtagggctttatgccatgtgagcggcgcgccggcaccggtaccaagct taagagcgctagctggccagacatgataagatacattgatgagtttggaca aaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatg ctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaaca attgcattcattttatgtttcaggttcaggggggaggtgtgggaggtttttttaaa

[0656]

gcaagtaaaacctctacaaatgtggtatggaattggagccccactgtgttca
tcttacagatggaaatactgacattcagaggagttagttaacttgcctaggtg
attcagctaataagtgcaagaaagatttcaatccaaggtgatttgattctgaa
gcctgtgctaatcacattacaccaagctacaacttcatttataaataataagtc
agctttcaagggcctttcaggtgtcctgcacttctacaagctgtgccatttag
tgaacacaaaatgagccttctgatgaagtagtcttttcattatttcagatattag
aacactaaaattcttagctgccagctgattgaaggctgggacaaaattcaa
acatgcatctacaacaatatatatctcaatgttagtctccaaattctattgactt
caactcaagagaatataaagagctagtctttatacactctttaaggtatgatg
ggtcccgatttttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagca
gcgagaagcgttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgccc
gggctgtccccgcacgctgccggctcggggatgcgggggagcgccgg
accggaccggagccccgggcggctcgctgctgccctagcgggggagg
gacgtaattacatccctgggggctttgggggggggctgtcccactagattt
tccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagcg
ttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtcccc
gcacgctgccggctcggggatgcgggggagcgccggaccggaccgg
agccccgggcggctcgctgctgccctagcgggggagggacgtaattac
atccctgggggctttgggggggggctgtcccatcggatcttctagtcctgc
aggagtcaatgggaaaaacccattggagccaagtacactgactcaatagg
gactttccattgggttttgcccagtacataaggtcaatagggggtgagtcaa
caggaaagtcccattggagccaagtacattgagtcaatagggactttccaa
tgggttttgcccagtacataaggtcaatgggaggtaagccaatgggtttttc
ccattactgacatgtatacgcgtcgacgtcggcgcgttcagcctaaagcttt
tttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagc
gttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtccc
cgcacgctgccggctcggggatgcgggggagcgccggaccggaccg
gagccccgggcggctcgctgctgccctagcgggggagggacgtaatta
catccctgggggctttgggggggggctgtccctgcggccgcgaattcgta
atcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccaca
caacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatga
gtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgg
gaaacctgtcgtgccaggggtctagccgcggtctaggaagctttctaggg
tacctctagggatccactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagtt
catagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgc
ctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtat
gttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagt
atttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagt
acgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcc
cagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtc
atcgctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctgcttcactctcccc
atctccccccccctccccaccccaattttgtatttatttatttttaattattttgtg
cagcgatgggggcgggggggggggggcgcgcgccaggcgggggcg
gggcggggcgaggggcggggcggggcgaggcggagaggtgcggc
ggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggc
ggcggcggcggcggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcggg
agtcgctgcgttgccttcgccccgtgccccgctccgcgccgcctcgcgcc
gcccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcg
ggacggcccttctcctccgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggctc
gtttcttttctgtggctgcgtgaaagccttaaagggctccgggagggccctt
tgtgcgggggggagcggctcgggggggtgcgtgcgtgtgtgtgcgtg

[0657]

		gggagcgccgcgtgcggcccgcgctgcccggcggctgtgagcgctgc gggcgcggcgcggggctttgtgcgctccgcgtgtgcgcgaggggagc gcggccgggggcggtgccccgcggtgcgggggggctgcgaggggaa caaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcaggggtgt gggcgcggcggtcgggctgtaacccccccctgcacccccctccccgagt tgctgagcacggcccggcttcgggtgcggggctccgtgcggggcgtgg cgcggggctcgccgtgccgggcgggggggtggcggcaggtgggggtg ccgggcggggcggggccgcctcgggccggggagggctcgggggag gggcgcggcggccccggagcgccggcggctgtcgaggcgcggcgag ccgcagccattgcctttttatggtaatcgtgcgagagggcgcagggacttcc tttgtcccaaatctggcggagccgaaatctgggaggcgccgccgcaccc cctctagcgggcgcgggcgaagcggtgcggcgccggcaggaaggaaa tgggcggggagggccttcgtgcgtcgccgcgccgccgtcccttctccat ctccagcctcggggctgccgcaggggacggctgccttcgggggggac ggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggctctagag cctctgctaaccatgttcatgccttcttcttttttcctacagctcctgggcaacgt gctggttgttgtgctgtctcatcattttggcaaagaattccgctgcgactcgg cggagtcccggcggcgcgtccttgttctaacccggcgcgcccctcaggat ggagcctcccggccgccgcgagtgtccctttccttcctggcgctttcctgg gttgcttctggcggccatggtgttgctgctgtactccttctccgatgcctgtg aggagccaccaacatttgaagctatggagctcattggtaaaccaaaaccct actatgagattggtgaacgagtagattataagtgtaaaaaaggatacttctat atacctcctcttgccacccatactatttgtgatcggaatcatacatggctacct gtctcagatgacgcctgttatagagaaacatgtccatatatacgggatccttt aaatggccaagcagtccctgcaaatgggacttacgagtttggttatcagat gcactttatttgtaatgagggttattacttaattggtgaagaaattctatattgtg aacttaaaggatcagtagcaatttggagcggtaagccccccaatatgtgaaa aggttttgtgtacaccacctccaaaaaataaaaaatggaaaacacacctttag tgaagtagaagtatttgagtatcttgatgcagtaacttatagttgtgatcctgc acctggaccagatccattttcacttattggagagagcacgatttattgtggtg acaattcagtgtggagtcgtgctgctccagagtgtaaagtggtcaaatgtc gatttccagtagtcgaaaatggaaaacagatatcaggatttggaaaaaaatt ttactacaaagcaacagttatgtttgaatgcgataagggtttttacctcgatg gcagcgacacaattgtctgtgacagtaacagtacttgggatcccccagttc caaagtgtcttaaagtgctgcctccatctagtacaaaacctccagctttgagt cattcagtgtcgacttcttccactacaaaatctccagcgtccagtgcctcag gtcctaggcctacttacaagcctccagtctcaaattatccaggatatcctaaa cctgaggaaggaatacttgacagtttggatgtttgggtcattgctgtgattgt tattgccatagttgttggagttgcagtaatttgtgttgtcccgtacagatatctt caaaggaggaagaagaaaggcacatacctaactgatgagacccacaga gaagtaaaatttacttctctcggatccggagccacgaacttctctctgttaaa gcaagcaggagacgtggaagaaaaccccggtcctatgaccgtcgcgcg gccgagcgtgcccgcggcgctgcccctcctcggggagctgccccggct gctgctgctggtgctgttgtgcctgccggccgtgtggggtgactgtggcct tcccccagatgtacctaatgcccagccagctttggaaggccgtacaagtttt cccgaggatactgtaataacgtacaaatgtgaagaaagctttgtgaaaattc ctggcgagaaggactcagtgatctgccttaagggcagtcaatggtcagat attgaagagttctgcaatcgtagctgcgaggtgccaacaaggctaaattct gcatccctcaaacagccttatatcactcagaattattttccagtcggtactgtt gtggaatatgagtgccgtccaggttacagaagagaaccttctctatcacca aaactaacttgccttcagaatttaaaatggtccacagcagtcgaattttgtaa

[0658]

		aaagaaatcatgccctaatccgggagaaatacgaaatggtcagattgatgt accaggtggcatattatttggtgcaaccatctccttctcatgtaacacagggt acaaattatttggctcgacttctagttttgtcttatttcaggcagctctgtccag tggagtgacccgttgccagagtgcagagaaatttattgcccagcaccacc acaaattgacaatggaataattcaaggggaacgtgaccattatggatatag acagtctgtaacgtatgcatgtaataaaggattcaccatgattggagagcac tctatttattgtactgtgaataatgatgaaggagagtggagtggcccaccac ctgaatgcagaggaaaatctctaacttccaaggtcccaccaacagttcaga aacctaccacagtaaatgttccaactacagaagtctcaccaacttctcagaa aaccaccacaaaaaccaccacaccaaatgctcaagcaacacggagtaca cctgtttccaggacaaccaagcattttcatgaaacaaccccaaataaagga agtggaaccacttcaggtactacccgtcttctatctgggcacacgtgtttca cgttgacaggtttgcttgggacgctagtaaccatgggcttgctgacttagg gcgcgccggcaccggtaccaagcttaagagcgctagctggccagacat gataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaa aaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataag ctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttca gggggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtgg tatggaattggagccccactgtgttcatcttacagatggaaatactgacattc agaggagttagttaacttgcctaggtgattcagctaataagtgcaagaaag atttcaatccaaggtgatttgattctgaagcctgtgctaatcacattacaccaa gctacaacttcatttataaataataagtcagctttcaagggcctttcaggtgtc ctgcacttctacaagctgtgccatttagtgaacacaaaatgagccttctgatg aagtagtcttttcattatttcagatattagaacactaaaattcttagctgccagc tgattgaaggctgggacaaaattcaaacatgcatctacaacaatatatatct caatgttagtctccaaattctattgacttcaactcaagagaatataaagagct agtctttatacactctttaaggtatgatatcatctggaaagtaacaaaattgat gcaaatttgaatgaactttatcatggtgtatttacacaatgtgtttcttctccctg caatgtatttctttctctaattccttccatttgatctttcatacacaatctggttctg atgtatgtttttggatgcacttttcaactccaaaagacagagctagttactttc ttcctggtgctccaagcactgtatttgtatctgtattcaagccctttgcaatatt gtactggatcattatttcacctctaggatggcttccccaggcaacttgtgttca cccagagactacattttgtatcttgttgacctttgaacttccaccagtgtctaa aaataatatgtatgcaaaattacttgctatgagaatgtataattaaacaatata aaaaggagaagcaaggagagaaacacaggtgtgtatttgtgtttgtgtgct taaaaggcagtgtggaaaaggaagaaatgccatttatagtgaggagacaa agttatattacctcttatctggcttttaaggagattttgctgagctaaaaatcct atattcatagaaaagccttacctgagttgccaatacctcaattctaaaataca gcatagcaaaactttaacctccaaatcaagcctctacttgaatccttttctga gggatgaataaggcataggcatcaggggctgttgccaatgtgcattagct gtttgcagcctcaccttctttcatggagtttaagatatagtgtattttcccaagg tttgaactagctcttcatttctttatgttttaaatgcactgacctcccacattccct ttttagtaaaatattcagaaataatttatcatctggaaagtaacaaaattgatg caaatttgaatgaactttatcatggtgtatttacacaatgtgtttcttctccctgc aatgtatttctttctctaattccttccatttgatctttcatacacaatctggttctga tgtatgtttttggatgcacttttcaactccaaaagacagagctagttactttctt cctggtgctccaagcactgtatttgtatctgtattcaagccctttgcaatattgt actggatcattatttcacctctaggatggcttccccaggcaacttgtgttcac ccagagactacattttgtatcttgttgacctttgaacttccaccagtgtctaaa aataatatgtatgcaaaattacttgctatgagaatgtataattaaacaatataa aaaggagaagcaaggagagaaacacaggtgtgtatttgtgtttgtgtgctt

[0659]

		aaaaggcagtgtggaaaaggaagaaatgccatttatagtgaggagacaa agttatattacctcttatctggcttttaaggagattttgctgagctaaaaatcct atattcatagaaaagccttacctgagttgccaatacctcaattctaaaatataca gcatagcaaaactttaacctccaaatcaagcctctacttgaatccttttctga gggatgaataaggcataggcatcaggggctgttgccaatgtgcattagct gtttgcagcctcaccttctttcatggagtttaagatatagtgtattttcccaagg tttgaactagctcttcatttctttatgttttaaatgcactgacctcccacattccct ttttagtaaaatattcagaaataatttatcccggcttgtcgacgacggatcatc tggaaagtaacaaaattgatgcaaatttgaatgaactttatcatggtgtattta cacaatgtgtttcttctccctgcaatgtatttctttctctaattccttccatttgatc tttcatacacaatctggttctgatgtatgtttttggatgcacttttcaactccaa aagacagagctagttactttcttcctggtgctccaagcactgtatttgtatctg tattcaagccctttgcaatattgtactggatcattatttcacctctaggatggct tccccaggcaacttgtgttcacccagagactacattttgtatcttgttgaccttt gaacttccaccagtgtctaaaaataatatgtatgcaaaattacttgctatgag aatgtataattaaacaatataaaaaggagaagcaaggagagaaacacag gtgtgtatttgtgtttgtgtgcttaaaaggcagtgtggaaaaggaagaaatg ccatttatagtgaggagacaaagttatattacctcttatctggcttttaaggag attttgctgagctaaaaatcctatattcatagaaaagccttacctgagttgcca atacctcaattctaaaatacagcatagcaaaactttaacctccaaatcaagc ctctacttgaatccttttctgagggatgaataaggcataggcatcaggggct gttgccaatgtgcattagctgtttgcagcctcaccttctttcatggagtttaag atatagtgtattttcccaaggtttgaactagctcttcatttctttatgttttaaatg cactgacctcccacattccctttttagtaaaatattcagaaataatttaaattcg tggaatcccacccagcagacaagtatggctggatattttatataacgtgttta cgcataagttaatatatgctgaatgagtgatttagctgtgaaacaacatgaa atgagaaagaatgattagtaggggtctggagcttattttaacaagcagcctg aaaacagagagtatgaataaaaaaaattaaatacaagagtgtgctattacc aattatgtataatagtcttatacatctaacttcaattccaatcactatatgcttat actaaaaaacgaagtatagagtcaaccttctttgactaacagctcttccctag tcagggacattagcccaagtatagtctttatttttcctggggtaagaaaagaa ggattgggaagtaggaatgcaaagaaataaaaaataattctgtcattgttca aataagaatgtcatctgaaaataaactgccttacatgggaatgctcttatttgt caggtatattaaggaaacaaacatcaaaaatgacccaaatgaactcaaca atcttatcaagaagaattctgaggtggtaacctggaccccaagacctggag ccactcttgatctgggtaggatgctaaaggacgcgatcgcattt
12	**B201 载体**	atgtctcctatgtctcatctaaatggatgaggtttgagagttcccatcacggc atggtggaaacgaatccgactaggagccataagttcacggcttcgatccct ggcctcgctcagggggttaaggatccggtgttgctgtgagctgtggtgtag gtcacagatgcggttcggatctggcgttgctgcggctgtggtgtaggctgg tggctgtagctccgatttgacccctagcctagggacctccatatgccgtgg gtatggccctaaaaagccaaataaaataaaataagtaaatggttgaggtttg acacagaaagtttatttatttatgtatttacttatctttttttttttttttttttgtctt ctgctatttcttgggctgctcccgcggcatatggaggttcccaggctaggg gtcgaattggagctacagccaccagcctacaccacagccgcagcaatgc cagatccgagccgcctctgtgacctacaccacagctcatggcaacgctgg atcgttaacccactgagcaagggctgggaccgaacccgcaacctcatggt tcctagtcggattcgttaaccactgcgccatgacgggaactcctacttatcta ttttttaaagcatatggaagttcccaggctagggggttgaatcggagctgca actgccggcttacaccacagccagagcaacgccggatctgagcagtgtct

[0660]

		gggacctacaccacagctcacagccacaccggatcctcaatccactgaat gaggccaggaatcaaacctgtgtcctcatggatactagtcagattcatttcc gctgagcaatgacaggaactcctgacacagaaattttagattaaaattgaa gatgagccccttccttttgtacgacctttgtgtgcagattttcgaggataagtc cttgagcttgaagttttagggtcatggatcctcataacagtttcctggcctgtg aggcttggatctcagtataaacagaagtgctggcagcagtagacacagca gcagctgttttcaggaacaaatactgggcacctgccttgtggacctgcctg actccaccactctcttgggtatccacaaagtggacccagaggttcagagca gccctgggatccaaatttttttaatttatttttatctttattttttgtcttttcgaaa tttttagggctacacccatgagatatggaggttcccaggctaagggtccaat cggagctacaactgccggcctacaccacagctcatggcaatgctggatcc ttaacccgctgagcgaggccagggatcaaacccacaacctcatgattcct agttggattcgttaaccactgagccacgatgggaactccctgggatgcaaa ttttgtcatctagccctaggatgtagctatcatcctgatttgagaagagaggc agagtctcaggtggcttctctctcatgaatgcagagctaagggtggccaca cgtacttgagttcatccgatgcacacagcattgtgctaaaatattgaccattt ggccctttgctgacttttggtttgagggatatgaccttcatgagcatacaga ggataatatgtatgcatgtatgcatgtgtgtacacatgtgcgcatgcatgtat atacctgcataattatgtatttgtttatgtatgcaggtgcatgtgtatgtatatat ttattatttatttatttgggggccacacccatgacatttggaagttcctgggac agagattgaatcccagccacagctttgacctacgccatggacacagcaac actggattcttaacccccctgtgccacagcgggaactcctagaagatagtatt tcatgatgatatttgactaaaaatagggtcaggctttgaagtttaaataaatt cgaccagataaatggccatccaggaagttatactttgccttgttcaaatttgg accacggggaaggtggttggcgacatgtaacagaaatctgactccagtgc aggtttcgctcccgtgacgggaagcccagaggtgggcagccctaaggct ggggctctgatttcatgatgctcttagcatcttgagtcccttccctcttcttgct tttatctcagcctcgggctgctgcaccttctgtctttgtggtgagtctacctatt ccacttagctcggcttcagggtgtatttccacgacttcgttagagtaaggttg gggccagctgtgctctgccggcaggaggtgtgcttgcaggggccatgga tgtggccaggacctaatgtgacggtggggagcaggatggggatgaggat gtgaccacagagccttgggaaccacgtcatccacgtcatacactgagagc aggtggttctcatgcaggtgcatcagaatcccgaggacggcttgtccaaa cccagatggctgggcccaagccctgagctcccgatttgggaggccttgg ctgggccccgaaatctgccttcctgactagaccgagtgatgaatggtgttc atagacaagacatacactaacactggtcttgggggctccttgccacaccct gaaggggtccgtgaaactgacggggccagagaaggtgctggttcctcca tggaaggtctcagtgaggccattctgctgcccggctgggtcacgctgggg gagtgagggtgcatcccctcctgggatctggtcaaaggcagattctgattc tggaagcacggggtagggccagagatgccaccttctaacaagcccccag gtgaagatgttgacctgggaccttatggtgggggggtggcggagctcaag gtggcagacacctccctctctctcaacctgtgtcacagcagggccatccta ctggctctcgctcggccagagatggcgatgccagaacacactggggcag ggtgtccacatttttgtcacttccactgagccctggggactgactcatttaaat gacattctcaactctttggaaagaagctgggccagaaatggaaatggcag caaacacttttgggaaacaggaagccaatttttttttttcaatcatgattttccc cagattcagagactgcttaactcccaatgaaatacttttagattacgagctaa aataccgaaaagctgtcaagctcaagaccacaggaaaacagccgaaga acaaacaccatgagaaaacagtcacagagtgcctctgcggcggatttcaa gttccagacttccttgctgtcagctgtgtgtacttgtcccgcctgcagtagga ccagctggggtttaagtctgtaccatggacactgctgccaggattctcctct

[0661]

gcatctgctgacttccagctcttcagggccagctggccataggagcataaa
ctgacatccagttccaggaggcagcatctgtccccatggcctgcaggaca
ccagatcagtagaggccccagggccacctttcctgtgggggcccttgaa
gggacccgggaaggctggatcttgctaaagcttccacaagtcccttccaa
aggagagtaaattctaaacagaagcttttgccagtgcttctctgggatctgg
cttcaggattattcctagtctgaaaagtcttcctggtggtttggacacgggca
aatgcttggtgggtgggctggctctggatgcaggtgagtggggtcggaa
gttctccctccttcccacaaagcttgacggagccaggggcacccgcggg
cctgtggatgggagaggggtttctggtgacggactcaagtcttggcagcc
cctgaccccagagcaggctccctccccacagctgctctccgtgagtccttc
acttgcccaagttcaagatgtacccagttctggagctgccaaaccatcctg
catcctgacgtcagccacccaagttctggggtagctggtctgccacccag
gtggatgaaaagaggccacatacctgcaccagcatctgcgaatctctgaa
gaacatcaataataaaaagacaactaacccgattaaaacacaggtagaga
atctgaacagacattcatcggaagaagaattacgactggccaaaaagctc
ataaaaagatggtcaaagtcattggtcagggaaatgtaaatcaaaccgcat
tgagataccatctcactccctctcggatggctggaatgaaaaaaaacctctt
ctttcctccctttcattgtcttggcacccttgtggaaattaattgactaaaattca
tgaaatacaaaaatttttaggagttcccgtcgtggctcagtggttaacaaatc
tgactaggaaccatgaggtttcaggttcgattcctggcctcactcagtgggt
tagggatctggtgttgccatgagctgtggtgtaggtcgcagacgcagctc
ggatcccgcattgctgtggctctggcgtaggccggcggctacagctctga
ttcaacctctagcctgggaatagcccaagaaatggcaaaaagaccaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaactcgttttgagcatttttgcatgtgtacattgtccat
ttgtgtgccttccaagatttatttttggagtctcaactctgtcattgatttatgtct
ctccttaggccagaaccacactgttttggtgaccatggctttgtagtaaaattt
gaaatctgaaagtgtgagccctcctgttttgtttctcttctccatgattagtttg
gttattcagagtcccttgaatttccaggtgaatttttaggattagcaggaaaatt
tctgcagagatggcagcagagatttttaatagggattatgttgaatctggag
gttaatttcagttttgctaccttgactgtattaagtcttccagtctataagcataa
gatgtctttttatttacttaggtcttttaaaatttctttgggcactcccattgtggt
gcatcggaaatgaatccgactagtatccacaagaacacaggttcaatccct
ggcattgctcagtgggttaaggatcctgcattgccatgaagaactgtggtg
gaggccagcagctgcagctctgatttgacccctagcctgggaacttccata
tgccttgggtatggccctaaaaagcaaactaagtaagtaagtaaataaata
aatgaataaataaaatttctttcaaaattgtaattttgtaatttttgtaattttcaga
gtgtacattttgccctttcaatacattattcctacatattttattcttttgatactat
tataaatgaaatttataattaattcatttatatgaatttcattttcaatttgcatattg
ctactacaatagaaatgcacttttttaattatttttatggccataccatatatatat
gtgtgtgtgtgtgtatgtgtgtcattttactgtacagcagaaattgacacaaca
ttgtaaatcaactacacttaaaaaatgaagaaataaccacctgtgattatggc
tactgtgttggacactttaggcatccccccacccgtcccgccccacacc
cctgagtgctagtgacggatgttcccacccaggggggcctggagcctttatc
accagccatcgggaatcagaaccgtatctcacagtccccatgcctgtagc
acctggaattgtgcccttggactcgtgggtgttctgcttctcagtgggagaa
gcttaggttctaagtcagagcagggacagcccccatgtgctcaggaccca
gtgtgaaggggtctgcctcaggggacctgggggttacaagggtaagaga
aggtgttcatgttggaactagaagttctttttcaccgctctgaagaaaaaagc
tgcctcccaccttggtacagctcttctgctaacagtgaatcaggcagaac
gtgttcaagaagtgacccagcctggtgggggccagacctgacccttgatg
gtccctcaaccctccgagggtcccgcccttcctttactgctttgttgtctgtc

[0662]

		ctgagaggtttggctaatgtcgaaccaagggtgtggctggtcctgtcccctt tcctgtctcacgcacccacctctgaagtctctgtagctggttccagccggga tctggagccactccccccgccccaggcccagtggtacagactcttgcaga gtcgggggcccctgactcagccccaccgccagcgggatgtcaggccag cacccgccccactcccactgatctgggggggggtgtctttccttcctccttcc aaaggagcctcagaccttcctgtggggcacgggggcagtgggattcagg aggctctgagtcagcaggccggcattgaggagtataaagggaccccagt tcctcccccctttcacttgtggcttatcgccgccccaccctgccccaaggtca ctgcggtcagtacagtcctcagctgccagcaggtgcctgtctttacttgtga ggccgccacgctctcctgtttctccaggtctgggctctgttggaagtgggg gcccgaccccagggtaagatgggggatctgcgtgtcctgccctcagagg cctcctcctccccgcaccctaacccttcagcccaacaaggctggagatc tcccacatctttggcttcgttaagagttcaacagcgccgccacccggcatgt cgctgagcagaggatggcacagggtgttaaaaaaaaaaaaaaggttgcca cactccgttcggttttgggcccacccttcgcattcctggagcctgagtaag cggataaggctgtgaaagtgacagattcctgccacctccttccagcgctca tgcacagggaccgcccctcttcggtgtcctttgctgcacaagtgcatttgca cattcctgtctcaatctggtttctcccccttaaaagatgggaatgtgacctgct tggagcccctcgcctcgccagggcaccccatccgtcccttcaggggtgg agatggactgtccctctgcaaggctggatgaactcagaccaaacaggcca acttgctccccaaatacgcccacccctaccgggctgcagaaattcgcatgt caccactgctgaagggtgaccttgcagccctgagagcatccccatgactt gcccaccagatgaagtctggttgtggcaggtcgcgctcagggactcccg ggtcccacctgggggtgggaggatcctccttgctcgtggtcgccccaga cacgccctcctttccaagcgccagtctccagagctccgtgccccggcgga ggcggtctggctctctctccttgcccctctctccttgcccctagcagcccttc tcctaaaccctctgagcagcgggcacctcctcccgaggccctgggctaag tccccacccttcatctcaagccttcctccttgactccctcttcccagagttcct tgaaataggtggtaagtacacaccgatgacggaaaacaaagactaagag gttaaagagggctgaggattacggccccggtagggctgcgcgcgaggg ggtcgagtggccgggcggtcccgtcgccgggcagacagaggtgcggtt ctcccgggcgcctgcgctgccggccccgcccggagccctcccagccgg cgcccagtttactcatcccggagaggtgatcccgggcgcgagggcggg cgcagggcgtccggagaacccagtaatccgagaatgcagcatcagccct tcccaccaggcacttccttccttttcccgaacgtccagggaggggggccg cgcacttataaactcgggccggacccgccggcctgtcagaggctgcctc gctggggctgcgcgcggcggccggacacatctggtccgagaccaacgc gagcgactgtcactggcagctccctgcgcctctcagccccggccgggcc cctgcgcttggcgtgctgacaccatgcttggggtcctggtccttggcgcgc tggccctggccggcctggggttccccgcacccgcagagccgcagccgg gtggcagccagtgcgtcgagcacgactgcttcgcgctctacccgggccc cgcgaccttcctcaatgccagtcagatctgcgacggactgcggggccac ctaatgacagtgcgctcctcggtggctgccgatgtcatttccttgctactgaa cggcgacggcggcgttggccgccggcgcctctggatcggcctgcagct gccacccggctgcggcgaccccaagcgcctcgggcccctgcgcggctt ccagtgggttacgggagacaacaacaccagctatagcaggtgggcacg gctcgacctcaatggggctcccctctgcggcccgttgtgcgtcgctgtctc cgctgctgaggccactgtgcccagcgagccgatctgggaggagcagca gtgcgaagtgaaggccgatggcttcctctgcgagttccacttcccagccac ctgcaggccactggctgtggagcccggcgccgcggctgccgccgtctc gatcacctacggcaccccgttcgcggcccgcggagcggacttccaggc

[0663]

		gctgccggtgggcagctccgccgcggtggctcccctcggcttacagcta atgtgcaccgcgccgcccggagcggtccaggggcactgggccaggga ggcgccgggcgcttgggactgcagcgtggagaacggcggctgcgagc acgcgtgcaatgcgatccctggggctccccgctgccagtgcccagccgg cgccgccctgcaggcagacgggcgctcctgcaccgcatccgcgacgca gtcctgcaacgacctctgcgagcacttctgcgttcccaaccccgaccagc cgggctcctactcgtgcatgtgcgagaccggctaccggctggcggccga ccaacaccggtgcgaggacgtggatgactgcatactggagcccagtccg tgtccgcagcgctgtgtcaacacacagggtggcttcgagtgccactgcta ccctaactacgacctggtggacggcgagtgtgtggagcccgtggacccg tgcttcagagccaactgcgagtaccagtgccagcccctgaaccaaactag ctacctctgcgtctgcgccgagggcttcgcgcccattccccacgagccgc acaggtgccagatgttttgcaaccagactgcctgtccagccgactgcgac cccaacacccaggctagctgtgagtgccctgaaggctacatcctggacga cggtttcatctgcacggacatcgacgagtgcgaaaacggcggcttctgct ccggggtgtgccacaacctccccggtaccttcgagtgcatctgcgggccc gactcggcccttgcccgccacattggcaccgactgtgactccggcaaggt ggacggtggcgacagcggctctggcgagcccccgcccagcccgacgc ccggctccaccttgactcctccggccgtggggctcgtgcattcgggcttgc tcataggcatctccatcgcgagcctgtgcctggtggtggcgcttttggcgct cctctgccacctgcgcaagaagcagggcgccgccagggccaagatgga gtacaagtgcgcggcccccttccaaggaggtagtgctgcagcacgtgcgg accgagcggacgccgcagagactcggatccggagagggcagaggaa gtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatcccggccctatgttgacaa cattgctgccgatactgctgctgtctggctgggccttttgtagccaagacgc ctcagatggcctccaaagacttcatatgctccagatctcctacttccgcgac ccctatcacgtgtggtaccagggcaacgcgtcgctgggggacacctaa cgcacgtgctggaaggcccagacaccaacaccacgatcattcagctgca gcccttgcaggagcccgagagctgggcgcgcacgcagagtggcctgca gtcctacctgctccagttccacggcctcgtgcgcctggtgcaccaggagc ggaccttggcctttcctctgaccatccgctgcttcctgggctgtgagctgcc tcccgagggctctagagcccatgtcttcttcgaagtggctgtgaatgggag ctcctttgtgagtttccggccggagagagccttgtggcaggcagacaccc aggtcacctccggagtggtcaccttcaccctgcagcagctcaatgcctaca accgcactcggtatgaactgcgggaattcctggaggacacctgtgtgcag tatgtgcagaaacatatttccgcggaaaacacgaaagggagccaaacaa gccgctcctacacttcgctggtcctgggcgtcctggtgggcagtttcatcat tgctggtgtggctgtaggcatcttcctgtgcacaggtggacggcgatgttg agcgcggccgcttcccttagtgagggttaatgcttcgagcagacatgata agatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaa tgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgc aataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggg ggagatgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtaaa atccgataaggatcgatgggacagccccccccccaaagcccccagggat gtaattacgtccctccccccgctagggcagcagcgagccgcccggggctc cggtccggtccggcgctccccccgcatccccgagccggcagcgtgcggg gacagcccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaac gcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgggggggatacggggaaa atctagtgggacagcccccccccaaagcccccagggatgtaattacgtcc ctcccccgctagggcagcagcgagccgcccggggctccggtccggtcc ggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgg

[0664]

		gcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgct ctttgagcctgcagacacctgggggatacggggaaaaatcgatgggac agccccccccaaagccccagggatgtaattacgtccctcccccgctag ggcagcagcgagccgcccggggctccggtccggtccggcgctccccc gcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaa ggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctg cagacacctgggggatacggggaaaatctagtgggacagcccccccc caaagcccccagggatgtaattacgtccctcccccgctagggcagcagc gagccgcccggggctccggtccggtccggcgctcccccgcatccccga gccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaaggtggcacgg gatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgg ggggatacgggggaaaaatcgatagcgataaggatccactagttattaata gtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgtta cataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccg cccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggact ttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcag tacatcaagtgtatcatatgccaagtacgcccccctattgacgtcaatgacgg taaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcct acttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatgggtcgaggtga gccccacgttctgcttcactctcccatctccccccctcccccacccccaat tttgtatttatttatttttttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggg ggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgaggggcggggcg gggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgct ccgaaagtttccttttatggcgaggcggcggcggcggcgccctataaaa agcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgttgccttcgccccgtg ccccgctccgcgccgcctcgcgccgcccgccccggctctgactgaccg cgttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctccgggctgt aattagcgcttggtttaatgacggctcgtttcttttctgtggctgcgtgaaagc cttaaagggctccgggagggccctttgtgcgggggggagcggctcggg gggtgcgtgcgtgtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggcccgcg ctgcccggcggctgtgagcgctgcgggcgcggcgcggggctttgtgcg ctccgcgtgtgcgcgaggggagcgcggccgggggcggtgccccgcg gtgcgggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcggggtgtgtg cgtgggggggtgagcaggggtgtgggcgcggcggtcgggctgtaac ccccccctgcaccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgg gtgcggggctccgtgcggggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggc gggggggtggcggcaggtgggggtgccgggcggggcggggccgcctc gggccggggagggctcgggggaggggcgcggcggccccggagcgc cggcggctgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgccttttatggtaat cgtgcgagagggcgcagggacttcctttgtcccaaatctggcggagccg aaatctgggaggcgccgccgcaccccctctagcgggcgcgggcgaag cggtgcggcgccggcaggaaggaaatgggcggggagggccttcgtgc gtcgccgcgccgccgtcccctttctccatctccagcctcggggctgccgca gggggacggctgccttcgggggggacggggcagggcggggttcggct tctggcgtgtgaccggcggctctagagcctctgctaaccatgttcatgcctt cttctttttcctacagctcctgggcaacgtgctggttgttgtgctgtctcatcat tttggcaaagaattccgctgcgactcggcggagtcccggcggcgcgtcct tgttctaacccggcgcgcgcctcaggatgtggcccctggtagcggcgctgtt gctgggctcggcgtgctgcggatcagctcagctactatttaataaaacaaa atctgtagaattcacgttttgtaatgacactgtcgtcattccatgctttgttacta atatggaggcacaaaacactactgaagtatacgtaaagtggaaatttaaag

[0665]

		gaagagatatttacacctttgatggagctctaaacaagtccactgtccccac tgactttagtagtgcaaaaattgaagtctcacaattactaaaaggagatgcct ctttgaagatggataagagtgatgctgtctcacacacaggaaactacacttg tgaagtaacagaattaaccagagaaggtgaaacgatcatcgagctaaaat atcgtgttgtttcatggttttctccaaatgaaaatattcttattgttatttcccaat ttttgctatactcctgttctggggacagtttggtattaaaacacttaaatataga tccggtggtatggatgagaaaacaattgctttacttgttgctggactagtgat cactgtcattgtcattgttggagccattcttttcgtcccaggtgaatattcatta aagaatgctactggccttggtttaattgtgacttctacagggatattaatatta cttcactactatgtgtttagtacagcgattggattaacctccttcgtcattgcca tattggttattcaggtgatagcctatatcctcgctgtggttggactgagtctct gtattgcggcgtgtataccaatgcatggccctcttctgatttcaggtttgagta tcttagctctagcacaattacttggactagtttatatgaaatttgtggcttccaa tcagaagactatacaacctcctaggaaagctgtagaggaacccccttaatgc attcaaagaatcaaaaggaatgatgaatgatgaaggatccggagccacga acttctctctgttaaagcaagcaggagacgtggaagaaaaccccggtcct atggagcgtccgcaacccgacagcatgccccaggatttgtcagaggccc tgaaggaggccaccaaggaggtgcacacccaggcagagaatgctgagt tcatgaggaactttcagaagggccaggtgacccgagacggcttcaagctg gtgatggcctccctgtaccacatctatgtggccctggaggaggagattgag cgcaacaaggagagcccagtcttcgcccctgtctacttcccagaagagct gcaccgcaaggctgccctggagcaggacctggccttctggtacgggccc cgctggcaggaggtcatcccctacacaccagccatgcagcgctatgtgaa gcggctccacgaggtggggcgcacagagcccgagctgctggtggccca cgcctacacccgctacctgggtgacctgtctgggggccaggtgctcaaaa agattgcccagaaagccctggacctgcccagctctggcgagggcctggc cttcttcaccttccccaacattgccagtgccaccaagttcaagcagctctac cgctcccgcatgaactccctggagatgactcccgcagtcaggcagaggg tgatagaagaggccaagactgcgttcctgctcaacatccagctctttgagg agttgcaggagctgctgacccatgacaccaaggaccagagcccctcacg ggcaccagggcttcgccagcgggccagcaacaaagtgcaagattctgcc cccgtggagactcccagagggaagcccccactcaacacccgctcccag gctccgcttctccgatgggtccttacactcagctttctggtggcgacagttg ctgtagggctttatgccatgtgagcggcgcgccggcaccggtaccaagct taagagcgctagctggccagacatgataagatacattgatgagtttggaca aaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatg ctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaaca attgcattcattttatgtttcaggttcaggggggaggtgtgggaggttttttaaa gcaagtaaaacctctacaaatgtggtatggaattggagccccactgtgttca tcttacagatggaaatactgacattcagaggagttagttaacttgcctaggtg attcagctaataagtgcaagaaagatttcaatccaaggtgatttgattctgaa gcctgtgctaatcacattacaccaagctacaacttcatttataaataataagtc agctttcaagggcctttcaggtgtcctgcacttctacaagctgtgccatttag tgaacacaaaatgagccttctgatgaagtagtcttttcattatttcagatattag aacactaaaattcttagctgccagctgattgaaggctgggacaaaattcaa acatgcatctacaacaatatatatctcaatgttagtctccaaattctattgactt caactcaagagaatataaagagctagtctttatacactctttaaggtatgatg ggtcccgatttttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagca gcgagaagcgttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgccc gggctgtccccgcacgctgccggctcggggatgcgggggagcgccgg accggaccggagccccgggcggctcgctgctgccctagcgggggagg

[0666]

		gacgtaattacatccctgggggctttgggggggggctgtcccactagattt tccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagcg ttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtcccc gcacgctgccggctcggggatgcgggggagcgccggaccggaccgg agccccgggcggctcgctgctgccctagcgggggagggacgtaattac atccctgggggctttgggggggggctgtcccatcggatcttctagtcctgc aggagtcaatgggaaaaacccattggagccaagtacactgactcaatagg gactttccattgggttttgcccagtacataaggtcaatagggggtgagtcaa caggaaagtcccattggagccaagtacattgagtcaatagggactttccaa tgggttttgcccagtacataaggtcaatgggaggtaagccaatgggttttc ccattactgacatgtatacgcgtcgacgtcggcgcgttcagcctaaagctt tttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagc gttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtccc cgcacgctgccggctcggggatgcgggggagcgccggaccggaccg gagccccgggcggctcgctgctgccctagcgggggagggacgtaatta catccctgggggctttgggggggggctgtccctgcggccgcgaattcgta atcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccaca caacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatga gtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgg gaaacctgtcgtgccaggggtctagccgcggtctaggaagctttctaggg tacctctagggatccactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagtt catagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgc ctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtat gttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagt atttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagt acgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcc cagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtc atcgctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctgcttcactctcccc atctccccccccctccccaccccaattttgtatttatttatttttaattattttgtg cagcgatgggggcgggggggggggggcgcgcgccaggcggggcg gggcggggcgaggggcggggcggggcgaggcggagaggtgcggc ggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggc ggcggcggcggcggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcggg agtcgctgcgttgccttcgccccgtgccccgctccgcgccgcctcgcgcc gcccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcg ggacggcccttctcctccgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggctc gtttcttttctgtggctgcgtgaaagccttaaagggctccgggagggccctt tgtgcgggggggagcggctcgggggggtgcgtgcgtgtgtgtgtgcgtg gggagcgccgcgtgcggcccgcgctgcccggcggctgtgagcgctgc gggcgcggcgcggggctttgtgcgctccgcgtgtgcgcgaggggagc gcggccgggggcggtgccccgcggtgcgggggggctgcgaggggaa caaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcaggggggtgt gggcgcggcggtcgggctgtaacccccccctgcacccccctccccgagt tgctgagcacggcccggcttcgggtgcggggctccgtgcggggcgtgg cgcggggctcgccgtgccgggcgggggggtggcggcaggtgggggtg ccgggcgggggcggggccgcctcgggccggggagggctcgggggag gggcgcggcggcccccggagcgccggcggctgtcgaggcgcggcgag ccgcagccattgcctttttatggtaatcgtgcgagagggcgcagggacttcc tttgtcccaaatctggcggagccgaaatctgggaggcgccgccgcaccc cctctagcgggcgcgggcgaagcggtgcggcgccggcaggaaggaaa tgggcggggagggccttcgtgcgtcgccgcgccgccgtcccttctccat

[0667]

		ctccagcctcggggctgccgcaggggacggctgccttcgggggggac ggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggctctagag cctctgctaaccatgttcatgccttcttctttttcctacagctcctgggcaacgt gctggttgttgtgctgtctcatcattttggcaaagaattccgctgcgactcgg cggagtcccggcggcgcgtccttgttctaacccggcgcgcccctcaggat ggagcctcccggccgccgcgagtgtccctttccttcctggcgctttcctgg gttgcttctggcggccatggtgttgctgctgtactccttctccgatgcctgtg aggagccaccaacatttgaagctatggagctcattggtaaaccaaaaccct actatgagattggtgaacgagtagattataagtgtaaaaaaggatacttctat atacctcctcttgccacccatactatttgtgatcggaatcatacatggctacct gtctcagatgacgcctgttatagagaaacatgtccatatatacgggatccttt aaatggccaagcagtccctgcaaatgggacttacgagtttggttatcagat gcactttatttgtaatgagggttattacttaattggtgaagaaattctatattgtg aacttaaaggatcagtagcaatttggagcggtaagcccccaatatgtgaaa aggttttgtgtacaccacctccaaaaataaaaaatggaaaacacacctttag tgaagtagaagtatttgagtatcttgatgcagtaacttatagttgtgatcctgc acctggaccagatccattttcacttattggagagagcacgatttattgtggtg acaattcagtgtggagtcgtgctgctccagagtgtaaagtggtcaaatgtc gatttccagtagtcgaaaatggaaaacagatatcaggatttggaaaaaaatt ttactacaaagcaacagttatgtttgaatgcgataagggtttttacctcgatg gcagcgacacaattgtctgtgacagtaacagtacttgggatcccccagttc caaagtgtcttaaagtgctgcctccatctagtacaaaacctccagctttgagt cattcagtgtcgacttcttccactacaaaatctccagcgtccagtgcctcag gtcctaggcctacttacaagcctccagtctcaaattatccaggatatcctaaa cctgaggaaggaatacttgacagtttggatgtttgggtcattgctgtgattgt tattgccatagttgttggagttgcagtaatttgtgttgtcccgtacagatatctt caaaggaggaagaagaaaggcacatacctaactgatgagacccacaga gaagtaaaatttacttctctcggatccggagccacgaacttctctctgttaaa gcaagcaggagacgtggaagaaaaccccggtcctatgaccgtcgcgcg gccgagcgtgcccgcggcgctgcccctcctcggggagctgccccggct gctgctgctggtgctgttgtgcctgccggccgtgtggggtgactgtggcct tcccccagatgtacctaatgcccagccagctttggaaggccgtacaagtttt cccgaggatactgtaataacgtacaaatgtgaagaaagctttgtgaaaattc ctggcgagaaggactcagtgatctgccttaagggcagtcaatggtcagat attgaagagttctgcaatcgtagctgcgaggtgccaacaaggctaaattct gcatccctcaaacagccttatatcactcagaattattttccagtcggtactgtt gtggaatatgagtgccgtccaggttacagaagagaaccttctctatcacca aaactaacttgccttcagaatttaaaatggtccacagcagtcgaattttgtaa aaagaaatcatgccctaatccgggagaaatacgaaatggtcagattgatgt accaggtggcatattatttggtgcaaccatctccttctcatgtaacacagggt acaaattatttggctcgacttctagtttttgtcttatttcaggcagctctgtccag tggagtgacccgttgccagagtgcagagaaatttattgcccagcaccacc acaaattgacaatggaataattcaaggggaacgtgaccattatggatatag acagtctgtaacgtatgcatgtaataaaggattcaccatgattggagagcac tctatttattgtactgtgaataatgatgaaggagagtggagtggcccaccac ctgaatgcagaggaaaatctctaacttccaaggtcccaccaacagttcaga aacctaccacagtaaatgttccaactacagaagtctcaccaacttctcagaa aaccaccacaaaaaccaccacaccaaatgctcaagcaacacggagtaca cctgtttccaggacaaccaagcattttcatgaaacaaccccaaataaagga agtggaaccacttcaggtactacccgtcttctatctgggcacacgtgtttca cgttgacaggtttgcttgggacgctagtaaccatgggcttgctgacttagg

[0668]

		gcgcgccggcaccggtaccaagcttaagagcgctagctggccagacat gataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaa aaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataag ctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttca gggggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtgg tatggaattggagccccactgtgttcatcttacagatggaaatactgacattc agaggagttagttaacttgcctaggtgattcagctaataagtgcaagaaag atttcaatccaaggtgatttgattctgaagcctgtgctaatcacattacaccaa gctacaacttcatttataaataataagtcagctttcaagggcctttcaggtgtc ctgcacttctacaagctgtgccatttagtgaacacaaaatgagccttctgatg aagtagtcttttcattatttcagatattagaacactaaaattcttagctgccagc tgattgaaggctgggacaaaattcaaacatgcatctacaacaatatatatct caatgttagtctccaaattctattgacttcaactcaagagaatataaagagct agtctttatacactctttaaggtatgatatcatctggaaagtaacaaaattgat gcaaatttgaatgaactttatcatggtgtatttacacaatgtgtttcttctccctg caatgtatttctttctctaattccttccatttgatctttcatacacaatctggttctg atgtatgttttttggatgcacttttcaactccaaaagacagagctagttactttc ttcctggtgctccaagcactgtatttgtatctgtattcaagccctttgcaatatt gtactggatcattatttcacctctaggatggcttccccaggcaacttgtgttca cccagagactacattttgtatcttgttgacctttgaacttccaccagtgtctaa aaataatatgtatgcaaaattacttgctatgagaatgtataattaaacaatata aaaaggagaagcaaggagagaaacacaggtgtgtatttgtgtttgtgtgct taaaaggcagtgtggaaaaggaagaaatgccatttatagtgaggagacaa agttatattacctcttatctggcttttaaggagattttgctgagctaaaaatcct atattcatagaaaagccttacctgagttgccaatacctcaattctaaaatataca gcatagcaaaactttaacctccaaatcaagcctctacttgaatccttttctga gggatgaataaggcataggcatcaggggctgttgccaatgtgcattagct gtttgcagcctcaccttctttcatggagtttaagatatagtgtattttcccaagg tttgaactagctcttcatttctttatgttttaaatgcactgacctcccacattccct ttttagtaaaatattcagaaataatttatcccggcttgtcgacgacggatcatc tggaaagtaacaaaattgatgcaaatttgaatgaactttatcatggtgtattta cacaatgtgtttcttctccctgcaatgtatttctttctctattccttccatttgatct ttcatacacaatctggttctgatgtatgtttttggatgcacttttcaactccaaa agacagagctagttactttcttcctggtgctccaagcactgtatttgtatctgt attcaagccctttgcaatattgtactggatcattatttcacctctaggatggctt

[0669]

		ccccaggcaacttgtgttcacccagagactacattttgtatcttgttgaccttt gaacttccaccagtgtctaaaaataatatgtatgcaaaattacttgctatgag aatgtataattaaacaatataaaaaggagaagcaaggagagaaacacag gtgtgtatttgtgtttgtgtgcttaaaaggcagtgtggaaaaggaagaaatg ccatttatagtgaggagacaaagttatattacctcttatctggcttttaaggag attttgctgagctaaaaatcctatattcatagaaaagccttacctgagttgcca atacctcaattctaaaatacagcatagcaaaactttaacctccaaatcaagc ctctacttgaatccttttctgagggatgaataaggcataggcatcaggggct gttgccaatgtgcattagctgtttgcagcctcaccttctttcatggagtttaag atatagtgtattttcccaaggtttgaactagctcttcatttctttatgttttaaatg cactgacctcccacattccctttttagtaaaatattcagaaataatttatcccg gcttgtcgacggcgtccgtcgtcaggatcatccatcaggacatagcgttgg ctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcc tcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgccttctatcg ccttcttgacgagttcttctgaggggatcaattctctagagctcgctgatcag cctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtg ccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatga ggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggg gtggggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcaggca tgctggggatgcggtgggctctatggcttctgaggcggaaagaaccagct gggggcgcgcacctcgaccatctccaggatgcctttgatagagctgggtc ctctgcgttcctttaaagtgtttgagatcaagtccgagaagaggtggcaagc gatcgcgacatatttaaatcgcgctagtttaaaatacatcattgcaatgaaaa taaatgtttttattaggcagaatccagatgctcaaggcccttcataatatccc ccagtttagtagttggacttagggaacaaaggaaccttaatagaaattgga cagcaagaaagctctagctttagaagaactcatcaagaagtctgtagaag gcaattctctgggagtcaggggctgcaatgccatagagcactaggaacct gtctgcccactctccccctagctcttctgctatgtccctggttgctagggcaa tgtcctggtacctgtcagccactcccagcctgccacagtctatgaagccag agaaccttccattttcaaccatgatgttgggaaggcaggcatccccatgagt caccactaggtcctcaccatctggcatggatgccttgagcctggcaaatag ttcagcaggggccaggccctggtgttcttcatccaagtcatcttggtccacc aggccagcctccatcctggttctggccctctctatcctgtgcttggcctggt ggtcaaaggggcaggtggctgggtcaagggtgtggagtcttctcatggc atcagccatgattgacactttctcagctggagctaggtgagaggaaaggga ggtcctgcccaggcacctcacctagtaggagccagtcccttccagcttctg tgaccacatcaaggacagctgcacaggggaccccagttgttgccaacca ggagagtctggcagcctcatcctggagctcattgagagccccactgaggt ctgtctttacaaaaaggactggcctgccttgggctgaaagtctgaaaactg ctgcatcagagcaaccaatggtctgctgtgcccagtcatagccaaacagtc tctcaacccaggcagctggagaacctgcatgtaggccatcttgttcaatcat gatggctcctcctgtcaggagaggaaagagaagaaggttagtacaattgc tatagtgagttgtattatactatgcttatgattaattgtcaaactagggctgcag ggttcatagtgccacttttcctgcactgccccatctcctgcccaccctttccc aggcatagacagtcagtgacttaccaaactcacaggagggagaaggcag aagctttttgcaaaagcctaggctcatgagacaataaccctgataaatgctt caataatattgaaaaaggaagagtaccaggtatgagtattcaacatttccgt gtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccaga aacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgg gttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccc cgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcg

[0670]

		gtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcataca ctattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatctta cggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagt gataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaagga gctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgtt gggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacacca cgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaa ctacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggata aagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgc tgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcact ggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacgggga gtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcc tcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttag attgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgat aatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcaga ccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaat ctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgcc ggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagc gcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttca agaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagt ggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagac gatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggggttcgtg cacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagataccta cagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcg gacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgag ggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgc cacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagc ctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgct ggccttttgctcacatggctcgacagatttaattaacaagaccgacctgtcc ggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctgg ccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagcg ggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgt catctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcg gcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcga aacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgat caggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgt tcgccaggctcaaggcgcgcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgac ccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttct ggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggatcgctggcctcgatg gccgtgatacggcctgcaggatcatttgccagccatctgttgtttgcccctc ccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtccttttcctaat aaaatgaggaaattgcatgccggcagcgtgcggggacagcccgggcac ggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttg agcctgcagacacctgggggggatacggggaaaagttagtttaaacgttcg cgatagtatacggcctgcaggatgactttggcctcgatggccgtgccagg gcgtgcccttgggctccccgggcgcggcgattaagacgt
13	**B202 载体**	atcatctggaaagtaacaaaattgatgcaaatttgaatgaactttatcatggt gtatttacacaatgtgtttcttctccctgcaatgtatttctttctctattccttccat ttgatctttcatacacaatctggttctgatgtatgtttttggatgcactttcaac tccaaaagacagagctagttactttcttcctggtgctccaagcactgtatttgt

[0671]

atctgtattcaagccctttgcaatattgtactggatcattatttcacctctagga
tggcttccccaggcaacttgtgttcacccagagactacattttgtatcttgttg
acctttgaacttccaccagtgtctaaaaataatatgtatgcaaaattacttgct
atgagaatgtataattaaacaatataaaaaggagaagcaaggagagaaac
acaggtgtgtatttgtgtttgtgtgcttaaaaggcagtgtggaaaaggaaga
aatgccatttatagtgaggagacaaagttatattacctcttatctggcttttaa
ggagattttgctgagctaaaaatcctatattcatagaaaagccttacctgagt
tgccaatacctcaattctaaaatacagcatagcaaaactttaacctccaaatc
aagcctctacttgaatccttttctgagggatgaataaggcataggcatcagg
ggctgttgccaatgtgcattagctgtttgcagcctcaccttctttcatggagtt
taagatatagtgtattttcccaaggtttgaactagctcttcatttctttatgtttta
aatgcactgacctcccacattccctttttagtaaaatattcagaaataatttatc
ccggcttgtcgacggcgtccgtcgtcaggatcatccatcaggacatagcg
ttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccg
cttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgccttct
atcgccttcttgacgagttcttctgaggggatcaattctctagagctcgctga
tcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccc
cgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaa
atgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggt
ggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcag
gcatgctggggatgcggtgggctctatggcttctgaggcggaaagaacc
agctgggggcgcgcacctcgaccatctccaggatgcctttgatagagctg
ggtcctctgcgttcctttaaagtgtttgagatcaagtccgagaagaggtggc
aagcgatcgcgacatatttaaatcgcgctagtttaaaatacatcattgcaatg
aaaataaatgtttttattaggcagaatccagatgctcaaggcccttcataata
tcccccagtttagtagttggacttagggaacaaaggaaccttttaatagaaat
tggacagcaagaaagctctagctttagaagaactcatcaagaagtctgtag
aaggcaattctctgggagtcaggggctgcaatgccatagagcactaggaa
cctgtctgcccactctccccctagctcttctgctatgtccctggttgctaggg
caatgtcctggtacctgtcagccactcccagcctgccacagtctatgaagc
cagagaaccttccattttcaaccatgatgttgggaaggcaggcatccccat
gagtcaccactaggtcctcaccatctggcatggatgccttgagcctggcaa
atagttcagcaggggccaggccctggtgttcttcatccaagtcatcttggtc
caccaggccagcctccatcctggttctggccctctctatcctgtgcttggcc
tggtggtcaaaggggcaggtggctgggtcaagggtgtggagtcttctcat
ggcatcagccatgattgacactttctcagctggagctaggtgagaggaaa
ggaggtcctgcccaggcacctcacctagtaggagccagtcccttccagct
tctgtgaccacatcaaggacagctgcacaggggaccccagttgttgccaa
ccaggagagtctggcagcctcatcctggagctcattgagagccccactga
ggtctgtctttacaaaaaggactggcctgccttgggctgaaagtctgaaaa
ctgctgcatcagagcaaccaatggtctgctgtgcccagtcatagccaaaca
gtctctcaacccaggcagctggagaacctgcatgtaggccatcttgttcaat
catgatggctcctcctgtcaggagaggaaagagaagaaggttagtacaat
tgctatagtgagttgtattatactatgcttatgattaattgtcaaactagggctg
cagggttcatagtgccacttttcctgcactgccccatctcctgcccacccttt
cccaggcatagacagtcagtgacttaccaaactcacaggagggagaagg
cagaagctttttgcaaaagcctaggctcatgagacaataaccctgataaat
gcttcaataatattgaaaaaggaagagtaccaggtatgagtattcaacatttc
cgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcaccc
agaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacga
gtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttc

[0672]

		gccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggc gcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcat acactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcat cttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatg agtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaa ggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgat cgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgaca ccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggc gaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcg gataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggttta ttgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcag cactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacgg ggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggt gcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactt tagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttt gataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtc agaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcg taatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgttt gccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcag agcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccac ttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttacc agtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaag acgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcg tgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacc tacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaagg cggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacg agggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttc gccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcgga gcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttg ctggccttttgctcacatggctcgacagatttaattaacaagaccgacctgtc cggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctg gccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagc gggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctg tcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgc ggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcg aaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcga tcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactg ttcgccaggctcaaggcgcgcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtga cccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttc tggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggatcgctggcctcgat ggccgtgatacggcctgcaggatcatttgccagccatctgttgtttgcccct cccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtccttccta ataaaatgaggaaattgcatgccggcagcgtgcggggacagcccgggc acggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctct ttgagcctgcagacacctgggggggatacggggaaaagttagtttaaacgtt cgcgatagtatacggcctgcaggatgactttggcctcgatggccgtgcca gggcgtgcccttgggctcccgggcgcggcgattaagacgtatgtctcct atgtctcatctaaatggatgaggtttgagagttcccatcacggcatggtgga aacgaatccgactaggagccataagttcacggcttcgatccctggcctcg ctcaggggttaaggatccggtgttgctgtgagctgtggtgtaggtcacag atgcggttcggatctggcgttgctgcggctgtggtgtaggctggtggctgt

[0673]

agctccgatttgacccctagcctagggacctccatatgccgtgggtatggc
cctaaaaagccaaataaaataaaataagtaaatggttgaggtttgacacag
aaagtttatttatttatgtatttacttatctttttttttttttttttttgtctttctgctatt
tcttgggctgctcccgcggcatatggaggttcccaggctaggggtcgaatt
ggagctacagccaccagcctacaccacagccgcagcaatgccagatcc
gagccgcctctgtgacctacaccacagctcatggcaacgctggatcgtta
acccactgagcaagggctgggaccgaacccgcaacctcatggttcctagt
cggattcgttaaccactgcgccatgacgggaactcctacttatctatttttttaa
agcatatggaagttcccaggctaggggttgaatcggagctgcaactgcc
ggcttacaccacagccagagcaacgccggatctgagcagtgtctgggac
ctacaccacagctcacagccacaccggatcctcaatccactgaatgaggc
caggaatcaaacctgtgtcctcatggatactagtcagattcatttccgctga
gcaatgacaggaactcctgacacagaaattttagattaaaattgaagatga
gccccttccttttgtacgacctttgtgtgcagattttcgaggataagtccttga
gcttgaagttttagggtcatggatcctcataacagtttcctggcctgtgaggc
ttggatctcagtataaacagaagtgctggcagcagtagacacagcagcag
ctgttttcaggaacaaatactgggcacctgccttgtggacctgcctgactcc
accactctcttgggtatccacaaagtggacccagaggttcagagcagccc
tgggatccaaatttttttaatttatttttttatctttttatttttgtctttcgaaatttttta
gggctacacccatgagatatggaggttcccaggctaagggtccaatcgga
gctacaactgccggcctacaccacagctcatggcaatgctggatccttaac
ccgctgagcgaggccagggatcaaacccacaacctcatgattcctagttg
gattcgttaaccactgagccacgatgggaactccctgggatgcaaattttgt
catctagccctaggatgtagctatcatcctgatttgagaagagaggcagag
tctcaggtggcttctctctcatgaatgcagagctaagggtggccacacgta
cttgagttcatccgatgcacacagcattgtgctaaaatattgaccatttggcc
cttttgctgacttttggtttgagggatatgaccttcatgagcatacagaggata
atatgtatgcatgtatgcatgtgtgtacacatgtgcgcatgcatgtatatacct
gcataattatgtatttgtttatgtatgcaggtgcatgtgtatgtatatatttattatt
tatttatttgggggccacacccatgacatttggaagttcctgggacagagat
tgaatcccagccacagctttgacctacgccatggacacagcaacactgga
ttcttaacccccctgtgccacagcgggaactcctagaagatagtatttcatgat
gatatttgactaaaaataggggtcaggctttgaagtttaaataaattcgacca
gataaatggccatccaggaagttatactttgccttgttcaaatttggaccacg
gggaaggtggttggcgacatgtaacagaaatctgactccagtgcaggtttc
gctcccgtgacgggaagcccagaggtgggcagccctaaggctggggct
ctgatttcatgatgctcttagcatcttgagtcccttccctcttcttgcttttatctc
agcctcgggctgctgcaccttctgtctttgtggtgagtctacctattccactta
gctcggcttcagggtgtatttccacgacttcgttagagtaaggttggggcca
gctgtgctctgccggcaggaggtgtgcttgcaggggccatggatgtggc
caggacctaatgtgacggtggggagcaggatggggatgaggatgtgac
cacagagccttgggaaccacgtcatccacgtcatacactgagagcaggtg
gttctcatgcaggtgcatcagaatcccgaggacggcttgtccaaacccag
atggctgggcccaagccctgagctcccgatttgggaggccttggctgggc
cccgaaatctgccttcctgactagaccgagtgatgaatggtgttcatagaca
agacatacactaacactggtcttgggggctccttgccacaccctgaaggg
gtccgtgaaactgacggggccagagaaggtgctggttcctccatggaag
gtctcagtgaggccattctgctgcccggctgggtcacgctgggggagtga
gggtgcatcccctcctgggatctggtcaaaggcagattctgattctggaag
cacggggtagggccagagatgccaccttctaacaagcccccaggtgaag
atgttgacctgggaccttatggtgggggtggcggagctcaaggtggca

[0674]

		gacacctccctctctctcaacctgtgtcacagcagggccatcctactggctc tcgctcggccagagatggcgatgccagaacacactggggcagggtgtcc acatttttgtcacttccactgagccctggggactgactcatttaaatgacattc tcaactctttggaaagaagctgggccagaaatggaaatggcagcaaacac tttttgggaaacaggaagccaatttttttttttcaatcatgattttccccagattca gagactgcttaactcccaatgaaatacttttagattacgagctaaaataccg aaaagctgtcaagctcaagaccacaggaaaacagccgaagaacaaaca ccatgagaaaacagtcacagagtgcctctgcggcggatttcaagttccag acttccttgctgtcagctgtgtgtacttgtcccgcctgcagtaggaccagct ggggtttaagtctgtaccatggacactgctgccaggattctcctctgcatct gctgacttccagctcttcagggccagctggccataggagcataaactgac atccagttccaggaggcagcatctgtccccatggcctgcaggacaccaga tcagtagaggcccccagggccacctttcctgtgggggcccttgaaggga cccgggaaggctggatcttgctaaagcttccacaagtcccttccaaagga gagtaaattctaaacagaagcttttgccagtgcttctctgggatctggcttca ggattattcctagtctgaaaagtcttcctggtggtttggacacgggcaaatg cttggtgggtgggctggctctggatgcaggtgagtggggtcggaagttct ccctccttcccacaaagcttgacggagccaggggcacccgcgggcctgt ggatgggagaggggtttctggtgacggactcaagtcttggcagcccctga ccccagagcaggctccctccccacagctgctctccgtgagtccttcacttg cccaagttcaagatgtacccagttctggagctgccaaaccatcctgcatcct gacgtcagccacccaagttctggggtagctggtctgccacccaggtggat gaaaagaggccacatacctgcaccagcatctgcgaatctctgaagaacat caataataaaaagacaactaacccgattaaaacacaggtagagaatctga acagacattcatcggaagaagaattacgactggccaaaaagctcataaaa agatggtcaaagtcattggtcagggaaatgtaaatcaaaccgcattgagat accatctcactccctctcggatggctggaatgaaaaaaaacctcttctttcct ccctttcattgtcttggcacccttgtggaaattaattgactaaaattcatgaaat acaaaaatttttaggagttcccgtcgtggctcagtggttaacaaatctgacta ggaaccatgaggtttcaggttcgattcctggcctcactcagtgggttaggg atctggtgttgccatgagctgtggtgtaggtcgcagacgcagctcggatcc cgcattgctgtggctctggcgtaggccggcggctacagctctgattcaacc tctagcctgggaatagcccaagaaatggcaaaaagaccaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaactcgttttgagcatttttgcatgtgtacattgtccatttgtgtg ccttccaagatttatttttggagtctcaactctgtcattgatttatgtctctccttа ggccagaaccacactgttttggtgaccatggctttgtagtaaaatttgaaatc tgaaagtgtgagccctcctgttttgtttctcttctccatgattagtttggttattc agagtcccttgaatttccaggtgaattttaggattagcaggaaaatttctgca gagatggcagcagagatttttaatagggattatgttgaatctggaggttaatt tcagttttgctaccttgactgtattaagtcttccagtctataagcataagatgtc ttttttatttacttaggtcttttaaaatttctttgggcactcccattgtggtgcatcg gaaatgaatccgactagtatccacaagaacacaggttcaatccctggcatt gctcagtgggttaaggatcctgcattgccatgaagaactgtggtggaggc cagcagctgcagctctgatttgacccctagcctgggaacttccatatgcctt gggtatggccctaaaaagcaaactaagtaagtaagtaaataaataaatgaa taaataaaatttctttcaaaattgtaattttgtaatttttgtaattttcagagtgtac attttgccctttcaatacattattcctacatattttattcttttgatactattataaat gaaatttataattaattcatttatatgaatttcattttcaatttgcatattgctacta caatagaaatgcacttttaattatttttatggccataccatatatatatgtgtgt gtgtgtgtatgtgtgtcattttactgtacagcagaaattgacacaacattgtaa atcaactacacttaaaaaatgaagaaataaccacctgtgattatggctactgt

[0675]

		gttggacactttaggcatccccccaccccgtccccgccccacacccctga gtgctagtgacggatgttcccacccaggggggcctggagcctttatcacca gccatcgggaatcagaaccgtatctcacagtccccatgcctgtagcacctg gaattgtgcccttggactcgtgggtgttctgcttctcagtgggagaagctta ggttctaagtcagagcagggacagcccccatgtgctcaggacccagtgtg aaggggtctgcctcaggggacctgggggttacaagggtaagagaaggt gttcatgttggaactagaagttctttttcaccgctctgaagaaaaaagctgcc tcccacccttggtacagctcttctgctaacagtgaatcaggcagaacgtgtt caagaagtgacccagcctggtgggggccagacctgacccttgatggtcc ctcaacccctccgagggtcccgcccttccttttactgctttgttgtctgtcctga gaggtttggctaatgtcgaaccaagggtgtggctggtcctgtccccttcct gtctcacgcacccacctctgaagtctctgtagctggttccagccgggatct ggagccactcccccgccccaggcccagtggtacagactcttgcagagt cgggggcccctgactcagccccaccgccagcgggatgtcaggccagca cccgccccactcccactgatctgggggggtgtctttccttcctccttccaa aggagcctcagaccttcctgtggggcacgggggcagtgggattcaggag gctctgagtcagcaggccggcattgaggagtataaagggaccccagttcc tccccctttcacttgtggcttatcgccgccccaccctgccccaaggtcactg cggtcagtacagtcctcagctgccagcaggtgcctgtctttacttgtgaggc cgccacgctctcctgtttctccaggtctgggctctgttggaagtgggggcc cgaccccagggtaagatgggggatctgcgtgtcctgccctcagaggcct cctcctccccgcaccccctaacccttcagcccaacaaggctggagatctcc cacatctttggcttcgttaagagttcaacagcgccgccacccggcatgtcg ctgagcagaggatggcacagggtgttaaaaaaaaaaaaaaggttgccaca ctccgttcggttttgggcccacccttcgcattcctggagcctgagtaagcg gataaggctgtgaaagtgacagattcctgccacctccttccagcgctcatg cacagggaccgcccctcttcggtgtcctttgctgcacaagtgcatttgcaca ttcctgtctcaatctggtttctcccccttaaaagatgggaatgtgacctgcttg gagcccctcgcctcgccagggcaccccatccgtcccttcaggggtggag atggactgtccctctgcaaggctggatgaactcagaccaaacaggccaac ttgctccccaaatacgcccacccctaccgggctgcagaaattcgcatgtca ccactgctgaagggtgaccttgcagccctgagagcatccccatgacttgc ccaccagatgaagtctggttgtggcaggtcgcgctcagggactcccgggt cccacctgggggtgggaggatcctcctttgctcgtggtcgccccagacac gccctcctttccaagcgccagtctccagagctccgtgccccggcggagg cggtctggctctctctccttgcccctctctccttgcccctagcagcccttctcc taaaccctctgagcagcgggcacctcctcccgaggccctgggctaagtcc ccacccttcatctcaagccttcctccttgactccctcttcccagagttccttga aataggtggtaagtacacaccgatgacggaaaacaaagactaagaggtta aagagggctgaggattacggccccggtagggctgcgcgcgaggggggt cgagtggccgggcggtcccgtcgccgggcagacagaggtgcggttctc ccgggcgcctgcgctgccggccccgcccggagccctcccagccggcg cccagtttactcatcccggagaggtgatcccgggcgcgagggcgggcg cagggcgtccggagaacccagtaatccgagaatgcagcatcagcccttc ccaccaggcacttccttcctttcccgaacgtccagggaggggggccgcg cacttataaactcgggccggacccgccggcctgtcagaggctgcctcgct ggggctgcgcgcggcggccggacacatctggtccgagaccaacgcga gcgactgtcactggcagctccctgcgcctctcagccccggccgggcccc tgcgcttggcgtgctgacaccatgcttggggtcctggtccttggcgcgctg gccctggccggcctggggttccccgcacccgcagagccgcagccgggt ggcagccagtgcgtcgagcacgactgcttcgcgctctacccgggccccg

[0676]

		cgaccttcctcaatgccagtcagatctgcgacggactgcggggccaccta atgacagtgcgctcctcggtggctgccgatgtcatttccttgctactgaacg gcgacggcggcgttggccgccggcgcctctggatcggcctgcagctgc cacccggctgcggcgaccccaagcgcctcgggcccctgcgcggcttcc agtgggttacgggagacaacaacaccagctatagcaggtgggcacggct cgacctcaatggggctcccctctgcggcccgttgtgcgtcgctgtctccgc tgctgaggccactgtgcccagcgagccgatctgggaggagcagcagtg cgaagtgaaggccgatggcttcctctgcgagttccacttcccagccacctg caggccactggctgtggagcccggcgccgcggctgccgccgtctcgatc acctacggcaccccgttcgcggcccgcggagcggacttccaggcgctg ccggtgggcagctccgccgcggtggctcccctcggcttacagctaatgtg caccgcgccgcccggagcggtccaggggcactgggccagggaggcg ccgggcgcttgggactgcagcgtggagaacggcggctgcgagcacgc gtgcaatgcgatccctggggctccccgctgccagtgcccagccggcgcc gccctgcaggcagacgggcgctcctgcaccgcatccgcgacgcagtcct gcaacgacctctgcgagcacttctgcgttcccaaccccgaccagccggg ctcctactcgtgcatgtgcgagaccggctaccggctggcggccgaccaa caccggtgcgaggacgtggatgactgcatactggagcccagtccgtgtc cgcagcgctgtgtcaacacacagggtggcttcgagtgccactgctaccct aactacgacctggtggacggcgagtgtgtggagcccgtggacccgtgctt cagagccaactgcgagtaccagtgccagcccctgaaccaaactagctac ctctgcgtctgcgccgagggcttcgcgcccattccccacgagccgcaca ggtgccagatgttttgcaaccagactgcctgtccagccgactgcgacccc aacacccaggctagctgtgagtgccctgaaggctacatcctggacgacg gtttcatctgcacggacatcgacgagtgcgaaaacggcggcttctgctcc ggggtgtgccacaacctccccggtaccttcgagtgcatctgcgggcccga ctcggcccttgcccgccacattggcaccgactgtgactccggcaaggtgg acggtggcgacagcggctctggcgagcccccgcccagcccgacgccc ggctccaccttgactcctccggccgtggggctcgtgcattcgggcttgctc ataggcatctccatcgcgagcctgtgcctggtggtggcgcttttggcgctc ctctgccacctgcgcaagaagcagggcgccgccagggccaagatggag tacaagtgcgcggcccccttccaaggaggtagtgctgcagcacgtgcgga ccgagcggacgccgcagagactctgagcggcctccgtccaggagcctg gctccgtccagtcgacccgggcggccgcttccctttagtgagggttaatgc ttcgagcagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaacta gaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttattt gtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcatttt atgtttcaggttcaggggagatgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacc tctacaaatgtggtaaaatccgataaggatcgatgggacagccccccccc aaagccccccagggatgtaattacgtccctcccccgctagggcagcagcg agccgcccggggctccggtccggtccggcgctcccccgcatccccgag ccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaaggtggcacggg atcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctggg gggatacggggaaaatctagtgggacagccccccccccaaagccccccag ggatgtaattacgtccctcccccgctagggcagcagcgagccgcccggg gctccggtccggtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtg cggggacagcccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctct gaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgggggggatacggg gaaaaatcgatgggacagccccccccccaaagccccccagggatgtaatta cgtccctcccccgctagggcagcagcgagccgcccggggctccggtcc ggtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacag

[0677]

		cccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctc gctgctctttgagcctgcagacacctgggggggatacggggaaaatctagt gggacagccccccccccaaagccccccagggatgtaattacgtccctcccc cgctagggcagcagcgagccgcccggggctccggtccggtccggcgct cccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgggcacgg ggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgag cctgcagacacctgggggggatacggggaaaaatcgatagcgataaggat ccactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatata tggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgc ccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaa cgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaac tgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgcccccctatt gacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgac cttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattacc atgggtcgaggtgagccccacgttctgcttcactctcccccatctcccccccc ctccccaccccccaattttgtatttatttatttttttaattattttgtgcagcgatggg ggcgggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggc gaggggcggggcggggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaat cagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggcggcggcggc ggcggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcg ttgccttcgccccgtgccccgctccgcgccgcctcgcgccgcccgcccc ggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcgggacggccc ttctcctccgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggctcgtttctttttctg tggctgcgtgaaagccttaaagggctccgggagggccctttgtgcgggg gggagcggctcgggggggtgcgtgcgtgtgtgtgtgcgtggggagcgcc gcgtgcggcccgcgctgcccggcggctgtgagcgctgcgggcgcggc gcggggctttgtgcgctccgcgtgtgcgcgaggggagcgcggccgggg ggcggtgccccgcggtgcgggggggctgcgaggggaacaaaggctg cgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcagggggtgtgggcgcgg cggtcgggctgtaacccccccctgcacccccctccccgagttgctgagca cggcccggcttcgggtgcggggctccgtgcggggcgtggcgcggggc tcgccgtgccgggcgggggggtggcggcaggtgggggtgccgggcgg ggcggggccgcctcgggccggggagggctcgggggaggggcgcgg cggccccggagcgccggcggctgtcgaggcgcggcgagccgcagcc attgccttttatggtaatcgtgcgagagggcgcagggacttcctttgtccca aatctggcggagccgaaatctgggaggcgccgccgcacccccctctagc gggcgcgggcgaagcggtgcggcgccggcaggaaggaaatgggcgg ggagggccttcgtgcgtcgccgcgccgccgtcccctctccatctccagc ctcggggctgccgcaggggacggctgccttcgggggggacggggca gggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggctctagagcctctgct aaccatgttcatgccttcttctttttcctacagctcctgggcaacgtgctggtt gttgtgctgtctcatcattttggcaaagaattccgctgcgactcggcggagt cccggcggcgcgtccttgttctaacccggcgcgccctcaggatgtggccc ctggtagcggcgctgttgctgggctcggcgtgctgcggatcagctcagct actatttaataaaacaaaatctgtagaattcacgttttgtaatgacactgtcgt cattccatgctttgttactaatatggaggcacaaaacactactgaagtatacg taaagtggaaatttaaaggaagagatatttacacctttgatggagctctaaa caagtccactgtccccactgactttagtagtgcaaaaattgaagtctcacaa ttactaaaaggagatgcctctttgaagatggataagagtgatgctgtctcac acacaggaaactacacttgtgaagtaacagaattaaccagagaaggtgaa acgatcatcgagctaaaatatcgtgttgtttcatggttttctccaaatgaaaat

[0678]

attcttattgttattttcccaatttttgctatactcctgttctggggacagtttggt
attaaaacacttaaatatagatccggtggtatggatgagaaaacaattgcttt
acttgttgctggactagtgatcactgtcattgtcattgttggagccattcttttc
gtcccaggtgaatattcattaaagaatgctactggccttggtttaattgtgact
tctacagggatattaatattacttcactactatgtgtttagtacagcgattggat
taacctccttcgtcattgccatattggttattcaggtgatagcctatatcctcgc
tgtggttggactgagtctctgtattgcggcgtgtataccaatgcatggccct
cttctgatttcaggtttgagtatcttagctctagcacaattacttggactagttta
tatgaaatttgtggcttccaatcagaagactatacaacctcctaggaaagct
gtagaggaacccctaatgcattcaaagaatcaaaaggaatgatgaatgat
gaaggatccggagccacgaacttctctctgttaaagcaagcaggagacgt
ggaagaaaaccccggtcctatggagcgtccgcaacccgacagcatgcc
ccaggatttgtcagaggccctgaaggaggccaccaaggaggtgcacac
ccaggcagagaatgctgagttcatgaggaactttcagaagggccaggtg
acccgagacggcttcaagctggtgatggcctccctgtaccacatctatgtg
gccctggaggaggagattgagcgcaacaaggagagcccagtcttcgcc
cctgtctacttcccagaagagctgcaccgcaaggctgccctggagcagg
acctggccttctggtacgggccccgctggcaggaggtcatcccctacaca
ccagccatgcagcgctatgtgaagcggctccacgaggtggggcgcaca
gagcccgagctgctggtggcccacgcctacacccgctacctgggtgacc
tgtctgggggccaggtgctcaaaaagattgcccagaaagccctggacctg
cccagctctggcgagggcctggccttcttcaccttccccaacattgccagt
gccaccaagttcaagcagctctaccgctcccgcatgaactccctggagat
gactcccgcagtcaggcagagggtgatagaagaggccaagactgcgttc
ctgctcaacatccagctctttgaggagttgcaggagctgctgacccatgac
accaaggaccagagcccctcacgggcaccagggcttcgccagcgggc
cagcaacaaagtgcaagattctgcccccgtggagactcccagagggaag
cccccactcaacacccgctcccaggctccgcttctccgatgggtccttaca
ctcagctttctggtggcgacagttgctgtagggctttatgccatgtgagcgg
cgcgccggcaccggtaccaagcttaagagcgctagctggccagacatga
taagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaa
aatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagct
gcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagg
gggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtat
ggaattggagccccactgtgttcatcttacagatggaaatactgacattcag
aggagttagttaacttgcctaggtgattcagctaataagtgcaagaaagattt
caatccaaggtgatttgattctgaagcctgtgctaatcacattacaccaagct
acaacttcatttataaataataagtcagctttcaagggcctttcaggtgtcctg
cacttctacaagctgtgccatttagtgaacacaaaatgagccttctgatgaa
gtagtcttttcattatttcagatattagaacactaaaattcttagctgccagctg
attgaaggctgggacaaaattcaaacatgcatctacaacaatatatatctca
atgttagtctccaaattctattgacttcaactcaagagaatataaagagctagt
ctttatacactctttaaggtatgatccgtcagggccacacccgctgcatatg
gaggttcccaggctaggggtctaatcagagctgtagctgccaacctatgc
cacagccacagcaacgccagatttgagctgcaactgtgacctacaccata
gcttgtggcagctctggatccttaacccactgagcgaggccagggatcga
acccacaaccttatggttcctagttggattcatttccactgcgccacgacag
gaactcctacaccaaaaatttttatattgtctatttcattcaaagaaaaagccc
tgctaagtatgactggcttaattattttcattgcccactaatagattgtgacctc
agtttgaaaaatattgttttaagtaaccaatcctctactgagaattagagtattc
ataattctctcctgttacaaacaatgctgcatgaagctgctttatactcattgtg

[0679]

		tgattatttctgagagcaagatcctagattgtataatcactgtttacttaaaatt ctgataaaatataggcagcatgctggaaaactgaattctgaccccagatct gtcaccgccacgaagcataaacttgggcaattctttgcattgctctgagtct cagtttccccatcaggaacctgctgttctcaacatcctagaatccgctttgag tgcagatgccccacccccctgactcagagagggcaggactttactcaggcc tttctcccccttttccgctccctgttcctcggaagcagcccagggaaaaggg aaaaagcaggtctgggctggagagcgtgatgcagggcggggcagagg gagggcaggagggaggccggcccccctagtaggaaatgagacagggta ggaataacactttataagcccgtcgccctctttctcctcccatgccctggcc accttccagcctcctccgtccagcctcctcccctcccagacactcctcatttc ttttccctctaggctgcagtcagccgccagccagagcccccccacccggc cccaccgccggccagagccaggagcccaggtgtggtggagaacttcag ctacaggatgttgacaacattgctgccgatactgctgctgtctggctgggcc ttttgtagccaagacgcctcagatggcctccaaagacttcatatgctccaga tctcctacttccgcgacccctatcacgtgtggtaccagggcaacgcgtcgc tgggggacacctaacgcacgtgctggaaggcccagacaccaacacca cgatcattcagctgcagcccttgcaggagcccgagagctgggcgcgcac gcagagtggcctgcagtcctacctgctccagttccacggcctcgtgcgcct ggtgcaccaggagcggaccttggcctttcctctgaccatccgctgcttcct gggctgtgagctgcctcccgagggctctagagcccatgtcttcttcgaagt ggctgtgaatgggagctcctttgtgagtttccggccggagagagccttgtg gcaggcagacacccaggtcacctccggagtggtcaccttcaccctgcag cagctcaatgcctacaaccgcactcggtatgaactgcgggaattcctgga ggacacctgtgtgcagtatgtgcagaaacatatttccgcggaaaacacga aagggagccaaacaagccgctcctacacttcgctggtcctgggcgtcctg gtgggcagtttcatcattgctggtgtggctgtaggcatcttcctgtgcacag gtggacggcgatgttgagcgcggccgcttcccttagtgagggttaatgct tcgagcagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactag aatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttg taaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcatttta tgtttcaggttcaggggagatgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacct ctacaaatgtggtaaaatccgataaggatcgatgggacagccccccccca aagccccagggatgtaattacgtccctccccgctagggcagcagcga gccgcccggggctccggtccggtccggcgctcccccgcatccccgagc cggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaaggtggcacgggga tcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgggg ggatacggggaaaatctagtgggacagcccccccccaaagcccccagg gatgtaattacgtccctccccgctagggcagcagcgagccgcccgggg ctccggtccggtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgc ggggacagcccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctg aacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgggggggatacgggg aaaaatcgatgggacagccccccccccaaagccccccagggatgtaattac gtccctccccgctagggcagcagcgagccgcccggggctccggtccg gtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcc cgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgc tgctctttgagcctgcagacacctgggggggatacggggaaaatctagtgg gacagcccccccccaaagcccccagggatgtaattacgtccctccccg ctagggcagcagcgagccgcccggggctccggtccggtccggcgctcc cccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggg gaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagc ctgcagacacctgggggggatacggggaaaaatcgatagcgataaggatc

[0680]

		cactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatat ggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcc caacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaac gccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaact gcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgcccccctattg acgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgacct tatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccat gggtcgaggtgagccccacgttctgcttcactctccccatctccccccct ccccaccccccaattttgtatttatttatttttttaattattttgtgcagcgatgggg gcgggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcg aggggcggggcggggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaatca gagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggcggcggcggcgg cggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgttg ccttcgccccgtgccccgctccgcgccgcctcgcgccgcccgccccgg ctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttc tcctccgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggctcgtttcttttctgtg gctgcgtgaaagccttaaagggctccgggagggccctttgtgcgggggg gagcggctcgggggggtgcgtgcgtgtgtgtgtgcgtggggagcgccgc gtgcggcccgcgctgcccggcggctgtgagcgctgcgggcgcggcgc ggggctttgtgcgctccgcgtgtgcgcgaggggagcgcggccggggg cggtgccccgcggtgcgggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgt gcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcagggggtgtgggcgcggcgg tcgggctgtaacccccccctgcacccccctccccgagttgctgagcacgg cccggcttcgggtgcggggctccgtgcggggcgtggcgcggggctcgc cgtgccgggcgggggggtggcggcaggtgggggtgccgggcggggcg gggccgcctcgggccggggagggctcgggggagggggcgcggcggc cccggagcgccggcggctgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgc cttttatggtaatcgtgcgagagggcgcagggacttcctttgtcccaaatct ggcggagccgaaatctgggaggcgccgccgcacccccctctagcgggc gcgggcgaagcggtgcggcgccggcaggaaggaaatgggcggggag ggccttcgtgcgtcgccgcgccgccgtcccccttctccatctccagcctcgg ggctgccgcaggggacggctgccttcgggggggacggggcagggc ggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggctctagagcctctgctaacc atgttcatgccttcttcttttttcctacagctcctgggcaacgtgctggttgttgt gctgtctcatcattttggcaaagaattccgctgcgactcggcggagtcccg gcggcgcgtccttgttctaacccggcgcgccctcaggatggagcctcccg gccgccgcgagtgtcccttttccttcctggcgctttcctgggttgcttctggc ggccatggtgttgctgctgtactccttctccgatgcctgtgaggagccacca acatttgaagctatggagctcattggtaaaccaaaaccctactatgagattg gtgaacgagtagattataagtgtaaaaaaggatacttctatatacctcctctt gccacccatactatttgtgatcggaatcatacatggctacctgtctcagatga cgcctgttatagagaaacatgtccatatatacgggatcctttaaatggccaa gcagtccctgcaaatgggacttacgagtttggttatcagatgcactttatttgt aatgagggttattacttaattggtgaagaaattctatattgtgaacttaaagga tcagtagcaatttggagcggtaagcccccaatatgtgaaaaggttttgtgta caccacctccaaaaataaaaaatggaaaacacaccttagtgaagtagaa gtatttgagtatcttgatgcagtaacttatagttgtgatcctgcacctggacca gatccattttcacttattggagagagcacgatttattgtggtgacaattcagtg tggagtcgtgctgctccagagtgtaaagtggtcaaatgtcgatttccagtag tcgaaaatggaaaacagatatcaggatttggaaaaaaattttactacaaagc aacagttatgtttgaatgcgataagggtttttacctcgatggcagcgacaca

[0681]

		attgtctgtgacagtaacagtacttgggatcccccagttccaaagtgtcttaa agtgctgcctccatctagtacaaaacctccagctttgagtcattcagtgtcga cttcttccactacaaaatctccagcgtccagtgcctcaggtcctaggcctac ttacaagcctccagtctcaaattatccaggatatcctaaacctgaggaagga atacttgacagtttggatgtttgggtcattgctgtgattgttattgccatagttgt tggagttgcagtaatttgtgttgtcccgtacagatatcttcaaaggaggaag aagaaaggcacatacctaactgatgagacccacagagaagtaaaatttac ttctctcggatccggagccacgaacttctctctgttaaagcaagcaggaga cgtggaagaaaaccccggtcctatgaccgtcgcgcggccgagcgtgcc cgcggcgctgcccctcctcggggagctgccccggctgctgctgctggtg ctgttgtgcctgccggccgtgtggggtgactgtggccttcccccagatgta cctaatgcccagccagctttggaaggccgtacaagttttcccgaggatact gtaataacgtacaaatgtgaagaaagctttgtgaaaattcctggcgagaag gactcagtgatctgccttaagggcagtcaatggtcagatattgaagagttct gcaatcgtagctgcgaggtgccaacaaggctaaattctgcatccctcaaac agccttatatcactcagaattattttccagtcggtactgttgtggaatatgagt gccgtccaggttacagaagagaaccttctctatcaccaaaactaacttgcct tcagaatttaaaatggtccacagcagtcgaattttgtaaaaagaaatcatgc cctaatccgggagaaatacgaaatggtcagattgatgtaccaggtggcata ttatttggtgcaaccatctccttctcatgtaacacagggtacaaattatttggct cgacttctagtttttgtcttatttcaggcagctctgtccagtggagtgacccgt tgccagagtgcagagaaatttattgcccagcaccaccacaaattgacaatg gaataattcaaggggaacgtgaccattatggatatagacagtctgtaacgt atgcatgtaataaaggattcaccatgattggagagcactctatttattgtactg tgaataatgatgaaggagagtggagtggcccaccacctgaatgcagagg aaaatctctaacttccaaggtcccaccaacagttcagaaacctaccacagt aaatgttccaactacagaagtctcaccaacttctcagaaaaccaccacaaa aaccaccacaccaaatgctcaagcaacacggagtacacctgtttccagga caaccaagcattttcatgaaacaaccccaaataaaggaagtggaaccactt caggtactacccgtcttctatctgggcacacgtgtttcacgttgacaggtttg cttgggacgctagtaaccatgggcttgctgacttagggcgcgccggcacc ggtaccaagcttaagagcgctagctggccagacatgataagatacattgat gagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtg aaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagt taacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggggaggtgtggg aggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtatggaattggagcc ccactgtgttcatcttacagatggaaatactgacattcagaggagttagttaa cttgcctaggtgattcagctaataagtgcaagaaagatttcaatccaaggtg atttgattctgaagcctgtgctaatcacattacaccaagctacaacttcatttat aaataataagtcagctttcaagggcctttcaggtgtcctgcacttctacaagc tgtgccatttagtgaacacaaaatgagccttctgatgaagtagtcttttcatta tttcagatattagaacactaaaattcttagctgccagctgattgaaggctggg acaaaattcaaacatgcatctacaacaatatatatctcaatgttagtctccaa attctattgacttcaactcaagagaatataaagagctagtctttatacactctt aaggtatgatatcatctggaaagtaacaaaattgatgcaaatttgaatgaact ttatcatggtgtatttacacaatgtgtttcttctccctgcaatgtatttctttctcta attccttccatttgatctttcatacacaatctggttctgatgtatgtttttggatg cacttttcaactccaaaagacagagctagttactttcttcctggtgctccaag cactgtatttgtatctgtattcaagccctttgcaatattgtactggatcattatttc acctctaggatggcttccccaggcaacttgtgttcacccagagactacatttt gtatcttgttgacctttgaacttccaccagtgtctaaaaataatatgtatgcaa

[0682]

		aattacttgctatgagaatgtataattaaacaatataaaaaggagaagcaag gagagaaacacaggtgtgtatttgtgtttgtgtgcttaaaaggcagtgtgga aaaggaagaaatgccatttatagtgaggagacaaagttatattacctcttatc tggcttttaaggagattttgctgagctaaaaatcctatattcatagaaaagcct tacctgagttgccaatacctcaattctaaaatacagcatagcaaaactttaac ctccaaatcaagcctctacttgaatccttttctgagggatgaataaggcatag gcatcaggggctgttgccaatgtgcattagctgtttgcagcctcaccttcttt catggagtttaagatatagtgtattttcccaaggtttgaactagctcttcatttct ttatgttttaaatgcactgacctcccacattccctttttagtaaaatattcagaa ataatttatcccggcttgtcgacgacgg
14	**B209 载体**	atcatctggaaagtaacaaaattgatgcaaatttgaatgaactttatcatggt gtatttacacaatgtgtttcttctccctgcaatgtatttctttctctaattccttcca tttgatctttcatacacaatctggttctgatgtatgtttttggatgcacttttcaa ctccaaaagacagagctagttactttcttcctggtgctccaagcactgtattt gtatctgtattcaagccctttgcaatattgtactggatcattatttcacctctag gatggcttccccaggcaacttgtgttcacccagagactacattttgtatcttgt tgacctttgaacttccaccagtgtctaaaaataatatgtatgcaaaattacttg ctatgagaatgtataattaaacaatataaaaaggagaagcaaggagagaa acacaggtgtgtatttgtgtttgtgtgcttaaaaggcagtgtggaaaaggaa gaaatgccatttatagtgaggagacaaagttatattacctcttatctggctttt aaggagattttgctgagctaaaaatcctatattcatagaaaagccttacctga gttgccaatacctcaattctaaaatacagcatagcaaaactttaacctccaaa tcaagcctctacttgaatccttttctgagggatgaataaggcataggcatca ggggctgttgccaatgtgcattagctgtttgcagcctcaccttctttcatgga gtttaagatatagtgtattttcccaaggtttgaactagctcttcatttctttatgtt ttaaatgcactgacctcccacattccctttttagtaaaatattcagaaataattt aaattcgtggaatcccacccagcagacaagtatggctggatattttatataa cgtgtttacgcataagttaatatatgctgaatgagtgatttagctgtgaaaca acatgaaatgagaaagaatgattagtaggggtctggagcttattttaacaag cagcctgaaaacagagagtatgaataaaaaaaaattaaatacaagagtgtg ctattaccaattatgtataatagtcttatacatctaacttcaattccaatcactat atgcttatactaaaaaacgaagtatagagtcaaccttctttgactaacagctc ttccctagtcagggacattagcccaagtatagtctttatttttcctggggtaag aaaagaaggattgggaagtaggaatgcaaagaaataaaaaataattctgt cattgttcaaataagaatgtcatctgaaaataaactgccttacatgggaatgc tcttatttgtcaggtatattaaggaaacaaacatcaaaaatgacccaaatgaa ctcaacaatcttatcaagaagaattctgaggtggtaacctggaccccaaga cctggagccactcttgatctgggtaggatgctaaaggacgcgatcgcattt aaatacatcattgcaatgaaaataaatgtttttttattaggcagaatccagatgc tcaaggcccttcataatatcccccagtttagtagttggacttagggaacaaa ggaacctttaatagaaattggacagcaagaaagctctagctttagaagaac tcatcaagaagtctgtagaaggcaattctctgggagtcaggggctgcaatg ccatagagcactaggaacctgtctgcccactctcccctagctcttctgcta tgtccctggttgctagggcaatgtcctggtacctgtcagccactcccagcct gccacagtctatgaagccagagaaccttccattttcaaccatgatgttggga aggcaggcatccccatgagtcaccactaggtcctcaccatctggcatgga tgccttgagcctggcaaatagttcagcaggggccaggccctggtgttcttc atccaagtcatcttggtccaccaggccagcctccatcctggttctggccctc tctatcctgtgcttggcctggtggtcaaaggggcaggtggctgggtcaag ggtgtggagtcttctcatggcatcagccatgattgacactttctcagctgga

[0683]

gctaggtgagaggaaaggaggtcctgcccaggcacctcacctagtagga
gccagtcccttccagcttctgtgaccacatcaaggacagctgcacagggg
accccagttgttgccaaccaggagagtctggcagcctcatcctggagctc
attgagagccccactgaggtctgtctttacaaaaaggactggcctgccttg
ggctgaaagtctgaaaactgctgcatcagagcaaccaatggtctgctgtgc
ccagtcatagccaaacagtctctcaacccaggcagctggagaacctgcat
gtaggccatcttgttcaatcatgatggctcctcctgtcaggagaggaaaga
gaagaaggttagtacaattgctatagtgagttgtattatactatgcttatgatta
attgttaaactagggctgcagggttcatagtgccacttttcctgcactgcccc
atctcctgcccacccctttcccaggcatagacagtcagtgacttaccaaactc
acaggagggagaaggcagaagctttttgcaaaagcctaggctcatgaga
caataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagta
ttcaacatttccgtgtcgcccttattccctttttgcggcattttgccttcctgtttt
tgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgg
gtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttg
agagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctg
ctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggt
cgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacag
aaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgcca
taaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggag
gaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactc
gccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacga
gcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactat
taactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggat
ggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctg
gctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtat
cattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatcta
cacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgct
gagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttact
catatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtg
aagatccttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttcc
actgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttt
ttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcg
gtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactgg
cttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagtta
ggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgcta
atcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggt
tggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaac
gggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccga
actgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaag
ggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacagga
gagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcc
tgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcag
gggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggtt
cctggccttttgctggccttttgctcacatggctcgacagatttaattaaacag
tgtgactagggaggcaaaacatacctactaaagggtggtagcataattcag
ttcttatgtgagtatgtgtatgtgtgtgagtatgtgcacatgcacatacatttta
aaaggtctgtaatatactaacatgttcatagtggttacacctagcttataggta
acatttttttcccctgtatccttgtttgtgtttatcaaattttcataacagtaatggt
agaaggagtacctgacatggtaccatacatgctctgggccctgcctaatttc
tcaatttcctttattgcccatacccccattgcttgacaagcataagtccatact

[0684]

		ggcttgtttttcgttcctcagactcagtacaccatgtagctccatgccctggg tctttgtatgtgctatttctactgcttagagtgctattgcccctgaccaccacgt ggtcagcaacttctcttctgtgtctgtgtccatggtctatgattccagatgtcat cttcactaactacccttctaatatgcccttccatcccacccgtcctcatcctta ccccagccactctctatttggtggctctgttttatttttcttcctagctcatcactc tttgaaatgaacttatttacttattcattatttgcttctttcactagaatgaatgctc catgagagcagggacctgctttatcttgctcgccactgtattctcagtgccta gaactacgtctggcacatagtaggtgctcaataaatatcgatcaaatgaaa gaatgagcaaacgaacaaatgaacaacacgtgaggtaggcatcatgattc cattcaacagaggagaaaaacagacttaaagaattgaagtggtggagctg cattttgatcttgactgactccaacatccatgctcttgaccactgtgcatctcc agagtgtaatgaacatactttacttttatattccaccaaaataacaaagccat gcccatgttagtagagagttaatcgacagtgcccttaaaatatgcatgcacc cagggtacaactatgcatgctgccctgtgttttcagttggatccaaatgaatt gccgtaaacaaagaggggattcaatgtctttgactagtttgggatattttcct agtaaccaactttgcaaaataaagccactaatgacaaggagctttgttctac ttctgcatcactcaactgtcaatttttatctcttgcaagacttctaatctactaga acttttgtttttctgtgatttctgaacagagaagactaatccaaaccctgtcatt ccagaggaatggaaagcccaattcattaaaaccgtcggcgcgttcagcct aaagctttttttctccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagactcat gtctcctatgtctcatctaaatggatgaggtttgagagttcccatcacggcat ggtggaaacgaatccgactaggagccataagttcacggcttcgatccctg gcctcgctcaggggggttaaggatccggtgttgctgtgagctgtggtgtagg tcacagatgcggttcggatctggcgttgctgcggctgtggtgtaggctggt ggctgtagctccgatttgacccctagcctagggacctccatatgccgtggg tatggccctaaaaagccaaataaaataaaataagtaaatggttgaggtttga cacagaaagtttatttatttatgtatttacttatctttttttttttttttttttgtctttct gctatttcttgggctgctcccgcggcatatggaggttcccaggctaggggt cgaattggagctacagccaccagcctacaccacagccgcagcaatgcca gatccgagccgcctctgtgacctacaccacagctcatggcaacgctggat cgttaacccactgagcaagggctgggaccgaacccgcaacctcatggttc ctagtcggattcgttaaccactgcgccatgacgggaactcctacttatctatt ttttaaagcatatggaagttcccaggctaggggggttgaatcggagctgcaa ctgccggcttacaccacagccagagcaacgccggatctgagcagtgtct gggacctacaccacagctcacagccacaccggatcctcaatccactgaat gaggccaggaatcaaacctgtgtcctcatggatactagtcagattcatttcc gctgagcaatgacaggaactcctgacacagaaattttagattaaaattgaa gatgagccccttccttttgtacgacctttgtgtgcagattttcgaggataagtc cttgagcttgaagttttagggtcatggatcctcataacagtttcctggcctgtg aggcttggatctcagtataaacagaagtgctggcagcagtagacacagca gcagctgttttcaggaacaaatactgggcacctgccttgtggacctgcctg actccaccactctcttgggtatccacaaagtggacccagaggttcagagca gccctgggatccaaatttttttaatttatttttatctttttatttttgtctttcgaaa tttttagggctacacccatgagatatggaggttcccaggctaagggtccaat cggagctacaactgccggcctacaccacagctcatggcaatgctggatcc ttaacccgctgagcgaggccagggatcaaacccacaacctcatgattcct agttggattcgttaaccactgagccacgatgggaactccctgggatgcaaa ttttgtcatctagccctaggatgtagctatcatcctgatttgagaagagaggc agagtctcaggtggcttctctctcatgaatgcagagctaagggtggccaca cgtacttgagttcatccgatgcacacagcattgtgctaaaatattgaccattt ggccctttgctgacttttggtttgagggatatgaccttcatgagcatacaga

[0685]

		ggataatatgtatgcatgtatgcatgtgtgtacacatgtgcgcatgcatgtat atacctgcataattatgtatttgtttatgtatgcaggtgcatgtgtatgtatatat ttattatttatttatttgggggccacacccatgacatttggaagttcctgggac agagattgaatcccagccacagctttgacctacgccatggacacagcaac actggattcttaacccccctgtgccacagcgggaactcctagaagatagtatt tcatgatgatatttgactaaaaatagggtcaggctttgaagtttaaataaatt cgaccagataaatggccatccaggaagttatactttgccttgttcaaatttgg accacggggaaggtggttggcgacatgtaacagaaatctgactccagtgc aggtttcgctcccgtgacgggaagcccagaggtgggcagccctaaggct ggggctctgatttcatgatgctcttagcatcttgagtcccttccctcttcttgct tttatctcagcctcgggctgctgcaccttctgtctttgtggtgagtctacctatt ccacttagctcggcttcagggtgtatttccacgacttcgttagagtaaggttg gggccagctgtgctctgccggcaggaggtgtgcttgcaggggccatgga tgtggccaggacctaatgtgacggtggggagcaggatggggatgaggat gtgaccacagagccttgggaaccacgtcatccacgtcatacactgagagc aggtggttctcatgcaggtgcatcagaatcccgaggacggcttgtccaaa cccagatggctgggcccaagccctgagctcccgatttgggaggccttgg ctgggccccgaaatctgccttcctgactagaccgagtgatgaatggtgttc atagacaagacatacactaacactggtcttgggggctccttgccacaccct gaaggggtccgtgaaactgacggggccagagaaggtgctggttcctcca tggaaggtctcagtgaggccattctgctgcccggctgggtcacgctgggg gagtgagggtgcatcccctcctgggatctggtcaaaggcagattctgattc tggaagcacggggtagggccagagatgccaccttctaacaagcccccag gtgaagatgttgacctgggaccttatggtgggggtggcggagctcaag gtggcagacacctccctctctctcaacctgtgtcacagcagggccatccta ctggctctcgctcggccagagatggcgatgccagaacacactggggcag ggtgtccacatttttgtcacttccactgagccctggggactgactcatttaaat gacattctcaactctttggaaagaagctgggccagaaatggaaatggcag caaacacttttgggaaacaggaagccaatttttttttttcaatcatgattttccc cagattcagagactgcttaactcccaatgaaatacttttagattacgagctaa aataccgaaaagctgtcaagctcaagaccacaggaaaacagccgaaga acaaacaccatgagaaaacagtcacagagtgcctctgcggcggatttcaa gttccagacttccttgctgtcagctgtgtgtacttgtcccgcctgcagtagga ccagctggggtttaagtctgtaccatggacactgctgccaggattctcctct gcatctgctgacttccagctcttcagggccagctggccataggagcataaa ctgacatccagttccaggaggcagcatctgtccccatggcctgcaggaca ccagatcagtagaggccccccagggccacctttcctgtgggggcccttgaa gggacccgggaaggctggatcttgctaaagcttccacaagtcccttccaa aggagagtaaattctaaacagaagcttttgccagtgcttctctgggatctgg cttcaggattattcctagtctgaaaagtcttcctggtggtttggacacgggca aatgcttggtgggtgggctggctctggatgcaggtgagtggggtcggaa gttctccctccttcccacaaagcttgacggagccaggggcacccgcggg cctgtggatgggagaggggtttctggtgacggactcaagtcttggcagcc cctgaccccagagcaggctccctccccacagctgctctccgtgagtccttc acttgcccaagttcaagatgtacccagttctggagctgccaaaccatcctg catcctgatgtcagccacccaagttctggggtagctggtctgccacccagg tggatgaaaagaggccacatacctgcaccagcatctgcgaatctctgaag aacatcaataataaaaagacaactaacccagttaaaacacaggtagagaa tctgaacagacattcatcggaagaagaattacgactggccaaaaagctcat aaaaagatggtcaaagtcattggtcagggaaatgtaaatcaaaccgcattg agataccatctcactccctctcggatggctggaatgaaaaaaaacctcttct

[0686]

		ttcctccctttcattgtcttggcaccttgtggaaattaattgactaaaattcat gaaatacaaaaatttttaggagttcccgtcgtggctcagtggttaacaaatct gactaggaaccatgaggtttcaggttcgattcctggcctcactcagtgggtt agggatctggtgttgccatgagctgtggtgtaggtcacagacgcagctcg gatcccgcattgctgtggctctggcgtaggccggcggctacagctctgatt caacctctagcctgggaatagcccaagaaatggcaaaaagaccaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaactcgttttgagcatttttgcatgtgtacattgtccatt tgtgtgccttccaagatttatttttggagtctcaactctgtcattgatttatgtctc tccttaggccagaaccacactgttttggtgaccatggctttgtagtaaaattt gaaatctgaaagtgtgagccctcctgttttgtttctcttctccatgattagtttg gttattcagagtcccttgaatttccaggtgaatttaggattagcaggaaaatt tctgcagagatggcagcagagatttttaatagggattatgttgaatctggag gttaatttcagttttgctaccttgactgtattaagtcttccagtctataagcataa gatgtctttttatttacttaggtcttttaaaatttctttgggcactcccattgtggt gcatcggaaatgaatccgactagtatccacaagaacacaggttcaatccct ggcattgctcagtgggttaaggatcctgcattgccatgaagaactgtggtg gaggccagcagctgcagctctgatttgacccctagcctgggaacttccata tgccttgggtatggccctaaaaagcaaactaagtaagtaagtaaataaata aatgaataaataaaatttctttcaacattgtaattttgtaatttttgtaattttcaga gcgtacattttgccctttcaatacattattcctacatattttattctttttgatactat tataaatgaaatttataattaattcatttatatgaatttcattttcaatttgcatattg ctactacaatagaaatgcacttttttaattatttttatggccatactatatatatatg tgtgtgtgtgtgtatgtgtgtcattttactgtacagcagaaattgacacaacat tgtaaatcaactacacttaaaaaatgaagaaataaccacctgtgattatggct actgtgttggacactttaggcatccccccacccgtcccgccccacaccc ctgagtgctagtgacggatgttcccacccaggggggcctggagcctttatca ccagccatcgggaatcagaaccgtatctcacagtccccatgcctggagca cctggaattgtgcccttggactcgtgggtgttctgcttctcagtgggagaag cttaggttctaagtcagagcagggacagcccccatgtgctcaggacccag tgtgaaggggtctgcctcaggggacctgggggttacaagggtaagagaa ggtgttcatgttggaactagaagttctttttcactgctctgaagaaaaaagct gcctcccaccccttggtacagctcttctgctaacagtgaatcaggcagaacg tgttcaagaagtgacccagcctggtgggggccagacctgacccttgatgg tccctcaaccccctccgagggtcccgcccttcctttactgctttgttgtctgtcc tgagaggtttggctaatgtcgaaccaagggtgtggctggtcctgtccccttt cctgtctcacgcacccacctctgaagtctctgtagctggttccagccgggat ctggagccactccccccgccccaggcccagtggtacagactcttgcaga gtcgggggcccctgactcagccccaccgccagcgggatgtcaggccag cacccgccccactcccactgatctgggggggtgtctttccttcctccttcc aaaggagcctcagaccttcctgtggggcacgggggcagtgggattcagg aggctctgagtcagcaggccggcattgaggagtataaagggaccccagt tcctcccccctttcacttgtggcttatcgccgccccaccctgccccaaggtca ctgcggtcagtacagtcctcagctgccagcaggtgcctgtctttacttgtga ggccgccacgctctcctgtttctccaggtctgggctctgttggaagtgggg gcccgacccccgggtaagatgggggatctgcgtgtcctgccctcagagg cctcctcctccccgcacccctaacccttcagcccaacaaggctggagatc tcccacatctttggcttcgttaagagttcaacagcgccgccacccggcatgt cgctgagcagaggatggcacagggtgttaaaaaaaaaaaaaaggttgcca cactccgttcggttttgggcccacccttcgcattcctggagcctgagtaag cggataaggctgtgaaagtgacagattcctgccacctccttccagcgctca tgcacagggaccgcccctcttcggtgtcctttgctgcacaagtgcatttgca

[0687]

		cattcctgtctcaatctggtttctccccctaaaagatgggaatgtgacctgct tggagcccctcgcctcgccagggcaccccatccgtcccttcaggggtgg agatggactgtccctctgcaaggctggatgaactcagaccaaacaggcca acttgctccccaaatacgcccacccctaccgggctgcaggaattcgcctgt caccactgctgaagggtgaccttgcagccctgagagcatccccatgactt gcccaccagatgaagtctggttgtggcaggtcgcgctcagggactcccg ggtcccacctgggggtgggaggatcctcctttgctcgtggtcgccccagc cacgccctcctttccaagcgccagtctccagagctccgtgccccggcgga ggcggtctggctctctcctccttgcccctctctccttgcccctagcagcccttc tcctaaaccctctgagcagcgggcacctcctcccgaggccctgggctaag tccccaccttcatctcaagccttcctccttgactccctcttcccagagttcct tgaaataggtggtaagtacacaccgatgacggaaaacaaagactaagag gttaaagagggctgaggattacggccccggtagggctgcgcgcgaggg ggtcgagtggccgggcggtcccgttgccgggcagacagaggtgcggtt ctcccgggcgcctgcgctgccggccccgcccggagccctcccagccgg cgcccagtttactcatcccggagaggtgatcccgggcgcgagggcggg cgcagggcgtccggagaacccagtaatccgagaatgcagcatcagccct tcccaccaggcacttccttccttttcccgaacgtccaggaaggggggccg cgcacttataaactcgggccggacccgccggcctgtcagaggctgcctc gctggggctgcgcgcggcggccggacacatctggtccgagaccaacgc gagcgactgtcactggcagctccctgcgcctctcagccccggccgggcc cctgcgcttggcgtgctgacaccatgcttggggtcctggtccttggcgcgc tggccctggccggcctggggttccccgcacccgcagagccgcagccgg gtggcagccagtgcgtcgagcacgactgcttcgcgctctacccgggccc cgcgaccttcctcaatgccagtcagatctgcgacggactgcggggccac ctaatgacagtgcgctcctcggtggctgccgatgtcatttccttgctactgaa cggcgacggcggcgttggccgccggcgcctctggatcggcctgcagct gccacccggctgcggcgaccccaagcgcctcgggcccctgcgcggctt ccagtgggttacgggagacaacaacaccagctatagcaggtgggcacg gctcgacctcaatggggctcccctctgcggcccgttgtgcgtcgctgtctc cgctgctgaggccactgtgcccagcgagccgatctgggaggagcagca gtgcgaagtgaaggccgatggcttcctctgcgagttccacttcccagccac ctgcaggccactggctgtggagcccggcgccgcggctgccgccgtctc gatcacctacggcaccccgttcgcggcccgcggagcggacttccaggc gctgccggtgggcagctccgccgcggtggctcccctcggcttacagcta atgtgcaccgcgccgcccggagcggtccaggggcactgggccaggga ggcgccgggcgcttgggactgcagcgtggagaacggcggctgcgagc acgcgtgcaatgcgatccctggggctccccgctgccagtgcccagccgg cgccgccctgcaggcagacgggcgctcctgcaccgcatccgcgacgca gtcctgcaacgacctctgcgagcacttctgcgttcccaaccccgaccagc cgggctcctactcgtgcatgtgcgagaccggctaccggctggcggccga ccaacaccggtgcgaggacgtggatgactgcatactggagcccagtccg tgtccgcagcgctgtgtcaacacacagggtggcttcgagtgccactgcta ccctaactacgacctggtggacggcgagtgtgtggagcccgtggacccg tgcttcagagccaactgcgagtaccagtgccagcccctgaaccaaactag ctacctctgcgtctgcgccgagggcttcgcgcccattccccacgagccgc acaggtgccagatgttttgcaaccagactgcctgtccagccgactgcgac cccaacacccaggctagctgtgagtgccctgaaggctacatcctggacga cggtttcatctgcacggacatcgacgagtgcgaaaacggcggcttctgct ccggggtgtgccacaacctccccggtaccttcgagtgcatctgcgggccc gactcggcccttgcccgccacattggcaccgactgtgactccggcaaggt

[0688]

		ggacggtggcgacagcggctctggcgagcccccgcccagcccgacgc ccggctccaccttgactcctccggccgtggggctcgtgcattcgggcttgc tcataggcatctccatcgcgagcctgtgcctggtggtggcgcttttggcgct cctctgccacctgcgcaagaagcagggcgccgccagggccaagatgga gtacaagtgcgcggccccttccaaggaggtagtgctgcagcacgtgcgg accgagcggacgccgcagagactcggatccggagagggcagaggaa gtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatcccggccctatgttgacaa cattgctgccgatactgctgctgtctggctgggccttttgtagccaagacgc ctcagatggcctccaaagacttcatatgctccagatctcctacttccgcgac ccctatcacgtgtggtaccagggcaacgcgtcgctgggggggacacctaa cgcacgtgctggaaggcccagacaccaacaccacgatcattcagctgca gcccttgcaggagcccgagagctgggcgcgcacgcagagtggcctgca gtcctacctgctccagttccacggcctcgtgcgcctggtgcaccaggagc ggaccttggcctttcctctgaccatccgctgcttcctgggctgtgagctgcc tcccgagggctctagagcccatgtcttcttcgaagtggctgtgaatgggag ctcctttgtgagtttccggccggagagagccttgtggcaggcagacaccc aggtcacctccggagtggtcaccttcaccctgcagcagctcaatgcctaca accgcactcggtatgaactgcgggaattcctggaggacacctgtgtgcag tatgtgcagaaacatatttccgcggaaaacacgaaagggagccaaacaa gccgctcctacacttcgctggtcctgggcgtcctggtgggcagtttcatcat tgctggtgtggctgtaggcatcttcctgtgcacaggtggacggcgatgttg agcgcggccgcttccctttagtgagggttaatgcttcgagcagacatgata agatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaa tgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgc aataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggg ggagatgtgggaggtttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtaaa atccgataaggatcgatgggacagccccccccccaaagcccccagggat gtaattacgtccctccccccgctagggcagcagcgagccgcccggggctc cggtccggtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcgggg gacagcccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaac gcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgggggggatacggggaaa atctagtgggacagcccccccccaaagcccccagggatgtaattacgtcc ctcccccgctagggcagcagcgagccgcccggggctccggtccggtcc ggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgg gcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgct ctttgagcctgcagacacctgggggggatacggggaaaaatcgatgggac agcccccccccaaagcccccagggatgtaattacgtccctcccccgctag ggcagcagcgagccgcccggggctccggtccggtccggcgctccccc gcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaa ggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctg cagacacctgggggggatacggggaaaatctagtgggacagccccccc caaagcccccagggatgtaattacgtccctcccccgctagggcagcagc gagccgcccggggctccggtccggtccggcgctcccccgcatccccga gccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaaggtggcacgg gatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgg ggggatacggggaaaaatcgatagcgataaggatccactagttattaata gtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgtta cataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccg cccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggact ttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcag tacatcaagtgtatcatatgccaagtacgcccccctattgacgtcaatgacgg

[0689]

		taaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcct acttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatgggtcgaggtga gccccacgttctgcttcactctccccatctccccccccctccccacccccaat tttgtatttatttatttttttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggg ggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgaggggcggggcg gggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgct ccgaaagtttccttttatggcgaggcggcggcggcggccctataaaa agcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgttgccttcgccccgtg ccccgctccgcgccgcctcgcgccgcccgccccggctctgactgaccg cgttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctccgggctgt aattagcgcttggtttaatgacggctcgtttcttttctgtggctgcgtgaaagc cttaaagggctccgggagggccctttgtgcgggggggagcggctcggg gggtgcgtgcgtgtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggcccgcg ctgcccggcggctgtgagcgctgcgggcgcggcgcggggctttgtgcg ctccgcgtgtgcgcgaggggagcgcggccgggggcggtgccccgcg gtgcgggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcggggtgtgtg cgtgggggggtgagcaggggtgtgggcgcggcggtcgggctgtaac ccccccctgcaccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgg gtgcggggctccgtgcggggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggc gggggtggcggcaggtgggggtgccgggcggggcggggccgcctc gggccggggagggctcgggggagggggcgcggcggccccggagcgc cggcggctgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgccttttatggtaat cgtgcgagagggcgcagggacttcctttgtcccaaatctggcggagccg aaatctgggaggcgccgccgcacccccctctagcgggcgcgggcgaag cggtgcggcgccggcaggaaggaaatgggcggggagggccttcgtgc gtcgccgcgccgccgtcccccttctccatctccagcctcggggctgccgca gggggacggctgccttcgggggggacggggcagggcggggttcggct tctggcgtgtgaccggcggctctagagcctctgctaaccatgttcatgcctt cttctttttcctacagctcctgggcaacgtgctggttgttgtgctgtctcatcat tttggcaaagaattccgctgcgactcggcggagtcccggcggcgcgtcct tgttctaacccggcgcgccctcaggatgggaatccaaggagggtctgtcc tgttcgggctgctgctcgtcctggctgtcttctgccattcaggtcatagcctg cagtgctacaactgtcctaacccaactgctgactgcaaaacagccgtcaat tgttcatctgattttgatgcgtgtctcattaccaaagctgggttacaagtgtata acaagtgttggaagtttgagcattgcaatttcaacgacgtcacaacccgctt gagggaaaatgagctaacgtactactgctgcaagaaggacctgtgtaactt taacgaacagcttgaaaatggtgggacatccttatcagagaaaacagttctt ctgctggtgactccatttctggcagcagcctggagccttcatcccggatcc ggagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatc ccggccctatggagcgtccgcaacccgacagcatgccccaggatttgtca gaggccctgaaggaggccaccaaggaggtgcacacccaggcagagaa tgctgagttcatgaggaactttcagaagggccaggtgacccgagacggct tcaagctggtgatggcctccctgtaccacatctatgtggccctggaggagg agattgagcgcaacaaggagagcccagtcttcgcccctgtctacttccca gaagagctgcaccgcaaggctgccctggagcaggacctggccttctggt acgggccccgctggcaggaggtcatcccctacacaccagccatgcagc gctatgtgaagcggctccacgaggtggggcgcacagagcccgagctgc tggtggcccacgcctacacccgctacctgggtgacctgtctgggggcca ggtgctcaaaaagattgcccagaaagccctggacctgcccagctctggc gagggcctggccttcttcaccttccccaacattgccagtgccaccaagttc aagcagctctaccgctcccgcatgaactccctggagatgactcccgcagt

[0690]

caggcagagggtgatagaagaggccaagactgcgttcctgctcaacatc
cagctctttgaggagttgcaggagctgctgacccatgacaccaaggacca
gagcccctcacgggcaccagggcttcgccagcgggccagcaacaaagt
gcaagattctgcccccgtggagactcccagagggaagcccccactcaac
acccgctcccaggctccgcttctccgatgggtccttacactcagctttctgg
tggcgacagttgctgtagggctttatgccatgtgagcggcgcgccggcac
cggtaccaagcttaagagcgctagctggccagacatgataagatacattg
atgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgt
gaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaag
ttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggggaggtgtgg
gaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtatggaattggagc
cccactgtgttcatcttacagatggaaatactgacattcagaggagttagtta
acttgcctaggtgattcagctaataagtgcaagaaagatttcaatccaaggt
gatttgattctgaagcctgtgctaatcacattacaccaagctacaacttcattt
ataaataataagtcagctttcaagggcctttcaggtgtcctgcacttctacaa
gctgtgccatttagtgaacacaaaatgagccttctgatgaagtagtcttttcat
tatttcagatattagaacactaaaattcttagctgccagctgattgaaggctg
ggacaaaattcaaacatgcatctacaacaatatatatctcaatgttagtctcc
aaattctattgacttcaactcaagagaatataaagagctagtctttatacactc
tttaaggtatgatgggtcccgatttttccccgtatccccccaggtgtctgcag
gctcaaagagcagcgagaagcgttcagaggaaagcgatcccgtgccac
cttccccgtgcccgggctgtccccgcacgctgccggctcggggatgcgg
gggagcgccggaccggaccggagccccgggcggctcgctgctgccct
agcgggggagggacgtaattacatccctgggggcttgggggggggct
gtcccactagattttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagag
cagcgagaagcgttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgc
ccgggctgtccccgcacgctgccggctcggggatgcgggggagcgcc
ggaccggaccggagccccgggcggctcgctgctgccctagcgggggga
gggacgtaattacatccctgggggctttgggggggggctgtcccatcgga
tcttctagtcctgcaggagtcaatgggaaaaacccattggagccaagtaca
ctgactcaatagggactttccattgggttttgcccagtacataaggtcaatag
ggggtgagtcaacaggaaagtcccattggagccaagtacattgagtcaat
agggactttccaatgggttttgcccagtacataaggtcaatgggaggtaag
ccaatgggtttttcccattactgacatgtatacgcgtcgacgtcggcgcgttc
agcctaaagctttttttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagag
cagcgagaagcgttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgc
ccgggctgtccccgcacgctgccggctcggggatgcgggggagcgcc
ggaccggaccggagccccgggcggctcgctgctgccctagcgggggga
gggacgtaattacatccctgggggctttgggggggggctgtccctgcgg
ccgcgaattcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgc
tcacaattccacacaacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctgg
ggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccg
ctttccagtcgggaaacctgtcgtgccaggggtctagccgcggtctagga
agctttctagggtacctctagggatccactagttattaatagtaatcaattacg
gggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggt
aaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtca
ataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtca
atgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtat
catatgccaagtacgcccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcc
tggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacat
ctacgtattagtcatcgctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctg

[0691]

cttcactctccccatctccccccccctccccaccccccaattttgtatttatttattt
tttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggggggggcgcgcgc
caggcggggcggggcggggcgaggggcggggcggggcgaggcgg
agaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttt
ttatggcgaggcggcggcggcggcggcccctataaaaagcgaagcgcgc
ggcgggcgggagtcgctgcgttgccttcgccccgtgccccgctccgcgc
cgcctcgcgccgcccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacag
gtgagcgggcgggacggcccttctcctccgggctgtaattagcgcttggtt
taatgacggctcgtttcttttctgtggctgcgtgaaagccttaaagggctccg
ggagggcccttgtgcgggggggagcggctcgggggtgcgtgcgtgt
gtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggcccgcgctgcccggcggctg
tgagcgctgcgggcgcggcgcggggctttgtgcgctccgcgtgtgcgc
gaggggagcgcggccgggggcggtgccccgcggtgcgggggggctg
cgaggggaacaaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgag
caggggtgtgggcgcggcggtcgggctgtaacccccccctgcacccc
cctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgggtgcggggctccgtg
cggggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggcgggggggtggcggca
ggtgggggtgccgggcggggcggggccgcctcgggccgggggaggg
ctcgggggagggggcgcggcggccccggagcgccggcggctgtcgag
gcgcggcgagccgcagccattgccttttatggtaatcgtgcgagagggcg
cagggacttcctttgtcccaaatctggcggagccgaaatctgggaggcgc
cgccgcaccccctctagcgggcgcgggcgaagcggtgcggcgccggc
aggaaggaaatgggcggggagggccttcgtgcgtcgccgcgccgccgt
ccccttctccatctccagcctcggggctgccgcaggggacggctgcctt
cgggggggacggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccgg
cggctctagagcctctgctaaccatgttcatgccttcttctttttcctacagctc
ctgggcaacgtgctggttgttgtgctgtctcatcattttggcaaagaattccg
ctgcgactcggcggagtcccggcggcgcgtccttgttctaacccggcgc
gccctcaggatggagcctcccggccgccgcgagtgtccctttccttcctg
gcgctttcctgggttgcttctggcggccatggtgttgctgctgtactccttctc
cgatgcctgtgaggagccaccaacatttgaagctatggagctcattggtaa
accaaaaccctactatgagattggtgaacgagtagattataagtgtaaaaa
aggatacttctatatacctcctcttgccacccatactatttgtgatcggaatca
tacatggctacctgtctcagatgacgcctgttatagagaaacatgtccatata
tacgggatcctttaaatggccaagcagtccctgcaaatgggacttacgagt
ttggttatcagatgcactttatttgtaatgagggttattacttaattggtgaaga
aattctatattgtgaacttaaaggatcagtagcaatttggagcggtaagccc
ccaatatgtgaaaaggttttgtgtacaccacctccaaaaataaaaaatggaa
aacacacctttagtgaagtagaagtatttgagtatcttgatgcagtaacttata
gttgtgatcctgcacctggaccagatccattttcacttattggagagagcac
gatttattgtggtgacaattcagtgtggagtcgtgctgctccagagtgtaaa
gtggtcaaatgtcgatttccagtagtcgaaaatggaaaacagatatcagga
tttggaaaaaaattttactacaaagcaacagttatgtttgaatgcgataaggg
tttttacctcgatggcagcgacacaattgtctgtgacagtaacagtacttggg
atccccagttccaaagtgtcttaaagtgctgcctccatctagtacaaaacct
ccagctttgagtcattcagtgtcgacttcttccactacaaaatctccagcgtc
cagtgcctcaggtcctaggcctacttacaagcctccagtctcaaattatcca
ggatatcctaaacctgaggaaggaatacttgacagtttggatgtttgggtca
ttgctgtgattgttattgccatagttgttggagttgcagtaatttgtgttgtccc
gtacagatatcttcaaaggaggaagaagaaaggcacatacctaactgatg
agacccacagagaagtaaaatttacttctctcggatccggagccacgaact

[0692]

tctctctgttaaagcaagcaggagacgtggaagaaaaccccggtcctatg
accgtcgcgcggccgagcgtgcccgcggcgctgcccctcctcggggag
ctgccccggctgctgctgctggtgctgttgtgcctgccggccgtgtggggt
gactgtggccttcccccagatgtacctaatgcccagccagctttggaaggc
cgtacaagttttcccgaggatactgtaataacgtacaaatgtgaagaaagct
ttgtgaaaattcctggcgagaaggactcagtgatctgccttaagggcagtc
aatggtcagatattgaagagttctgcaatcgtagctgcgaggtgccaacaa
ggctaaattctgcatccctcaaacagccttatatcactcagaattatttccag
tcggtactgttgtggaatatgagtgccgtccaggttacagaagagaaccttc
tctatcaccaaaactaacttgccttcagaatttaaaatggtccacagcagtcg
aattttgtaaaaagaaatcatgccctaatccgggagaaatacgaaatggtc
agattgatgtaccaggtggcatattatttggtgcaaccatctccttctcatgta
acacagggtacaaattatttggctcgacttctagtttttgtcttatttcaggcag
ctctgtccagtggagtgacccgttgccagagtgcagagaaatttattgccc
agcaccaccacaaattgacaatggaataattcaaggggaacgtgaccatt
atggatatagacagtctgtaacgtatgcatgtaataaaggattcaccatgatt
ggagagcactctatttattgtactgtgaataatgatgaaggagagtggagtg
gcccaccacctgaatgcagaggaaaatctctaacttccaaggtcccacca
acagttcagaaacctaccacagtaaatgttccaactacagaagtctcacca
acttctcagaaaaccaccacaaaaaccaccacaccaaatgctcaagcaac
acggagtacacctgtttccaggacaaccaagcattttcatgaaacaacccc
aaataaaggaagtggaaccacttcaggtactacccgtcttctatctgggca
cacgtgtttcacgttgacaggtttgcttgggacgctagtaaccatgggcttg
ctgacttagggcgcgccggcaccggtaccaagcttaagagcgctagctg
gccagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaat
gcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaa
ccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgt
ttcaggttcaggggggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctcta
caaatgtggtatggaattggagccccactgtgttcatcttacagatggaaat
actgacattcagaggagttagttaacttgcctaggtgattcagctaataagtg
caagaaagatttcaatccaaggtgatttgattctgaagcctgtgctaatcaca
ttacaccaagctacaacttcatttataaataataagtcagctttcaagggcctt
tcaggtgtcctgcacttctacaagctgtgccatttagtgaacacaaaatgag
ccttctgatgaagtagtcttttcattatttcagatattagaacactaaaattctta
gctgccagctgattgaaggctgggacaaaattcaaacatgcatctacaaca
atatatatctcaatgttagtctccaaattctattgacttcaactcaagagaatat
aaagagctagtctttatacactctttaaggtatgatatcatctggaaagtaac
aaaattgatgcaaatttgaatgaactttatcatggtgtatttacacaatgtgttt
cttctccctgcaatgtatttctttctctaattccttccatttgatctttcatacacaa
tctggttctgatgtatgtttttggatgcacttttcaactccaaaagacagagct
agttactttcttcctggtgctccaagcactgtatttgtatctgtattcaagccctt
tgcaatattgtactggatcattatttcacctctaggatggcttccccaggcaa
cttgtgttcacccagagactacattttgtatcttgttgacctttgaacttccacc
agtgtctaaaaataatatgtatgcaaaattacttgctatgagaatgtataatta
aacaatataaaaaggagaagcaaggagagaaacacaggtgtgtatttgtg
tttgtgtgcttaaaaggcagtgtggaaaaggaagaaatgccatttatagtga
ggagacaaagttatattacctcttatctggcttttaaggagattttgctgagct
aaaaatcctatattcatagaaaagccttacctgagttgccaatacctcaattct
aaaatacagcatagcaaaactttaacctccaaatcaagcctctacttgaatc
cttttctgagggatgaataaggcataggcatcaggggctgttgccaatgtg
cattagctgtttgcagcctcaccttctttcatggagtttaagatatagtgtatttt

[0693]

		cccaaggtttgaactagctcttcatttctttatgttttaaatgcactgacctccc acattccctttttagtaaaatattcagaaataatttatcatctggaaagtaacaa aattgatgcaaatttgaatgaactttatcatggtgtatttacacaatgtgtttctt ctccctgcaatgtatttctttctctaattccttccatttgatctttcatacacaatct ggttctgatgtatgtttttggatgcactttcaactccaaaagacagagctag ttactttcttcctggtgctccaagcactgtatttgtatctgtattcaagcccttg caatattgtactggatcattatttcacctctaggatggcttccccaggcaactt gtgttcacccagagactacattttgtatcttgttgacctttgaacttccaccagt gtctaaaaataatatgtatgcaaaattacttgctatgagaatgtataattaaac aatataaaaaggagaagcaaggagagaaacacaggtgtgtatttgtgtttg tgtgcttaaaaggcagtgtggaaaaggaagaaatgccatttatagtgagga gacaaagttatattacctcttatctggcttttaaggagattttgctgagctaaa aatcctatattcatagaaaagccttacctgagttgccaatacctcaattctaaa atacagcatagcaaaactttaacctccaaatcaagcctctacttgaatccttttt ctgagggatgaataaggcataggcatcaggggctgttgccaatgtgcatta gctgtttgcagcctcaccttctttcatggagtttaagatatagtgtattttccca aggtttgaactagctcttcatttctttatgttttaaatgcactgacctcccacatt ccctttttagtaaaatattcagaaataatttatcccggcttgtcgacgacgg
7	**B212 载体**	cggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatg taactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaac gacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgca aactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagac tggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttcc ggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcg cggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagt tatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacag atcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaa gtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatct aggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagtttt cgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgag atccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgcta ccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaagg taactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagcc gtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgct ctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtctta ccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcggg ctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctac accgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcc cgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaa caggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatcttta tagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctc gtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttta cggttcctggccttttgctggccttttgctcacatggctcgacagatttaatta acaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagc gcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcg acgttgtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgcc ggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatc atggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgccc attcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatg gaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggct

[0694]

		cgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatgcccgacgg cgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggt ggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggc ggatcgctggcctcgatggccgtgccagggcgtgcccttgggctccccg ggcgcggcgattaagacgtaagtcttggcagcccctgaccccagagcag gctccctccccacagctgctctccgtgagtccttcacttgcccaagttcaag atgtacccagttctggagctgccaaaccatcctgcatcctgatgtcagcca cccaagttctggggtagctggtctgccacccaggtggatgaaaagaggc cacatacctgcaccagcatctgcgaatctctgaagaacatcaataataaaa agacaactaacccagttaaaacacaggtagagaatctgaacagacattcat cggaagaagaattacgactggccaaaaagctcataaaaagatggtcaaa gtcattggtcagggaaatgtaaatcaaaccgcattgagataccatctcactc cctctcggatggctggaatgaaaaaaaacctcttctttcctccctttcattgtc ttggcacccttgtggaaattaattgactaaaattcatgaaatacaaaaatttt aggagttcccgtcgtggctcagtggttaacaaatctgactaggaaccatga ggtttcaggttcgattcctggcctcactcagtgggttagggatctggtgttgc catgagctgtggtgtaggtcacagacgcagctcggatcccgcattgctgtg gctctggcgtaggccggcggctacagctctgattcaacctctagcctggg aatagcccaagaaatggcaaaaagaccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa actcgttttgagcatttttgcatgtgtacattgtccatttgtgtgccttccaagat ttatttttggagtctcaactctgtgtcattgatttatgtctctccttaggccagaa ccacactgttttggtgaccatggctttgtagtaaaatttgaaatctgaaagtgt gagccctcctgttttgtttctcttctccatgattagtttggttattcagagtccctt gaatttccaggtgaattttaggattagcaggaaaatttctgcagagatggca gcagagatttttaatagggattatgttgaatctggaggttaatttcagttttgct accttgactgtattaagtcttccagtctataagcataagatgtctttttatttactt aggtcttttaaaatttctttgggcactcccattgtggtgcatcggaaatgaatc cgactagtatccacaagaacacaggttcaatccctggcattgctcagtggg ttaaggatcctgcattgccatgaagaactgtggtggaggccagcagctgc agctctgatttgacccctagcctgggaacttccatatgccttgggtatggcc ctaaaaagcaaactaagtaagtaagtaaataaataaatgaataaataaaatt tctttcaacattgtaattttgtaatttttgtaattttcagagcgtacattttgcccttt caatacattattcctacatattttattctttttgatactattataaatgaaatttata attaattcatttatatgaatttcattttcaatttgcatattgctactacaatagaaa tgcacttttttaattatttttatggccatactatatatatatgtgtgtgtgtgtgtatg tgtgtcattttactgtacagcagaaattgacacaacattgtaaatcaactaca cttaaaaaatgaagaaataaccacctgtgattatggctactgtgttggacact ttaggcatccccccacccgtccccgccccacaccctgagtgctagtga cggatgttcccacccaggggcctggagcctttatcaccagccatcggga atcagaaccgtatctcacagtccccatgcctggagcacctggaattgtgcc cttggactcgtgggtgttctgcttctcagtgggagaagcttaggttctaagtc agagcagggacagcccccatgtgctcaggacccagtgtgaaggggtctg cctcaggggacctgggggttacaagggtaagagaaggtgttcatgttgga actagaagttctttttcactgctctgaagaaaaaagctgcctcccaccctgg tacagctcttctgctaacagtgaatcaggcagaacgtgttcaagaagtgac ccagcctggtgggggccagacctgacccttgatggtccctcaacccctcc gagggtcccgcccttccttttactgctttgttgtctgtcctgagaggtttggcta atgtcgaaccaagggtgtggctggtcctgtcccctttcctgtctcacgcacc cacctctgaagtctctgtagctggttccagccgggatctggagccactccc cccgccccaggcccagtggtacagactcttgcagagtcgggggcccctg actcagccccaccgccagcgggatgtcaggccagcacccgccccactc

[0695]

		ccactgatctgggggggtgtctttccttcctccttccaaaggagcctcaga ccttcctgtggggcacgggggcagtgggattcaggaggctctgagtcag caggccggcattgaggagtataaagggaccccagttcctccccctttcact tgtggcttatcgccgccccaccctgccccaaggtcactgcggtcagtaca gtcctcagctgccagcaggtgcctgtctttacttgtgaggccgccacgctct cctgtttctccaggtctgggctctgttggaagtgggggcccgaccccggg gtaagatgggggatctgcgtgtcctgccctcagaggcctcctcctccccg caccctaacccttcagcccaacaaggctggagatctcccacatctttgg cttcgttaagagttcaacagcgccgccacccggcatgtcgctgagcagag gatggcacagggtgttaaaaaaaaaaaaaaggttgccacactccgttcggtt ttgggcccacccttcgcattcctggagcctgagtaagcggataaggctgt gaaagtgacagattcctgccacctccttccagcgctcatgcacagggacc gcccctcttcggtgtcctttgctgcacaagtgcatttgcacattcctgtctcaa tctggtttctcccccttaaaagatgggaatgtgacctgcttggagcccctcg cctcgccagggcaccccatccgtccttcaggggtggagatggactgtcc ctctgcaaggctggatgaactcagaccaaacaggccaacttgctccccaa atacgcccacccctaccgggctgcaggaattcgcctgtcaccactgctga agggtgaccttgcagccctgagagcatccccatgacttgcccaccagatg aagtctggttgtggcaggtcgcgctcagggactcccgggtcccacctggg ggtgggaggatcctcctttgctcgtggtcgccccagccacgccctcctttc caagcgccagtctccagagctccgtgccccggcggaggcggtctggctc tctctccttgcccctctctccttgcccctagcagcccttctcctaaaccctctg agcagcgggcacctcctcccgaggccctgggctaagtccccaccttcat ctcaagccttcctccttgactccctcttcccagagttccttgaaataggtggt aagtacacaccgatgacggaaaacaaagactaagaggttaaagagggct gaggattacggccccggtagggctgcgcgcgaggggtcgagtggcc gggcggtcccgtcgccgggcagacagaggtgcggttctcccgggcgcc tgcgctgccggccccgcccggagccctcccagccggcgcccagtttact catcccggagaggtgatcccgggcgcgagggcgggcgcagggcgtcc ggagaacccagtaatccgagaatgcagcatcagcccttcccaccaggca cttccttccttttcccgaacgtccagggaggggggccgcgcacttataaac tcgggccggacccgccggcctgtcagaggctgcctcgctggggctgcg cgcggcggccggacacatctggtccgagaccaacgcgagcgactgtca ctggcagctccctgcgcctctcagccccggccgggcccctgcgcttggc gtgctgacaccatgcttggggtcctggtccttggcgcgctggccctggcc ggcctggggttccccgcacccgcagagccgcagccgggtggcagcca gtgcgtcgagcacgactgcttcgcgctctacccgggccccgcgaccttcc tcaatgccagtcagatctgcgacggactgcggggccacctaatgacagtg cgctcctcggtggctgccgatgtcatttccttgctactgaacggcgacggc ggcgttggccgccggcgcctctggatcggcctgcagctgccacccggct gcggcgaccccaagcgcctcgggcccctgcgcggcttccagtgggttac gggagacaacaacaccagctatagcaggtgggcacggctcgacctcaat ggggctcccctctgcggcccgttgtgcgtcgctgtctccgctgctgaggc cactgtgcccagcgagccgatctgggaggagcagcagtgcgaagtgaa ggccgatggcttcctctgcgagttccacttcccagccacctgcaggccact ggctgtggagcccggcgccgcggctgccgccgtctcgatcacctacggc accccgttcgcggcccgcggagcggacttccaggcgctgccggtgggc agctccgccgcggtggctcccctcggcttacagctaatgtgcaccgcgcc gcccggagcggtccaggggcactgggccagggaggcgccgggcgctt gggactgcagcgtggagaacggcggctgcgagcacgcgtgcaatgcg atccctggggctccccgctgccagtgcccagccggcgccgccctgcag

[0696]

gcagacgggcgctcctgcaccgcatccgcgacgcagtcctgcaacgac
ctctgcgagcacttctgcgttcccaaccccgaccagccgggctcctactcg
tgcatgtgcgagaccggctaccggctggcggccgaccaacaccggtgc
gaggacgtggatgactgcatactggagcccagtccgtgtccgcagcgct
gtgtcaacacacagggtggcttcgagtgccactgctaccctaactacgac
ctggtggacggcgagtgtgtggagcccgtggacccgtgcttcagagcca
actgcgagtaccagtgccagcccctgaaccaaactagctacctctgcgtct
gcgccgagggcttcgcgcccattccccacgagccgcacaggtgccagat
gttttgcaaccagactgcctgtccagccgactgcgaccccaacacccagg
ctagctgtgagtgccctgaaggctacatcctggacgacggtttcatctgca
cggacatcgacgagtgcgaaaacggcggcttctgctccggggtgtgcca
caacctccccggtaccttcgagtgcatctgcgggcccgactcggcccttg
cccgccacattggcaccgactgtgactccggcaaggtggacggtggcga
cagcggctctggcgagcccccgcccagcccgacgcccggctccacctt
gactcctccggccgtggggctcgtgcattcgggcttgctcataggcatctc
catcgcgagcctgtgcctggtggtggcgcttttggcgctcctctgccacct
gcgcaagaagcagggcgccgccagggccaagatggagtacaagtgcg
cggccccttccaaggaggtagtgctgcagcacgtgcggaccgagcgga
cgccgcagagactcggatccggagagggcagaggaagtcttctaacatg
cggtgacgtggaggagaatcccggccctatgttgacaacattgctgccga
tactgctgctgtctggctgggccttttgtagccaagacgcctcagatggcct
ccaaagacttcatatgctccagatctcctacttccgcgacccctatcacgtgt
ggtaccagggcaacgcgtcgctgggggacacctaacgcacgtgctgg
aaggcccagacaccaacaccacgatcattcagctgcagcccttgcagga
gcccgagagctgggcgcgcacgcagagtggcctgcagtcctacctgctc
cagttccacggcctcgtgcgcctggtgcaccaggagcggaccttggcctt
tcctctgaccatccgctgcttcctgggctgtgagctgcctcccgagggctct
agagcccatgtcttcttcgaagtggctgtgaatgggagctcctttgtgagttt
ccggccggagagagccttgtggcaggcagacacccaggtcacctccgg
agtggtcaccttcaccctgcagcagctcaatgcctacaaccgcactcggta
tgaactgcgggaattcctggaggacacctgtgtgcagtatgtgcagaaac
atatttccgcggaaaacacgaaagggagccaaacaagccgctcctacact
tcgctggtcctgggcgtcctggtgggcagtttcatcattgctggtgtggctg
taggcatcttcctgtgcacaggtggacggcgatgttgagcgcggccgctt
ccctttagtgagggttaatgcttcgagcagacatgataagatacattgatga
gtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaa
atttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagtta
acaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggggggagatgtggga
ggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtaaaatccgataaggat
cgatgggacagccccccccccaaagccccccagggatgtaattacgtccct
cccccgctagggcagcagcgagccgcccggggctccggtccggtccg
gcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgggg
cacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctc
tttgagcctgcagacacctgggggggatacggggaaaatctagtgggaca
gccccccccccaaagccccccagggatgtaattacgtccctcccccgctagg
gcagcagcgagccgcccggggctccggtccggtccggcgctcccccg
catccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaag
gtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgc
agacacctgggggggatacggggaaaaatcgatgggacagccccccccc
aaagccccccagggatgtaattacgtccctcccccgctagggcagcagcg
agccgcccggggctccggtccggtccggcgctcccccgcatccccgag

[0697]

		ccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaaggtggcacggg atcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctggg gggatacggggaaaatctagtgggacagccccccccccaaagcccccag ggatgtaattacgtccctcccccgctagggcagcagcgagccgcccggg gctccggtccggtccggcgctcccccgcatcccgagccggcagcgtg cggggacagcccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctct gaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgggggggatacggg gaaaaatcgatagcgataaggatccactagttattaatagtaatcaattacg gggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggt aaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtca ataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtca atgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtat catatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcc tggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacat ctacgtattagtcatcgctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctg cttcactctcccatctccccccccctccccacccccaattttgtatttatttatttt tttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggggggcgcgcgc caggcggggcggggcggggcgaggggcggggcggggcgaggcgg agaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttt ttatggcgaggcggcggcggcggcccctataaaaagcgaagcgcgc ggcgggcgggagtcgctgcgttgccttcgccccgtgccccgctccgcgc cgcctcgcgccgcccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacag gtgagcgggcgggacggcccttctcctccgggctgtaattagcgcttggtt taatgacggctcgtttcttttctgtggctgcgtgaaagccttaaagggctccg ggagggccctttgtgcgggggggagcggctcgggggggtgcgtgcgtgt gtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggcccgcgctgcccggcggctg tgagcgctgcgggcgcggcgcggggctttgtgcgctccgcgtgtgcgc gaggggagcgcggccgggggcggtgccccgcggtgcgggggggctg cgaggggaacaaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgag caggggggtgtgggcgcggcggtcgggctgtaacccccccctgcacccc cctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgggtgcggggctccgtg cggggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggcgggggggtggcggca ggtgggggtgccgggcgggcggggccgcctcgggccgggggaggg ctcgggggagggcgcggcggccccggagcgccggcggctgtcgag gcgcggcgagccgcagccattgccttttatggtaatcgtgcgagagggcg cagggacttcctttgtcccaaatctggcggagccgaaatctgggaggcgc cgccgcaccccctctagcgggcgcgggcgaagcggtgcggcgccggc aggaaggaaatgggcggggagggccttcgtgcgtcgccgcgccgccgt ccccttctccatctccagcctcggggctgccgcaggggacggctgcctt cgggggggacggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccgg cggctctagagcctctgctaaccatgttcatgccttcttctttttcctacagctc ctgggcaacgtgctggttgttgtgctgtctcatcattttggcaaagaattccg ctgcgactcggcggagtcccggcggcgcgtccttgttctaacccggcgc gccctcaggatgggaatccaaggagggtctgtcctgttcgggctgctgct cgtcctggctgtcttctgccattcaggtcatagcctgcagtgctacaactgtc ctaacccaactgctgactgcaaaacagccgtcaattgttcatctgattttgat gcgtgtctcattaccaaagctgggttacaagtgtataacaagtgttggaagt ttgagcattgcaatttcaacgacgtcacaacccgcttgagggaaaatgagc taacgtactactgctgcaagaaggacctgtgtaactttaacgaacagcttga aaatggtgggacatccttatcagagaaaacagttcttctgctggtgactcca tttctggcagcagcctggagccttcatcccggatccggagagggcagag

[0698]

		gaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatcccggccctatggag cgtccgcaacccgacagcatgccccaggatttgtcagaggccctgaagg aggccaccaaggaggtgcacacccaggcagagaatgctgagttcatga ggaactttcagaagggccaggtgacccgagacggcttcaagctggtgat ggcctccctgtaccacatctatgtggccctggaggaggagattgagcgca acaaggagagcccagtcttcgcccctgtctacttcccagaagagctgcac cgcaaggctgccctggagcaggacctggccttctggtacgggccccgct ggcaggaggtcatcccctacacaccagccatgcagcgctatgtgaagcg gctccacgaggtggggcgcacagagcccgagctgctggtggcccacgc ctacacccgctacctgggtgacctgtctgggggccaggtgctcaaaaaga ttgcccagaaagccctggacctgcccagctctggcgagggcctggccttc ttcaccttccccaacattgccagtgccaccaagttcaagcagctctaccgct cccgcatgaactccctggagatgactcccgcagtcaggcagagggtgat agaagaggccaagactgcgttcctgctcaacatccagctctttgaggagtt gcaggagctgctgacccatgacaccaaggaccagagcccctcacgggc accagggcttcgccagcgggccagcaacaaagtgcaagattctgccccc gtggagactcccagagggaagcccccactcaacacccgctcccaggctc cgcttctccgatgggtccttacactcagctttctggtggcgacagttgctgta gggctttatgccatgtgagcggcgcgccggcaccggtaccaagcttaag agcgctagctggccagacatgataagatacattgatgagtttggacaaacc acaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctatt gctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattg cattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggttttttaaagca agtaaaacctctacaaatgtggtatggaattggagccccactgtgttcatctt acagatggaaatactgacattcagaggagttagttaacttgcctaggtgatt cagctaataagtgcaagaaagatttcaatccaaggtgatttgattctgaagc ctgtgctaatcacattacaccaagctacaacttcatttataaataataagtcag ctttcaagggcctttcaggtgtcctgcacttctacaagctgtgccatttagtg aacacaaaatgagccttctgatgaagtagtcttttcattatttcagatattaga acactaaaattcttagctgccagctgattgaaggctgggacaaaattcaaa catgcatctacaacaatatatatctcaatgttagtctccaaattctattgacttc aactcaagagaatataaagagctagtctttatacactctttaaggtatgatgg gtcccgatttttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagcag cgagaagcgttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgcccg ggctgtccccgcacgctgccggctcggggatgcgggggagcgccgga ccggaccggagccccgggcggctcgctgctgccctagcgggggaggg acgtaattacatccctgggggctttgggggggggctgtcccactagattttc cccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagcgtt cagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtccccg cacgctgccggctcggggatgcgggggagcgccggaccggaccgga gccccgggcggctcgctgctgccctagcgggggagggacgtaattacat ccctgggggctttgggggggggctgtcccatcggatcttctagtcctgca ggagtcaatgggaaaaacccattggagccaagtacactgactcaatagg gactttccattgggttttgcccagtacataaggtcaatagggggtgagtcaa caggaaagtcccattggagccaagtacattgagtcaatagggactttccaa tgggttttgcccagtacataaggtcaatgggaggtaagccaatgggtttttc ccattactgacatgtatacgcgtcgacgtcggcgcgttcagcctaaagcttt tttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagc gttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtccc cgcacgctgccggctcggggatgcgggggagcgccggaccggaccg gagccccgggcggctcgctgctgccctagcgggggagggacgtaatta

[0699]

		catccctgggggctttgggggggggctgtccctgcggccgcgaattcgta atcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccaca caacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatga gtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgg gaaacctgtcgtgccaggggtctagccgcggtctaggaagctttctaggg tacctctagggatccactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagtt catagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgc ctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtat gttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagt atttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagt acgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcc cagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtc atcgctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctgcttcactctcccc atctccccccccctccccaccccaattttgtatttatttatttttaattattttgtg cagcgatgggggcgggggggggggggcgcgcgccaggcggggcg gggcggggcgaggggcggggcggggcgaggcggagaggtgcggc ggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggc ggcggcggcggcggccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcggg agtcgctgcgttgccttcgccccgtgccccgctccgcgccgcctcgcgcc gcccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcg ggacggcccttctcctccgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggctc gtttcttttctgtggctgcgtgaaagccttaaagggctccgggagggccctt tgtgcgggggggagcggctcgggggggtgcgtgcgtgtgtgtgtgcgtg gggagcgccgcgtgcggcccgcgctgcccggcggctgtgagcgctgc gggcgcggcgcggggctttgtgcgctccgcgtgtgcgcgaggggagc gcggccgggggcggtgccccgcggtgcgggggggctgcgaggggaa caaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcaggggggtgt gggcgcggcggtcgggctgtaacccccccctgcacccccctccccgagt tgctgagcacggcccggcttcgggtgcggggctccgtgcggggcgtgg cgcggggctcgccgtgccgggcgggggggtggcggcaggtgggggtg ccgggcggggcggggccgcctcgggccggggagggctcgggggag gggcgcggcggccccggagcgccggcggctgtcgaggcgcggcgag ccgcagccattgccttttatggtaatcgtgcgagagggcgcagggacttcc tttgtcccaaatctggcggagccgaaatctgggaggcgccgccgcaccc cctctagcgggcgcgggcgaagcggtgcggcgccggcaggaaggaaa tgggcggggagggccttcgtgcgtcgccgcgccgccgtcccttctccat ctccagcctcggggctgccgcaggggacggctgccttcgggggggac ggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggctctagag cctctgctaaccatgttcatgccttcttcttttttcctacagctcctgggcaacgt gctggttgttgtgctgtctcatcattttggcaaagaattccgctgcgactcgg cggagtcccggcggcgcgtccttgttctaacccggcgcgccctcaggat ggagcctcccggccgccgcgagtgtcccttccttcctggcgctttcctgg gttgcttctggcggccatggtgttgctgctgtactccttctccgatgcctgtg aggagccaccaacatttgaagctatggagctcattggtaaaccaaaaccct actatgagattggtgaacgagtagattataagtgtaaaaaaggatacttctat atacctcctcttgccacccatactatttgtgatcggaatcatacatggctacct gtctcagatgacgcctgttatagagaaacatgtccatatatacgggatccttt aaatggccaagcagtccctgcaaatgggacttacgagtttggttatcagat gcactttatttgtaatgagggttattacttaattggtgaagaaattctatattgtg aacttaaaggatcagtagcaatttggagcggtaagcccccaatatgtgaaa aggttttgtgtacaccacctccaaaaataaaaaatggaaaacacacctttag

[0700]

		tgaagtagaagtatttgagtatcttgatgcagtaacttatagttgtgatcctgc acctggaccagatccattttcacttattggagagagcacgatttattgtggtg acaattcagtgtggagtcgtgctgctccagagtgtaaagtggtcaaatgtc gatttccagtagtcgaaaatggaaaacagatatcaggatttggaaaaaaatt ttactacaaagcaacagttatgtttgaatgcgataagggtttttacctcgatg gcagcgacacaattgtctgtgacagtaacagtacttgggatcccccagttc caaagtgtcttaaagtgctgcctccatctagtacaaaacctccagctttgagt cattcagtgtcgacttcttccactacaaaatctccagcgtccagtgcctcag gtcctaggcctacttacaagcctccagtctcaaattatccaggatatcctaaa cctgaggaaggaatacttgacagtttggatgtttgggtcattgctgtgattgt tattgccatagttgttggagttgcagtaatttgtgttgtcccgtacagatatctt caaaggaggaagaagaaaggcacatacctaactgatgagacccacaga gaagtaaaatttacttctctcggatccggagccacgaacttctctctgttaaa gcaagcaggagacgtggaagaaaaccccggtcctatgtggcccctggta gcggcgctgttgctgggctcggcgtgctgcggatcagctcagctactattt aataaaacaaaatctgtagaattcacgttttgtaatgacactgtcgtcattcca tgctttgttactaatatggaggcacaaaacactactgaagtatacgtaaagt ggaaatttaaaggaagagatatttacacctttgatggagctctaaacaagtc cactgtccccactgactttagtagtgcaaaaattgaagtctcacaattactaa aaggagatgcctctttgaagatggataagagtgatgctgtctcacacacag gaaactacacttgtgaagtaacagaattaaccagagaaggtgaaacgatc atcgagctaaaatatcgtgttgtttcatggttttctccaaatgaaaatattcttat tgttattttcccaatttttgctatactcctgttctggggacagtttggtattaaaa cacttaaatatagatccggtggtatggatgagaaaacaattgctttacttgtt gctggactagtgatcactgtcattgtcattgttggagccattcttttcgtccca ggtgaatattcattaaagaatgctactggccttggtttaattgtgacttctaca gggatattaatattacttcactactatgtgtttagtacagcgattggattaacct ccttcgtcattgccatattggttattcaggtgatagcctatatcctcgctgtggt tggactgagtctctgtattgcggcgtgtataccaatgcatggccctcttctga tttcaggtttgagtatcttagctctagcacaattacttggactagtttatatgaa atttgtggcttccaatcagaagactatacaacctcctaggaaagctgtagag gaacccctaatgcattcaaagaatcaaaaggaatgatgaatgatgaataa ctgaagtgggcgcgccggcaccggtaccaagcttaagagcgctagctgg ccagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatg cagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaac cattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgttt caggttcaggggggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctctac aaatgtggtatggaattggagccccactgtgttcatcttacagatggaaata ctgacattcagaggagttagttaacttgcctaggtgattcagctaataagtgc aagaaagatttcaatccaaggtgatttgattctgaagcctgtgctaatcacat tacaccaagctacaacttcatttataaataataagtcagctttcaagggccttt caggtgtcctgcacttctacaagctgtgccatttagtgaacacaaaatgagc cttctgatgaagtagtcttttcattatttcagatattagaacactaaaattcttag ctgccagctgattgaaggctgggacaaaattcaaacatgcatctacaacaa tatatatctcaatgttagtctccaaattctattgacttcaactcaagagaatata aagagctagtctttatacactctttaaggtatgatatcatctggaaagtaaca aaattgatgcaaatttgaatgaactttatcatggtgtatttacacaatgtgtttct tctccctgcaatgtatttctttctctaattccttccatttgatctttcatacacaatc tggttctgatgtatgtttttggatgcacttttcaactccaaaagacagagcta gttactttcttcctggtgctccaagcactgtatttgtatctgtattcaagcccttt gcaatattgtactggatcattatttcacctctaggatggcttccccaggcaac

[0701]

		ttgtgttcacccagagactacattttgtatcttgttgacctttgaacttccacca gtgtctaaaaataatatgtatgcaaaattacttgctatgagaatgtataattaa acaatataaaaaggagaagcaaggagagaaacacaggtgtgtatttgtgtt tgtgtgcttaaaaggcagtgtggaaaaggaagaaatgccatttatagtgag gagacaaagttatattacctcttatctggcttttaaggagattttgctgagcta aaaatcctatattcatagaaaagccttacctgagttgccaatacctcaattcta aaatacagcatagcaaaactttaacctccaaatcaagcctctacttgaatcct tttctgagggatgaataaggcataggcatcaggggctgttgccaatgtgca ttagctgtttgcagcctcaccttctttcatggagtttaagatatagtgtattttcc caaggtttgaactagctcttcatttctttatgttttaaatgcactgacctcccac attccctttttagtaaaatattcagaaataatttatcatctggaaagtaacaaaa ttgatgcaaatttgaatgaactttatcatggtgtatttacacaatgtgtttcttct ccctgcaatgtatttctttctctaattccttccatttgatctttcatacacaatctg gttctgatgtatgtttttggatgcacttttcaactccaaaagacagagctagtt actttcttcctggtgctccaagcactgtatttgtatctgtattcaagccctttgc aatattgtactggatcattatttcacctctaggatggcttccccaggcaacttg tgttcacccagagactacattttgtatcttgttgacctttgaacttccaccagtg tctaaaaataatatgtatgcaaaattacttgctatgagaatgtataattaaaca atataaaaaggagaagcaaggagagaaacacaggtgtgtatttgtgtttgt gtgcttaaaaggcagtgtggaaaaggaagaaatgccatttatagtgagga gacaaagttatattacctcttatctggcttttaaggagattttgctgagctaaa aatcctatattcatagaaaagccttacctgagttgccaatacctcaattctaaa atacagcatagcaaaactttaacctccaaatcaagcctctacttgaatccttttt ctgagggatgaataaggcataggcatcaggggctgttgccaatgtgcatta gctgtttgcagcctcaccttctttcatggagtttaagatatagtgtattttccca aggtttgaactagctcttcatttctttatgttttaaatgcactgacctcccacatt ccctttttagtaaaatattcagaaataatttatcccggcttgtcgacgacggat catctggaaagtaacaaaattgatgcaaatttgaatgaactttatcatggtgt atttacacaatgtgtttcttctccctgcaatgtatttctttctctaattccttccattt gatctttcatacacaatctggttctgatgtatgtttttggatgcacttttcaact ccaaaagacagagctagttactttcttcctggtgctccaagcactgtatttgt atctgtattcaagccctttgcaatattgtactggatcattatttcacctctagga tggcttccccaggcaacttgtgttcacccagagactacattttgtatcttgttg acctttgaacttccaccagtgtctaaaaataatatgtatgcaaaattacttgct atgagaatgtataattaaacaatataaaaaggagaagcaaggagagaaac acaggtgtgtatttgtgtttgtgtgcttaaaaggcagtgtggaaaaggaaga aatgccatttatagtgaggagacaaagttatattacctcttatctggcttttaa ggagattttgctgagctaaaaatcctatattcatagaaaagccttacctgagt tgccaatacctcaattctaaaatacagcatagcaaaactttaacctccaaatc aagcctctacttgaatccttttctgagggatgaataaggcataggcatcagg ggctgttgccaatgtgcattagctgtttgcagcctcaccttctttcatggagtt taagatatagtgtattttcccaaggtttgaactagctcttcatttctttatgtttta aatgcactgacctcccacattccctttttagtaaaatattcagaaataatttatc ccggcttgtcgacgacggcggtctccgtcgtcaggatcatccggccggc catcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggc gaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgc agcgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgaggggatcaattc tctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgt tgtttgcccctcccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccact gtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtca ttctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaaggggaggattgg

[0702]

		gaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatggcttctga ggcggaaagaaccagctgggggcgcgcacctcgaccatctccaggatg cctttgatagagctgggtcctctgcgttcctttaaagtgtttgagatcaagtcc gagaagaggtggcaagacatatttaaatcgcgctagtttaaaatacatcatt gcaatgaaaataaatgtttttattaggcagaatccagatgctcaaggccctt cataatatcccccagtttagtagttggacttagggaacaaaggaacctttaat agaaattggacagcaagaaagctctagctttagaagaactcatcaagaagt ctgtagaaggcaattctctgggagtcaggggctgcaatgccatagagcac taggaacctgtctgcccactctccccctagctcttctgctatgtccctggttg ctagggcaatgtcctggtacctgtcagccactcccagcctgccacagtcta tgaagccagagaaccttccattttcaaccatgatgttgggaaggcaggcat ccccatgagtcaccactaggtcctcaccatctggcatggatgccttgagcc tggcaaatagttcagcaggggccaggccctggtgttcttcatccaagtcat cttggtccaccaggccagcctccatcctggttctggccctctctatcctgtg cttggcctggtggtcaaaggggcaggtggctgggtcaagggtgtggagt cttctcatggcatcagccatgattgacactttctcagctggagctaggtgag aggaaaggaggtcctgcccaggcacctcacctagtaggagccagtccct tccagcttctgtgaccacatcaaggacagctgcacaggggaccccagttg ttgccaaccaggagagtctggcagcctcatcctggagctcattgagagcc ccactgaggtctgtctttacaaaaaggactggcctgccttgggctgaaagt ctgaaaactgctgcatcagagcaaccaatggtctgctgtgcccagtcatag ccaaacagtctctcaacccaggcagctggagaacctgcatgtaggccatc ttgttcaatcatgatggctcctcctgtcaggagaggaaagagaagaaggtt agtacaattgctatagtgagttgtattatactatgcttatgattaattgtcaaact agggctgcagggttcatagtgccacttttcctgcactgccccatctcctgcc caccctttcccaggcatagacagtcagtgacttaccaaactcacaggagg gagaaggcagaagctttttgcaaaagcctaggctcatgagacaataaccc tgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtaccaggtatgagtatt caacatttccgtgtcgcccttattccctttttgcggcattttgccttcctgttttt gctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttggg tgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttga gagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgct atgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtc gccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacaga aaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccat aaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgat
8	**B214 载体**	atgtctcctatgtctcatctaaatggatgaggtttgagagttcccatcacggc atggtggaaacgaatccgactaggagccataagttcacggcttcgatccct ggcctcgctcaggggttaaggatccggtgttgctgtgagctgtggtgtag gtcacagatgcggttcggatctggcgttgctgcggctgtggtgtaggctgg tggctgtagctccgatttgacccctagcctagggacctccatatgccgtgg gtatggccctaaaaagccaaataaaataaaataagtaaatggttgaggtttg acacagaaagtttatttatttatgtatttacttatctttttttttttttttttttgtctt ctgctatttcttgggctgctcccgcggcatatggaggttcccaggctaggg gtcgaattggagctacagccaccagcctacaccacagccgcagcaatgc cagatccgagccgcctctgtgacctacaccacagctcatggcaacgctgg atcgttaacccactgagcaagggctgggaccgaacccgcaacctcatggt tcctagtcggattcgttaaccactgcgccatgacgggaactcctacttatcta ttttttaaagcatatggaagttcccaggctagggggttgaatcggagctgca actgccggcttacaccacagccagagcaacgccggatctgagcagtgtct

[0703]

		gggacctacaccacagctcacagccacaccggatcctcaatccactgaat gaggccaggaatcaaacctgtgtcctcatggatactagtcagattcatttcc gctgagcaatgacaggaactcctgacacagaaattttagattaaaattgaa gatgagccccttccttttgtacgacctttgtgtgcagattttcgaggataagtc cttgagcttgaagttttagggtcatggatcctcataacagtttcctggcctgtg aggcttggatctcagtataaacagaagtgctggcagcagtagacacagca gcagctgttttcaggaacaaatactgggcacctgccttgtggacctgcctg actccaccactctcttgggtatccacaaagtggacccagaggttcagagca gccctgggatccaaatttttttaatttatttttatctttattttttgtcttttcgaaa tttttagggctacacccatgagatatggaggttcccaggctaagggtccaat cggagctacaactgccggcctacaccacagctcatggcaatgctggatcc ttaacccgctgagcgaggccagggatcaaacccacaacctcatgattcct agttggattcgttaaccactgagccacgatgggaactccctgggatgcaaa ttttgtcatctagccctaggatgtagctatcatcctgatttgagaagagaggc agagtctcaggtggcttctctctcatgaatgcagagctaagggtggccaca cgtacttgagttcatccgatgcacacagcattgtgctaaaatattgaccattt ggccctttgctgacttttggtttgagggatatgaccttcatgagcatacaga ggataatatgtatgcatgtatgcatgtgtgtacacatgtgcgcatgcatgtat atacctgcataattatgtatttgtttatgtatgcaggtgcatgtgtatgtatatat ttattatttatttatttgggggccacacccatgacatttggaagttcctgggac agagattgaatcccagccacagctttgacctacgccatggacacagcaac actggattcttaacccccctgtgccacagcgggaactcctagaagatagtatt tcatgatgatatttgactaaaaataggggtcaggctttgaagtttaaataaatt cgaccagataaatggccatccaggaagttatactttgccttgttcaaatttgg accacggggaaggtggttggcgacatgtaacagaaatctgactccagtgc aggtttcgctcccgtgacgggaagcccagaggtgggcagccctaaggct ggggctctgatttcatgatgctcttagcatcttgagtcccttccctcttcttgct tttatctcagcctcgggctgctgcaccttctgtctttgtggtgagtctacctatt ccacttagctcggcttcagggtgtatttccacgacttcgttagagtaaggttg gggccagctgtgctctgccggcaggaggtgtgcttgcaggggccatgga tgtggccaggacctaatgtgacggtggggagcaggatggggatgaggat gtgaccacagagccttgggaaccacgtcatccacgtcatacactgagagc aggtggttctcatgcaggtgcatcagaatcccgaggacggcttgtccaaa cccagatggctgggcccaagccctgagctcccgatttgggaggccttgg ctgggccccgaaatctgccttcctgactagaccgagtgatgaatggtgttc atagacaagacatacactaacactggtcttgggggctccttgccacaccct gaaggggtccgtgaaactgacggggccagagaaggtgctggttcctcca tggaaggtctcagtgaggccattctgctgcccggctgggtcacgctgggg gagtgagggtgcatcccctcctgggatctggtcaaaggcagattctgattc tggaagcacggggtagggccagagatgccaccttctaacaagcccccag gtgaagatgttgacctgggaccttatggtgggggggtggcggagctcaag gtggcagacacctccctctctctcaacctgtgtcacagcagggccatccta ctggctctcgctcggccagagatggcgatgccagaacacactggggcag ggtgtccacatttttgtcacttccactgagccctggggactgactcatttaaat gacattctcaactctttggaaagaagctgggccagaaatggaaatggcag caaacacttttgggaaacaggaagccaatttttttttttcaatcatgattttccc cagattcagagactgcttaactcccaatgaaatacttttagattacgagctaa aataccgaaaagctgtcaagctcaagaccacaggaaaacagccgaaga acaaacaccatgagaaaacagtcacagagtgcctctgcggcggatttcaa gttccagacttccttgctgtcagctgtgtgtacttgtcccgcctgcagtagga ccagctggggtttaagtctgtaccatggacactgctgccaggattctcctct

[0704]

		gcatctgctgacttccagctcttcagggccagctggccataggagcataaa ctgacatccagttccaggaggcagcatctgtccccatggcctgcaggaca ccagatcagtagaggccccagggccacctttcctgtgggggcccttgaa gggacccgggaaggctggatcttgctaaagcttccacaagtcccttccaa aggagagtaaattctaaacagaagcttttgccagtgcttctctgggatctgg cttcaggattattcctagtctgaaaagtcttcctggtggtttggacacgggca aatgcttggtgggtgggctggctctggatgcaggtgagtggggtcggaa gttctccctccttcccacaaagcttgacggagccaggggcacccgcggg cctgtggatgggagaggggtttctggtgacggactcaagtcttggcagcc cctgaccccagagcaggctccctccccacagctgctctccgtgagtccttc acttgcccaagttcaagatgtacccagttctggagctgccaaaccatcctg catcctgacgtcagccacccaagttctggggtagctggtctgccacccag gtggatgaaaagaggccacatacctgcaccagcatctgcgaatctctgaa gaacatcaataataaaaagacaactaacccgattaaaacacaggtagaga atctgaacagacattcatcggaagaagaattacgactggccaaaaagctc ataaaaagatggtcaaagtcattggtcagggaaatgtaaatcaaaccgcat tgagataccatctcactccctctcggatggctggaatgaaaaaaaacctctt ctttcctccctttcattgtcttggcacccttgtggaaattaattgactaaaattca tgaaatacaaaaatttttaggagttcccgtcgtggctcagtggttaacaaatc tgactaggaaccatgaggtttcaggttcgattcctggcctcactcagtgggt tagggatctggtgttgccatgagctgtggtgtaggtcgcagacgcagctc ggatcccgcattgctgtggctctggcgtaggccggcggctacagctctga ttcaacctctagcctgggaatagcccaagaaatggcaaaaagaccaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaactcgttttgagcatttttgcatgtgtacattgtccat ttgtgtgccttccaagatttatttttggagtctcaactctgtcattgatttatgtct ctccttaggccagaaccacactgttttggtgaccatggctttgtagtaaaattt gaaatctgaaagtgtgagccctcctgttttgtttctcttctccatgattagtttg gttattcagagtcccttgaatttccaggtgaatttttaggattagcaggaaaatt tctgcagagatggcagcagagatttttaatagggattatgttgaatctggag gttaatttcagttttgctaccttgactgtattaagtcttccagtctataagcataa gatgtctttttatttacttaggtcttttaaaatttctttgggcactcccattgtggt gcatcggaaatgaatccgactagtatccacaagaacacaggttcaatccct ggcattgctcagtgggttaaggatcctgcattgccatgaagaactgtggtg gaggccagcagctgcagctctgatttgacccctagcctgggaacttccata tgccttgggtatggccctaaaaagcaaactaagtaagtaagtaaataaata aatgaataaataaaatttctttcaaaattgtaattttgtaatttttgtaattttcaga gtgtacattttgccctttcaatacattattcctacatattttattctttttgatactat tataaatgaaatttataattaattcatttatatgaatttcattttcaatttgcatattg ctactacaatagaaatgcacttttttaattatttttatggccataccatatatatat gtgtgtgtgtgtgtatgtgtgtcattttactgtacagcagaaattgacacaaca ttgtaaatcaactacacttaaaaaatgaagaaataaccacctgtgattatggc tactgtgttggacactttaggcatccccccacccgtccccgccccacacc cctgagtgctagtgacggatgttcccacccaggggggcctggagcctttatc accagccatcgggaatcagaaccgtatctcacagtccccatgcctgtagc acctggaattgtgcccttggactcgtgggtgttctgcttctcagtgggagaa gcttaggttctaagtcagagcagggacagcccccatgtgctcaggaccca gtgtgaaggggtctgcctcaggggacctgggggttacaagggtaagaga aggtgttcatgttggaactagaagttctttttcaccgctctgaagaaaaaagc tgcctcccacccttggtacagctcttctgctaacagtgaatcaggcagaac gtgttcaagaagtgacccagcctggtgggggccagacctgacccttgatg gtccctcaaccctccgagggtcccgcccttcctttactgctttgttgtctgtc

[0705]

		ctgagaggtttggctaatgtcgaaccaagggtgtggctggtcctgtcccctt tcctgtctcacgcacccacctctgaagtctctgtagctggttccagccggga tctggagccactccccccgccccaggcccagtggtacagactcttgcaga gtcgggggcccctgactcagccccaccgccagcgggatgtcaggccag cacccgccccactcccactgatctgggggggggtgtctttccttcctccttcc aaaggagcctcagaccttcctgtggggcacgggggcagtgggattcagg aggctctgagtcagcaggccggcattgaggagtataaagggaccccagt tcctcccccctttcacttgtggcttatcgccgccccaccctgccccaaggtca ctgcggtcagtacagtcctcagctgccagcaggtgcctgtctttacttgtga ggccgccacgctctcctgtttctccaggtctgggctctgttggaagtgggg gcccgaccccagggtaagatgggggatctgcgtgtcctgccctcagagg cctcctcctccccgcacccctaacccttcagcccaacaaggctggagatc tcccacatctttggcttcgttaagagttcaacagcgccgccacccggcatgt cgctgagcagaggatggcacagggtgttaaaaaaaaaaaaaaggttgcca cactccgttcggttttgggcccacccttcgcattcctggagcctgagtaag cggataaggctgtgaaagtgacagattcctgccacctccttccagcgctca tgcacagggaccgcccctcttcggtgtcctttgctgcacaagtgcatttgca cattcctgtctcaatctggtttctcccccttaaaagatgggaatgtgacctgct tggagcccctcgcctcgccagggcaccccatccgtcccttcaggggtgg agatggactgtccctctgcaaggctggatgaactcagaccaaacaggcca acttgctccccaaatacgcccacccctaccgggctgcagaaattcgcatgt caccactgctgaagggtgaccttgcagccctgagagcatccccatgactt gcccaccagatgaagtctggttgtggcaggtcgcgctcagggactcccg ggtcccacctgggggtgggaggatcctccttgctcgtggtcgccccaga cacgccctcctttccaagcgccagtctccagagctccgtgccccggcgga ggcggtctggctctctctccttgcccctctctccttgcccctagcagcccttc tcctaaaccctctgagcagcgggcacctcctcccgaggccctgggctaag tccccacccttcatctcaagccttcctccttgactccctcttcccagagttcct tgaaataggtggtaagtacacaccgatgacggaaaacaaagactaagag gttaaagagggctgaggattacggccccggtagggctgcgcgcgaggg ggtcgagtggccgggcggtcccgtcgccgggcagacagaggtgcggtt ctcccgggcgcctgcgctgccggccccgcccggagccctcccagccgg cgcccagtttactcatcccggagaggtgatcccgggcgcgagggcggg cgcagggcgtccggagaacccagtaatccgagaatgcagcatcagccct tcccaccaggcacttccttccttttcccgaacgtccagggaggggggccg cgcacttataaactcgggccggacccgccggcctgtcagaggctgcctc gctggggctgcgcgcggcggccggacacatctggtccgagaccaacgc gagcgactgtcactggcagctccctgcgcctctcagccccggccgggcc cctgcgcttggcgtgctgacaccatgcttggggtcctggtccttggcgcgc tggccctggccggcctggggttccccgcacccgcagagccgcagccgg gtggcagccagtgcgtcgagcacgactgcttcgcgctctacccgggccc cgcgaccttcctcaatgccagtcagatctgcgacggactgcggggccac ctaatgacagtgcgctcctcggtggctgccgatgtcatttccttgctactgaa cggcgacggcggcgttggccgccggcgcctctggatcggcctgcagct gccacccggctgcggcgaccccaagcgcctcgggcccctgcgcggctt ccagtgggttacgggagacaacaacaccagctatagcaggtgggcacg gctcgacctcaatggggctcccctctgcggcccgttgtgcgtcgctgtctc cgctgctgaggccactgtgcccagcgagccgatctgggaggagcagca gtgcgaagtgaaggccgatggcttcctctgcgagttccacttcccagccac ctgcaggccactggctgtggagcccggcgccgcggctgccgccgtctc gatcacctacggcaccccgttcgcggcccgcggagcggacttccaggc

[0706]

		gctgccggtgggcagctccgccgcggtggctcccctcggcttacagcta atgtgcaccgcgccgcccggagcggtccaggggcactgggccaggga ggcgccgggcgcttgggactgcagcgtggagaacggcggctgcgagc acgcgtgcaatgcgatccctggggctccccgctgccagtgcccagccgg cgccgccctgcaggcagacgggcgctcctgcaccgcatccgcgacgca gtcctgcaacgacctctgcgagcacttctgcgttcccaaccccgaccagc cgggctcctactcgtgcatgtgcgagaccggctaccggctggcggccga ccaacaccggtgcgaggacgtggatgactgcatactggagcccagtccg tgtccgcagcgctgtgtcaacacacagggtggcttcgagtgccactgcta ccctaactacgacctggtggacggcgagtgtgtggagcccgtggacccg tgcttcagagccaactgcgagtaccagtgccagcccctgaaccaaactag ctacctctgcgtctgcgccgagggcttcgcgcccattccccacgagccgc acaggtgccagatgttttgcaaccagactgcctgtccagccgactgcgac cccaacacccaggctagctgtgagtgccctgaaggctacatcctggacga cggtttcatctgcacggacatcgacgagtgcgaaaacggcggcttctgct ccggggtgtgccacaacctccccggtaccttcgagtgcatctgcgggccc gactcggcccttgcccgccacattggcaccgactgtgactccggcaaggt ggacggtggcgacagcggctctggcgagcccccgcccagcccgacgc ccggctccaccttgactcctccggccgtggggctcgtgcattcgggcttgc tcataggcatctccatcgcgagcctgtgcctggtggtggcgcttttggcgct cctctgccacctgcgcaagaagcagggcgccgccagggccaagatgga gtacaagtgcgcggcccccttccaaggaggtagtgctgcagcacgtgcgg accgagcggacgccgcagagactcggatccggagagggcagaggaa gtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatcccggccctatgttgacaa cattgctgccgatactgctgctgtctggctgggccttttgtagccaagacgc ctcagatggcctccaaagacttcatatgctccagatctcctacttccgcgac ccctatcacgtgtggtaccagggcaacgcgtcgctgggggacacctaa cgcacgtgctggaaggcccagacaccaacaccacgatcattcagctgca gcccttgcaggagcccgagagctgggcgcgcacgcagagtggcctgca gtcctacctgctccagttccacggcctcgtgcgcctggtgcaccaggagc ggaccttggcctttcctctgaccatccgctgcttcctgggctgtgagctgcc tcccgagggctctagagcccatgtcttcttcgaagtggctgtgaatgggag ctcctttgtgagtttccggccggagagagccttgtggcaggcagacaccc aggtcacctccggagtggtcaccttcaccctgcagcagctcaatgcctaca accgcactcggtatgaactgcgggaattcctggaggacacctgtgtgcag tatgtgcagaaacatatttccgcggaaaacacgaaagggagccaaacaa gccgctcctacacttcgctggtcctgggcgtcctggtgggcagtttcatcat tgctggtgtggctgtaggcatcttcctgtgcacaggtggacggcgatgttg agcgcggccgcttcccttagtgagggttaatgcttcgagcagacatgata agatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaa tgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgc aataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggg ggagatgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtaaa atccgataaggatcgatgggacagccccccccccaaagcccccagggat gtaattacgtccctcccccgctagggcagcagcgagccgcccggggctc cggtccggtccggcgctccccccgcatccccgagccggcagcgtgcggg gacagcccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaac gcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgggggggatacggggaaa atctagtgggacagccccccccccaaagcccccagggatgtaattacgtcc ctcccccgctagggcagcagcgagccgcccggggctccggtccggtcc ggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgg

[0707]

		gcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgct ctttgagcctgcagacacctgggggatacggggaaaaatcgatgggac agccccccccaaagccccagggatgtaattacgtccctcccccgctag ggcagcagcgagccgcccggggctccggtccggtccggcgctccccc gcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaa ggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctg cagacacctgggggatacggggaaaatctagtgggacagcccccccc caaagcccccagggatgtaattacgtccctcccccgctagggcagcagc gagccgcccggggctccggtccggtccggcgctcccccgcatccccga gccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaaggtggcacgg gatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgg ggggatacggggaaaaatcgatagcgataaggatccactagttattaata gtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgtta cataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccg cccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggact ttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcag tacatcaagtgtatcatatgccaagtacgcccccctattgacgtcaatgacgg taaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcct acttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatgggtcgaggtga gccccacgttctgcttcactctcccatctccccccctcccccacccccaat tttgtatttatttatttttttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggg ggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgaggggcggggcg gggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgct ccgaaagtttccttttatggcgaggcggcggcggcggccctataaaa agcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgttgccttcgccccgtg ccccgctccgcgccgcctcgcgccgcccgccccggctctgactgaccg cgttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctccgggctgt aattagcgcttggtttaatgacggctcgtttcttttctgtggctgcgtgaaagc cttaaagggctccgggagggccctttgtgcgggggggagcggctcggg gggtgcgtgcgtgtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggcccgcg ctgcccggcggctgtgagcgctgcgggcgcggcgcggggctttgtgcg ctccgcgtgtgcgcgaggggagcgcggccgggggcggtgccccgcg gtgcgggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcggggtgtgtg cgtgggggggtgagcaggggtgtgggcgcggcggtcgggctgtaac ccccccctgcaccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgg gtgcggggctccgtgcggggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggc gggggtggcggcaggtgggggtgccgggcggggcggggccgcctc gggccggggagggctcgggggaggggcgcggcggccccggagcgc cggcggctgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgccttttatggtaat cgtgcgagagggcgcagggacttcctttgtcccaaatctggcggagccg aaatctgggaggcgccgccgcaccccctctagcgggcgcgggcgaag cggtgcggcgccggcaggaaggaaatgggcggggagggccttcgtgc gtcgccgcgccgccgtcccctttctccatctccagcctcggggctgccgca gggggacggctgccttcgggggggacggggcagggcggggttcggct tctggcgtgtgaccggcggctctagagcctctgctaaccatgttcatgcctt cttctttttcctacagctcctgggcaacgtgctggttgttgtgctgtctcatcat tttggcaaagaattccgctgcgactcggcggagtcccggcggcgcgtcct tgttctaacccggcgcgcccctcaggatgggaatccaaggagggtctgtcc tgttcgggctgctgctcgtcctggctgtcttctgccattcaggtcatagcctg cagtgctacaactgtcctaacccaactgctgactgcaaaacagccgtcaat tgttcatctgattttgatgcgtgtctcattaccaaagctgggttacaagtgtata

[0708]

		acaagtgttggaagtttgagcattgcaatttcaacgacgtcacaacccgctt gagggaaaatgagctaacgtactactgctgcaagaaggacctgtgtaactt taacgaacagcttgaaaatggtgggacatccttatcagagaaaacagttctt ctgctggtgactccatttctggcagcagcctggagccttcatcccggatcc ggagagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggaggagaatc ccggccctatggagcgtccgcaacccgacagcatgccccaggatttgtca gaggccctgaaggaggccaccaaggaggtgcacacccaggcagagaa tgctgagttcatgaggaactttcagaagggccaggtgacccgagacggct tcaagctggtgatggcctccctgtaccacatctatgtggccctggaggagg agattgagcgcaacaaggagagcccagtcttcgcccctgtctacttccca gaagagctgcaccgcaaggctgccctggagcaggacctggccttctggt acgggccccgctggcaggaggtcatcccctacacaccagccatgcagc gctatgtgaagcggctccacgaggtggggcgcacagagcccgagctgc tggtggcccacgcctacacccgctacctgggtgacctgtctgggggcca ggtgctcaaaaagattgcccagaaagccctggacctgcccagctctggc gagggcctggccttcttcaccttccccaacattgccagtgccaccaagttc aagcagctctaccgctcccgcatgaactccctggagatgactcccgcagt caggcagagggtgatagaagaggccaagactgcgttcctgctcaacatc cagctctttgaggagttgcaggagctgctgacccatgacaccaaggacca gagcccctcacgggcaccagggcttcgccagcgggccagcaacaaagt gcaagattctgcccccgtggagactcccagagggaagcccccactcaac acccgctcccaggctccgcttctccgatgggtccttacactcagctttctgg tggcgacagttgctgtagggctttatgccatgtgagcggcgcgccggcac cggtaccaagcttaagagcgctagctggccagacatgataagatacattg atgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgt gaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaag ttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgg gaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtatggaattggagc cccactgtgttcatcttacagatggaaatactgacattcagaggagttagtta acttgcctaggtgattcagctaataagtgcaagaaagatttcaatccaaggt gatttgattctgaagcctgtgctaatcacattacaccaagctacaacttcattt ataaataataagtcagctttcaagggcctttcaggtgtcctgcacttctacaa gctgtgccatttagtgaacacaaaatgagccttctgatgaagtagtcttttcat tatttcagatattagaacactaaaattcttagctgccagctgattgaaggctg ggacaaaattcaaacatgcatctacaacaatatatatctcaatgttagtctcc aaattctattgacttcaactcaagagaatataaagagctagtctttatacactc tttaaggtatgatgggtcccgatttttccccgtatccccccaggtgtctgcag gctcaaagagcagcgagaagcgttcagaggaaagcgatcccgtgccac cttccccgtgcccgggctgtccccgcacgctgccggctcggggatgcgg gggagcgccggaccggaccggagccccgggcggctcgctgctgccct agcgggggagggacgtaattacatccctgggggctttgggggggggct gtcccactagattttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagag cagcgagaagcgttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgc ccgggctgtccccgcacgctgccggctcggggatgcgggggagcgcc ggaccggaccggagccccgggcggctcgctgctgccctagcgggggga gggacgtaattacatccctgggggctttgggggggggctgtcccatcgga tcttctagtcctgcaggagtcaatgggaaaaacccattggagccaagtaca ctgactcaatagggactttccattgggttttgcccagtacataaggtcaatag ggggtgagtcaacaggaaagtcccattggagccaagtacattgagtcaat agggactttccaatgggttttgcccagtacataaggtcaatgggaggtaag ccaatgggtttttcccattactgacatgtatacgcgtcgacgtcggcgcgttc

[0709]

		agcctaaagctttttttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagag cagcgagaagcgttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgc ccgggctgtccccgcacgctgccggctcggggatgcgggggagcgcc ggaccggaccggagccccgggcggctcgctgctgccctagcgggggga gggacgtaattacatccctgggggctttgggggggggctgtccctgcgg ccgcgaattcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgc tcacaattccacacaacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctgg ggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccg ctttccagtcgggaaacctgtcgtgccaggggtctagccgcggtctagga agctttctagggtacctctagggatccactagttattaatagtaatcaattacg gggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggt aaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtca ataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtca atgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtat catatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcc tggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacat ctacgtattagtcatcgctattaccatgggtcgaggtgagccccacgttctg cttcactctcccatctccccccccctccccacccccaattttgtatttatttattt tttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggggggcgcgcgc caggcggggcggggcggggcgaggggcggggcggggcgaggcgg agaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttt ttatggcgaggcggcggcggcggcgccctataaaaagcgaagcgcgc ggcgggcgggagtcgctgcgttgccttcgccccgtgccccgctccgcgc cgcctcgcgccgcccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacag gtgagcgggcgggacggcccttctcctccgggctgtaattagcgcttggtt taatgacggctcgtttcttttctgtggctgcgtgaaagccttaaagggctccg ggagggccctttgtgcgggggggagcggctcgggggggtgcgtgcgtgt gtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggcccgcgctgcccggcggctg tgagcgctgcgggcgcggcgcggggctttgtgcgctccgcgtgtgcgc gaggggagcgcggccgggggcggtgccccgcggtgcgggggggctg cgaggggaacaaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgag caggggggtgtgggcgcggcggtcgggctgtaacccccccctgcacccc cctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgggtgcggggctccgtg cggggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggcgggggggtggcggca ggtgggggtgccgggcggggcggggccgcctcgggccggggaggg ctcgggggaggggcgcggcggcccccggagcgccggcggctgtcgag gcgcggcgagccgcagccattgccttttatggtaatcgtgcgagagggcg cagggacttcctttgtcccaaatctggcggagccgaaatctgggaggcgc cgccgcaccccctctagcgggcgcgggcgaagcggtgcggcgccggc aggaaggaaatgggcggggagggccttcgtgcgtcgccgcgccgccgt ccccttctccatctccagcctcggggctgccgcaggggacggctgcctt cgggggggacggggcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccgg cggctctagagcctctgctaaccatgttcatgccttcttctttttcctacagctc ctgggcaacgtgctggttgttgtgctgtctcatcattttggcaaagaattccg ctgcgactcggcggagtcccggcggcgcgtccttgttctaacccggcgc gccctcaggatggagcctcccggccgccgcgagtgtcccttccttcctg gcgctttcctgggttgcttctggcggccatggtgttgctgctgtactccttctc cgatgcctgtgaggagccaccaacatttgaagctatggagctcattggtaa accaaaaccctactatgagattggtgaacgagtagattataagtgtaaaaa aggatacttctatatacctcctcttgccacccatactatttgtgatcggaatca tacatggctacctgtctcagatgacgcctgttatagagaaacatgtccatata

[0710]

		tacgggatcctttaaatggccaagcagtccctgcaaatgggacttacgagt ttggttatcagatgcactttatttgtaatgagggttattacttaattggtgaaga aattctatattgtgaacttaaaggatcagtagcaatttggagcggtaagccc ccaatatgtgaaaaggttttgtgtacaccacctccaaaaataaaaaatggaa aacacacctttagtgaagtagaagtatttgagtatcttgatgcagtaacttata gttgtgatcctgcacctggaccagatccattttcacttattggagagagcac gatttattgtggtgacaattcagtgtggagtcgtgctgctccagagtgtaaa gtggtcaaatgtcgatttccagtagtcgaaaatggaaaacagatatcagga tttggaaaaaaattttactacaaagcaacagttatgtttgaatgcgataaggg tttttacctcgatggcagcgacacaattgtctgtgacagtaacagtacttggg atcccccagttccaaagtgtcttaaagtgctgcctccatctagtacaaaacct ccagctttgagtcattcagtgtcgacttcttccactacaaaatctccagcgtc cagtgcctcaggtcctaggcctacttacaagcctccagtctcaaattatcca ggatatcctaaacctgaggaaggaatacttgacagtttggatgtttgggtca ttgctgtgattgttattgccatagttgttggagttgcagtaatttgtgttgtccc gtacagatatcttcaaaggaggaagaagaaaggcacatacctaactgatg agacccacagagaagtaaaatttacttctctcggatccggagccacgaact tctctctgttaaagcaagcaggagacgtggaagaaaaccccggtcctatg accgtcgcgcggccgagcgtgcccgcggcgctgcccctcctcggggag ctgccccggctgctgctgctggtgctgttgtgcctgccggccgtgtggggt gactgtggccttcccccagatgtacctaatgcccagccagctttggaaggc cgtacaagttttcccgaggatactgtaataacgtacaaatgtgaagaaagct ttgtgaaaattcctggcgagaaggactcagtgatctgccttaagggcagtc aatggtcagatattgaagagttctgcaatcgtagctgcgaggtgccaacaa ggctaaattctgcatccctcaaacagccttatatcactcagaattattttccag tcggtactgttgtggaatatgagtgccgtccaggttacagaagagaaccttc tctatcaccaaaactaacttgccttcagaatttaaaatggtccacagcagtcg aattttgtaaaaagaaatcatgccctaatccgggagaaatacgaaatggtc agattgatgtaccaggtggcatattatttggtgcaaccatctccttctcatgta acacagggtacaaattatttggctcgacttctagtttttgtcttatttcaggcag ctctgtccagtggagtgacccgttgccagagtgcagagaaatttattgccc agcaccaccacaaattgacaatggaataattcaaggggaacgtgaccatt atggatatagacagtctgtaacgtatgcatgtaataaaggattcaccatgatt ggagagcactctatttattgtactgtgaataatgatgaaggagagtggagtg gcccaccacctgaatgcagaggaaaatctctaacttccaaggtcccacca acagttcagaaacctaccacagtaaatgttccaactacagaagtctcacca acttctcagaaaaccaccacaaaaaccaccacaccaaatgctcaagcaac acggagtacacctgtttccaggacaaccaagcattttcatgaaacaacccc aaataaaggaagtggaaccacttcaggtactacccgtcttctatctgggca cacgtgtttcacgttgacaggtttgcttgggacgctagtaaccatgggcttg ctgacttagggcgcgccggcaccggtaccaagcttaagagcgctagctg gccagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaat gcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaa ccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgt ttcaggttcaggggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctcta caaatgtggtatggaattggagccccactgtgttcatcttacagatggaaat actgacattcagaggagttagttaacttgcctaggtgattcagctaataagtg caagaaagatttcaatccaaggtgatttgattctgaagcctgtgctaatcaca ttacaccaagctacaacttcatttataaataataagtcagctttcaagggcctt tcaggtgtcctgcacttctacaagctgtgccatttagtgaacacaaaatgag ccttctgatgaagtagtcttttcattatttcagatattagaacactaaaattctta

[0711]

		gctgccagctgattgaaggctgggacaaaattcaaacatgcatctacaaca atatatatctcaatgttagtctccaaattctattgacttcaactcaagagaatat aaagagctagtctttatacactctttaaggtatgatatcatctggaaagtaac aaaattgatgcaaatttgaatgaactttatcatggtgtatttacacaatgtgttt cttctccctgcaatgtatttctttctctaattccttccatttgatctttcatacacaa tctggttctgatgtatgttttttggatgcacttttcaactccaaaagacagagct agttactttcttcctggtgctccaagcactgtatttgtatctgtattcaagccctt tgcaatattgtactggatcattatttcacctctaggatggcttccccaggcaa cttgtgttcacccagagactacattttgtatcttgttgacctttgaacttccacc agtgtctaaaaataatatgtatgcaaaattacttgctatgagaatgtataatta aacaatataaaaaggagaagcaaggagagaaacacaggtgtgtatttgtg tttgtgtgcttaaaaggcagtgtggaaaaggaagaaatgccatttatagtga ggagacaaagttatattacctcttatctggcttttaaggagattttgctgagct aaaaatcctatattcatagaaaagccttacctgagttgccaatacctcaattct aaaatacagcatagcaaaactttaacctccaaatcaagcctctacttgaatc cttttctgagggatgaataaggcataggcatcaggggctgttgccaatgtg cattagctgtttgcagcctcaccttctttcatggagtttaagatatagtgtatttt cccaaggtttgaactagctcttcatttctttatgttttaaatgcactgacctccc acattccctttttagtaaaatattcagaaataatttatcatctggaaagtaacaa aattgatgcaaatttgaatgaactttatcatggtgtatttacacaatgtgtttctt ctccctgcaatgtatttctttctctaattccttccatttgatctttcatacacaatct ggttctgatgtatgtttttggatgcacttttcaactccaaaagacagagctag ttactttcttcctggtgctccaagcactgtatttgtatctgtattcaagccctttg caatattgtactggatcattatttcacctctaggatggcttccccaggcaactt gtgttcacccagagactacattttgtatcttgttgacctttgaacttccaccagt gtctaaaaataatatgtatgcaaaattacttgctatgagaatgtataattaaac aatataaaaaggagaagcaaggagagaaacacaggtgtgtatttgtgtttg tgtgcttaaaaggcagtgtggaaaaggaagaaatgccatttatagtgagga gacaaagttatattacctcttatctggcttttaaggagattttgctgagctaaa aatcctatattcatagaaaagccttacctgagttgccaatacctcaattctaaa atacagcatagcaaaactttaacctccaaatcaagcctctacttgaatccttttt ctgagggatgaataaggcataggcatcaggggctgttgccaatgtgcatta gctgtttgcagcctcaccttctttcatggagtttaagatatagtgtattttccca aggtttgaactagctcttcatttctttatgttttaaatgcactgacctcccacatt ccctttttagtaaaatattcagaaataatttatcccggcttgtcgacgacggat catctggaaagtaacaaaattgatgcaaatttgaatgaactttatcatggtgt atttacacaatgtgtttcttctccctgcaatgtatttctttctct- attccttccatttgatctttcatacacaatctggttctgatgtatgtttttggatg cacttttcaactccaaaagacagagctagttactttcttcctggtgctccaag cactgtatttgtatctgtattcaagccctttgcaatattgtactggatcattatttc acctctaggatggcttccccaggcaacttgtgttcacccagagactacatttt gtatcttgttgacctttgaacttccaccagtgtctaaaaataatatgtatgcaa aattacttgctatgagaatgtataattaaacaatataaaaaggagaagcaag gagagaaacacaggtgtgtatttgtgtttgtgtgcttaaaaggcagtgtgga aaaggaagaaatgccatttatagtgaggagacaaagttatattacctcttatc tggcttttaaggagattttgctgagctaaaaatcctatattcatagaaaagcct tacctgagttgccaatacctcaattctaaaatacagcatagcaaaactttaac ctccaaatcaagcctctacttgaatccttttctgagggatgaataaggcatag gcatcaggggctgttgccaatgtgcattagctgtttgcagcctcaccttctttt catggagtttaagatatagtgtattttcccaaggtttgaactagctcttcatttct ttatgttttaaatgcactgacctcccacattccctttttagtaaaatattcagaa

[0712]

		ataatttatcccggcttgtcgacggcgtccgtcgtcaggatcatccatcagg acatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgg gctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgc atcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgaggggatcaattctctaga gctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttg cccctcccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctt tcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctatt ctgggggtggggtggggcaggacagcaaggggaggattgggaag acaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatggcttctgaggcg gaaagaaccagctgggggcgcgcacctcgaccatctccaggatgccttt gatagagctgggtcctctgcgttcctttaaagtgtttgagatcaagtccgag aagaggtggcaagcgatcgcgacatatttaaatcgcgctagtttaaaatac atcattgcaatgaaaataaatgtttttttattaggcagaatccagatgctcaag gcccttcataatatcccccagtttagtagttggacttagggaacaaaggaac ctttaatagaaattggacagcaagaaagctctagctttagaagaactcatca agaagtctgtagaaggcaattctctgggagtcaggggctgcaatgccata gagcactaggaacctgtctgcccactctccccctagctcttctgctatgtcc ctggttgctagggcaatgtcctggtacctgtcagccactcccagcctgcca cagtctatgaagccagagaaccttccattttcaaccatgatgttgggaaggc aggcatccccatgagtcaccactaggtcctcaccatctggcatggatgcct tgagcctggcaaatagttcagcaggggccaggccctggtgttcttcatcca agtcatcttggtccaccaggccagcctccatcctggttctggccctctctatc ctgtgcttggcctggtggtcaaaggggcaggtggctgggtcaagggtgtg gagtcttctcatggcatcagccatgattgacactttctcagctggagctaggt gagaggaaaggaggtcctgcccaggcacctcacctagtaggagccagt ccttccagcttctgtgaccacatcaaggacagctgcacaggggacccca gttgttgccaaccaggagagtctggcagcctcatcctggagctcattgaga gccccactgaggtctgtctttacaaaaaggactggcctgccttgggctgaa agtctgaaaactgctgcatcagagcaaccaatggtctgctgtgcccagtca tagccaaacagtctctcaacccaggcagctggagaacctgcatgtaggcc atcttgttcaatcatgatggctcctcctgtcaggagaggaaagagaagaag gttagtacaattgctatagtgagttgtattatactatgcttatgattaattgtcaa actagggctgcagggttcatagtgccacttttcctgcactgccccatctcct gcccaccctttcccaggcatagacagtcagtgacttaccaaactcacagg agggagaaggcagaagctttttgcaaaagcctaggctcatgagacaataa ccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtaccaggtatgagt attcaacatttccgtgtcgcccttattccctttttgcggcattttgccttcctgtt tttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttg ggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatcctt gagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttct gctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcg gtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcac agaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgc cataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcgg aggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaac tcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacg agcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaacta ttaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggat ggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctg gctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtat cattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatcta

[0713]

		cacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgct gagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttact catatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtg aagatccttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttcc actgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttt ttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcg gtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactgg cttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagtta ggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgcta atcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggt tggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaac gggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccga actgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaag ggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacagga gagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcc tgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcag gggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggtt cctggccttttgctggccttttgctcacatggctcgacagatttaattaacaag accgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcgg ctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgtt gtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccgggg caggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatgg ctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcg accaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaag ccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcg ccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatgcccgacggcgag gatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaa aatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggat cgctggcctcgatggccgtgatacggcctgcaggatcatttgccagccat ctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcc cactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatgccggcagcgtgcggg gacagcccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaac gcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgggggggatacggggaaa agttagtttaaacgttcgcgatagtatacggcctgcaggatgactttggcct cgatggccgtgccagggcgtgcccttgggctccccgggcgcggcgatta agacgt
9	**B217 载体**	caagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagc gcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcg acgttgtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgcc ggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatc atggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgccc attcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatg gaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggct cgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcatgcccgacgg cgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggt ggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggc ggatcgctggcctcgatggccgtgccagggcgtgcccttgggctccccg ggcgcgttaattaagacgtgggtcccgatttttccccgtatccccccaggtg tctgcaggctcaaagagcagcgagaagcgttcagaggaaagcgatccc gtgccaccttccccgtgcccgggctgtccccgcacgctgccggctcggg

[0714]

		gatgcgggggagcgccggaccggaccggagccccgggcggctcgct gctgccctagcgggggagggacgtaattacatccctgggggctttgggg gggggctgtcccactagattttccccgtatccccccaggtgtctgcaggct caaagagcagcgagaagcgttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttc cccgtgcccgggctgtccccgcacgctgccggctcggggatgcggggg agcgccggaccggaccggagccccgggcggctcgctgctgccctagc gggggagggacgtaattacatccctgggggctttgggggggggctgtcc catcggatcttctagtcctgcaggtttaaaccttaagtgtacaaaaaagcag gctttaaaggaaccaattcagtcgactggatccggtaccaaggtcgggca ggaagagggcctatttcccatgattccttcatatttgcatatacgatacaagg ctgttagagagataattagaattaatttgactgtaaacacaaagatattagta caaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttgcagttttaaaa ttatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgattt cttggctttatatatcttgtggaaaggacgaaacaccgtagttcaggtgaac ggcactgttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttat caacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctttttttctagacccatgtaca aaaaagcaggctttaaaggaaccaattcagtcgactggatccggtaccaa ggtcgggcaggaagagggcctatttcccatgattccttcatatttgcatatac gatacaaggctgttagagagataattagaattaatttgactgtaaacacaaa gatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttg cagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaa gtatttcgatttcttggctttatatatcttgtggaaaggacgaaacaccggac ggaccccatctgtccaggttttagagctagaaatagcaagttaaaataagg ctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctttttttctag aggtaccgagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgaagagtttact ccctatcagtgatagagaacgtatgcagactttactccctatcagtgataga gaacgtataaggagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgaccagtt tactccctatcagtgatagagaacgtatctacagtttactccctatcagtgata gagaacgtatatccagtttactccctatcagtgatagagaacgtataagcttt aggcgtgtacggtgggcgcctataaaagcagagctcgtttagtgaaccgt cagatcgcctggagcaattccacaacactttgtcttataccaactttccgta ccacttcctaccctcgtaaaaccggtgccaccatggactataaggaccac gacggagactacaaggatcatgatattgattacaaagacgatgacgataa gatggccccaaagaagaagcggaaggtcggtatccacggagtcccagc agccgacaagaagtacagcatcggcctggacatcggcaccaactctgtg ggctgggccgtgatcaccgacgagtacaaggtgcccagcaagaaattca aggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcg gagccctgctgttcgacagcggcgaaacagccgaggccacccggctga agagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggatctgct atctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttc ttccacagactggaagagtccttcctggtggaagaggataagaagcacga gcggcaccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgag aagtaccccaccatctaccacctgagaaagaaactggtggacagcaccg acaaggccgacctgcggctgatctatctggccctggcccacatgatcaag ttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaaccccgacaacagcg acgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcg aggaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgt ctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagct gcccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagc ctgggcctgaccccaacttcaagagcaacttcgacctggccgaggatgc caaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctggacaacctg

[0715]

		ctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaaga acctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgag atcaccaaggcccccctgagcgcctctatgatcaagagatacgacgagc accaccaggacctgaccctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcct gagaagtacaaagagattttcttcgaccagagcaagaacggctacgccg gctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagttcatcaag cccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctga acagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagca tccccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggca ggaagatttttacccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaaga tcctgaccttccgcatcccctactacgtgggccctctggccaggggaaac agcagattcgcctggatgaccagaaagagcgaggaaaccatcaccccct ggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcat cgagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctg cccaagcacagcctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacgagctgacc aaagtgaaatacgtgaccgagggaatgagaaagcccgccttcctgagcg gcgagcagaaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaa agtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaaaatcgagtgct tcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctg ggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggac aatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgaccctgacact gtttgaggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccac ctgttcgacgacaaagtgatgaagcagctgaagcggcggagatacaccg gctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccgggacaagc agtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcgccaac agaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcctgaccttaaagagga catccagaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagca cattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcaga cagtgaaggtggtggacgagctcgtgaaagtgatgggccggcacaagc ccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaaccagaccacccaga agggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggc atcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaaca cccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcg ggatatgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacg atgtggaccatatcgtgcctcagagctttctgaaggacgactccatcgaca acaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaagagcgacaac gtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagc tgctgaacgccaagctgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaag gccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaag agacagctggtggaaacccggcagatcacaaagcacgtggcacagatc ctggactcccggatgaacactaagtacgacgagaatgacaagctgatccg ggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctggtgtccgatttccgga aggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgccc acgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagta ccctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacg tgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccg ccaagtacttcttctacagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattacc ctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcgagacaaacggc gaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgccaccgtgc ggaaagtgctgagcatgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggt gcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcctgcccaagaggaacagc

[0716]

		gataagctgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggc ggcttcgacagccccaccgtggcctattctgtgctggtggtggccaaagtg gaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaagagctgctgggg atcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgactttctg gaagccaagggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgc ctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggcc tctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaat atgtgaacttcctgtacctggccagccactatgagaagctgaagggctccc ccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtggaacagcacaagcactac ctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagagagtgatcct ggccgacgctaatctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccgg gataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccacctgtttaccctg accaatctgggagcccctgccgccttcaagtactttgacaccaccatcgac cggaagaggtacaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatc caccagagcatcaccggcctgtacgagacacggatcgacctgtctcagct gggaggcgacaaaaggccggcggccacgaaaaaggccggccaggca aaaaagaaaaagtaagaattcctagagctcgctgatcagcctcgactgtgc cttctagttgccagccatctgttgtttgcccctccccgtgccttccttgaccc tggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatc gcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtggggtggggcagga cagcaaggggaggattgggaagagaatagcaggcatgctggggagc ggccgcttcccttagtgagggttaatgcttcgagcagacatgataagatac attgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgcttta tttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaa caagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggggagat gtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtaaaatccga taaggatcgatgggacagcccccccccaaagccccccagggatgtaatta cgtccctcccccgctagggcagcagcgagccgcccggggctccggtcc ggtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacag cccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctc gctgctctttgagcctgcagacacctgggggggatacggggaaaatctagt gggacagcccccccccaaagccccccagggatgtaattacgtccctcccc cgctagggcagcagcgagccgcccggggctccggtccggtccggcgct cccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgggcacgg ggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgag cctgcagacacctgggggggatacggggaaaaatcgatgggacagcccc cccccaaagccccccagggatgtaattacgtccctcccccgctagggcag cagcgagccgcccggggctccggtccggtccggcgctcccccgcatcc ccgagccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaaggtggc acgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagaca cctgggggggatacggggaaaatctagtgggacagcccccccccaaagc ccccagggatgtaattacgtccctcccccgctagggcagcagcgagccg cccggggctccggtccggtccggcgctcccccgcatccccgagccggc agcgtgcggggacagcccgggcacggggaaggtggcacgggatcgct ttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgggggggat acggggaaaaatcgatagcgataaggatccactagttattaatagtaatca attacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataactt acggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattga cgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattga cgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaa gtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggc

[0717]

		ccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggca gtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtcgaggtgagccccacg ttctgcttcactctccccatctccccccccctccccacccccaattttgtatttat ttatttttttaattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggggggggggg gggccaggcggggcggggcggggcgaggggcggggcggggcgag gcggagaggtgcggcggcagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtt tccttttatggcgaggcggcggcggcggcgccctataaaaagcgaagc gcgcggcgggcgggagtcgctgcgttgccttcgccccgtgccccgctcc gcgccgcctcgcgccgcccgccccggctctgactgaccgcgttactccc acaggtgagcgggcgggacggcccttctcctccgggctgtaattagcgct tggtttaatgacggctcgtttcttttctgtggctgcgtgaaagccttaaaggg ctccgggagggccctttgtgcgggggggagcggctcgggggtgcgtg cgtgtgtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgcggctccgcgctgcccggc ggctgtgagcgctgcgggcgcggcgcggggctttgtgcgctccgcagt gtgcgcgaggggagcgcggccgggggcggtgccccgcggtgcgggg ggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggg gggtgagcagggggtgtgggcgcgtcggtcgggctgcaacccccccctg cacccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgggtgcgggggc tccgtacggggcgtggcgcggggctcgccgtgccgggcgggggggtgg cggcaggtgggggtgccgggcggggcggggccgcctcgggccgggg agggctcgggggaggggcgcggcggcccccggagcgccggcggctg tcgaggcgcggcgagccgcagccattgccttttatggtaatcgtgcgaga gggcgcagggacttcctttgtcccaaatctgtgcggagccgaaatctggg aggcgccgccgcacccccctctagcgggcgcggggcgaagcggtgcgg cgccggcaggaaggaaatgggcggggagggccttcgtgcgtcgccgc gccgccgtcccctttctcccctctccagcctcggggctgtccgcgggggggac ggctgccttcgggggggacggggcagggcggggttcggcttctggcgt gtgaccggcggctctagagcctctgctaaccatgttcatgccttcttctttttc ctacagctcctgggcaacgtgctggttattgtgctgtctcatcattttggcaa agaattccgctgcgactcggcggagtcccggcggcgcgtccttgttctaa cccggcgcgccgccaccatgtctagattagataaaagtaaagtgattaaca gcgcattagagctgcttaatgaggtcggaatcgaaggtttaacaacccgta aactcgcccagaagctaggtgtagagcagcctacattgtattggcatgtaa aaaataagcgggctttgctcgacgccttagccattgagatgttagataggc accatactcacttttgccctttagaaggggaaagctggcaagatttttttacgt aataacgctaaaagttttagatgtgctttactaagtcatcgcgatggagcaa aagtacatttaggtacacggcctacagaaaaacagtatgaaactctcgaaa atcaattagccttttttatgccaacaaggtttttcactagagaatgcattatatgc actcagcgctgtggggcattttactttaggttgcgtattggaagatcaagag catcaagtcgctaaagaagaaagggaaacacctactactgatagtatgcc gccattattacgacaagctatcgaattatttgatcaccaaggtgcagagcca gccttcttattcggccttgaattgatcatatgcggattagaaaaacaacttaa atgtgaaagtgggtccgcgtacagccgcgcgcgtacgaaaaacaattac gggtctaccatcgagggcctgctcgatctcccggacgacgacgccccg aagaggcggggctggcggctccgcgcctgtcctttctccccgcgggaca cacgcgcagactgtcgacggcccccccgaccgatgtcagcctgggggga cgagctccacttagacggcgaggacgtggcgatggcgcatgccgacgc gctagacgatttcgatctggacatgttgggggacggggattccccgggtc cgggatttacccccacgactccgcccccctacggcgctctggatatggcc gacttcgagtttgagcagatgtttaccgatgcccttggaattgacgagtacg gtgggtagtagggcgcgccggcaccggtaccaagcttaagagcgctag

[0718]

		ctggccagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactag aatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttg taaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcatttta tgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacct ctacaaatgtggtatggaattggagccccactgtgttcatcttacagatgga aatactgacattcagaggagttagttaacttgcctaggtgattcagctaataa gtgcaagaaagatttcaatccaaggtgatttgattctgaagcctgtgctaatc acattacaccaagctacaacttcatttataaataataagtcagctttcaaggg cctttcaggtgtcctgcacttctacaagctgtgccatttagtgaacacaaaat gagccttctgatgaagtagtcttttcattatttcagatattagaacactaaaatt cttagctgccagctgattgaaggctgggacaaaattcaaacatgcatctac aacaatatatatctcaatgttagtctccaaattctattgacttcaactcaagag aatataaagagctagtctttatacactctttaaggtatgatatcatctggaaag taacaaaattgatgcaaatttgaatgaactttatcatggtgtatttacacaatgt gtttcttctccctgcaatgtatttctttctctaattccttccatttgatctttcataca caatctggttctgatgtatgtttttggatgcacttttcaactccaaaagacag agctagttactttcttcctggtgctccaagcactgtatttgtatctgtattcaag ccctttgcaatattgtactggatcattatttcacctctaggatggcttccccag gcaacttgtgttcacccagagactacattttgtatcttgttgacctttgaacttc caccagtgtctaaaaataatatgtatgcaaaattacttgctatgagaatgtata attaaacaatataaaaaggagaagcaaggagagaaacacaggtgtgtatt tgtgtttgtgtgcttaaaaggcagtgtggaaaaggaagaaatgccatttata gtgaggagacaaagttatattacctcttatctggcttttaaggagattttgctg agctaaaaatcctatattcatagaaaagccttacctgagttgccaatacctca attctaaaatacagcatagcaaaactttaacctccaaatcaagcctctacttg aatccttttctgagggatgaataaggcataggcatcaggggctgttgccaat gtgcattagctgtttgcagcctcaccttctttcatggagtttaagatatagtgta ttttcccaaggtttgaactagctcttcatttctttatgttttaaatgcactgacctc ccacattccctttttagtaaaatattcagaaataatttgggtcccgatttttccc cgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagcgttca gaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtccccgca cgctgccggctcggggatgcgggggagcgccggaccggaccggagc cccgggcggctcgctgctgccctagcgggggagggacgtaattacatcc ctgggggctttgggggggggctgtcccactagattttccccgtatcccccc aggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagcgttcagaggaaagcg atcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtccccgcacgctgccggct cggggatgcgggggagcgccggaccggaccggagccccgggcggct cgctgctgccctagcgggggagggacgtaattacatccctgggggctttg gggggggctgtcccatcggatcttctagtcctgcaggagtcaatgggaa aaacccattggagccaagtacactgactcaatagggactttccattgggttt tgcccagtacataaggtcaatagggggtgagtcaacaggaaagtcccatt ggagccaagtacattgagtcaatagggactttccaatgggttttgcccagta cataaggtcaatgggaggtaagccaatgggtttttcccattactgacatgtat acgcgtcgacgtcggcgcgttcagcctaaagctttttttccccgtatcccccc aggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagcgttcagaggaaagcg atcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtccccgcacgctgccggct cggggatgcgggggagcgccggaccggaccggagccccgggcggct cgctgctgccctagcgggggagggacgtaattacatccctgggggctttg gggggggctgtccctgcggccgcgaattcgtaatcatggtcatagctgtt tcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccgga agcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactcacatta

[0719]

		attgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccag gggtctagccgcggtctaggaagctttctagggtacctctagggatccact agttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggag ttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaac gacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgcca atagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccc acttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgcccccctattgacgt caatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatg ggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggg tcgaggtgagccccacgttctgcttcactctcccccatctccccccccctcccc accccccaattttgtatttatttatttttttaattattttgtgcagcgatgggggcgg ggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcggggcgaggg gcggggcggggcgaggcggagaggtgcggcggcagccaatcagagc ggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggcggcggcggcggcgc cctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgttgccttc gccccgtgccccgctccgcgccgcctcgcgccgcccgccccggctctg actgaccgcgttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctc cgggctgtaattagcgcttggtttaatgacggctcgtttcttttctgtggctgc gtgaaagccttaaagggctccgggagggccctttgtgcgggggggagc ggctcgggggtgcgtgcgtgtgtgtgcgtggggagcgccgcgtgc ggcccgcgctgcccggcggctgtgagcgctgcgggcgcggcgcggg gctttgtgcgctccgcgtgtgcgcgaggggagcgcggccgggggcggt gccccgcggtgcgggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcg gggtgtgtgcgtgggggggtgagcaggggtgtgggcgcggcggtcg ggctgtaacccccccctgcacccccctccccgagttgctgagcacggcc cggcttcgggtgcggggctccgtgcggggcgtggcgcggggctcgcc gtgccgggcgggggggtggcggcaggtgggggtgccgggcgggggcgg ggccgcctcgggccggggagggctcgggggaggggcgcggcggcc ccggagcgccggcggctgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgcct tttatggtaatcgtgcgagagggcgcagggacttcctttgtcccaaatctgg cggagccgaaatctgggaggcgccgccgcacccccctctagcgggcgc gggcgaagcggtgcggcgccggcaggaaggaaatgggcggggagg gccttcgtgcgtcgccgcgccgccgtcccctctccatctccagcctcggg gctgccgcaggggacggctgccttcgggggggacggggcagggcg gggttcggcttctggcgtgtgaccggcggctctagagcctctgctaaccat gttcatgccttcttctttttcctacagctcctgggcaacgtgctggttgttgtgc tgtctcatcattttggcaaagaattccgctgcgactcggcggagtcccggc ggcgcgtccttgttctaacccggcgcgccctcaggatggagcctcccggc cgccgcgagtgtcccttccttcctggcgctttcctgggttgcttctggcgg ccatggtgttgctgctgtactccttctccgatgcctgtgaggagccaccaac atttgaagctatggagctcattggtaaaccaaaaccctactatgagattggt gaacgagtagattataagtgtaaaaaaggatacttctatatacctcctcttgc cacccatactatttgtgatcggaatcatacatggctacctgtctcagatgacg cctgttatagagaaacatgtccatatatacgggatcctttaaatggccaagc agtccctgcaaatgggacttacgagtttggttatcagatgcactttatttgtaa tgagggttattacttaattggtgaagaaattctatattgtgaacttaaaggatc agtagcaatttggagcggtaagcccccaatatgtgaaaaggttttgtgtaca ccacctccaaaaataaaaaatggaaaacacacctttagtgaagtagaagta tttgagtatcttgatgcagtaacttatagttgtgatcctgcacctggaccagat ccattttcacttattggagagagcacgatttattgtggtgacaattcagtgtgg agtcgtgctgctccagagtgtaaagtggtcaaatgtcgatttccagtagtcg

[0720]

		aaaatggaaaacagatatcaggatttggaaaaaaattttactacaaagcaa cagttatgtttgaatgcgataagggtttttacctcgatggcagcgacacaatt gtctgtgacagtaacagtacttgggatcccccagttccaaagtgtcttaaag tgctgcctccatctagtacaaaacctccagctttgagtcattcagtgtcgact tcttccactacaaaatctccagcgtccagtgcctcaggtcctaggcctactt acaagcctccagtctcaaattatccaggatatcctaaacctgaggaaggaa tacttgacagtttggatgtttgggtcattgctgtgattgttattgccatagttgtt ggagttgcagtaatttgtgttgtcccgtacagatatcttcaaaggaggaaga agaaaggcacatacctaactgatgagacccacagagaagtaaaatttactt ctctcggatccggagccacgaacttctctctgttaaagcaagcaggagac gtggaagaaaaccccggtcctatgaccgtcgcgcggccgagcgtgccc gcggcgctgcccctcctcggggagctgccccggctgctgctgctggtgct gttgtgcctgccggccgtgtggggtgactgtggccttcccccagatgtacc taatgcccagccagctttggaaggccgtacaagttttcccgaggatactgt aataacgtacaaatgtgaagaaagctttgtgaaaattcctggcgagaagga ctcagtgatctgccttaagggcagtcaatggtcagatattgaagagttctgc aatcgtagctgcgaggtgccaacaaggctaaattctgcatccctcaaacag ccttatatcactcagaattattttccagtcggtactgttgtggaatatgagtgc cgtccaggttacagaagagaaccttctctatcaccaaaactaacttgccttc agaatttaaaatggtccacagcagtcgaattttgtaaaaagaaatcatgccc taatccgggagaaatacgaaatggtcagattgatgtaccaggtggcatatt atttggtgcaaccatctccttctcatgtaacacagggtacaaattatttggctc gacttctagtttttgtcttatttcaggcagctctgtccagtggagtgacccgtt gccagagtgcagagaaatttattgcccagcaccaccacaaattgacaatg gaataattcaaggggaacgtgaccattatggatatagacagtctgtaacgt atgcatgtaataaaggattcaccatgattggagagcactctatttattgtactg tgaataatgatgaaggagagtggagtggcccaccacctgaatgcagagg aaaatctctaacttccaaggtcccaccaacagttcagaaacctaccacagt aaatgttccaactacagaagtctcaccaacttctcagaaaaccaccacaaa aaccaccacaccaaatgctcaagcaacacggagtacacctgtttccagga caaccaagcattttcatgaaacaaccccaaataaaggaagtggaaccactt caggtactacccgtcttctatctgggcacacgtgtttcacgttgacaggtttg cttgggacgctagtaaccatgggcttgctgacttagggcgcgccggcacc ggtaccaagcttaagagcgctagctggccagacatgataagatacattgat gagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtg aaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagt taacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggggggaggtgtggg aggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtatggaattggagcc ccactgtgttcatcttacagatggaaatactgacattcagaggagttagttaa cttgcctaggtgattcagctaataagtgcaagaaagatttcaatccaaggtg atttgattctgaagcctgtgctaatcacattacaccaagctacaacttcatttat aaataataagtcagctttcaagggcctttcaggtgtcctgcacttctacaagc tgtgccatttagtgaacacaaaatgagccttctgatgaagtagtcttttcatta tttcagatattagaacactaaaattcttagctgccagctgattgaaggctggg acaaaattcaaacatgcatctacaacaatatatatctcaatgttagtctccaa attctattgacttcaactcaagagaatataaagagctagtctttatacactctt aaggtatgatatcatctggaaagtaacaaaattgatgcaaatttgaatgaact ttatcatggtgtatttacacaatgtgtttcttctccctgcaatgtatttctttctcta attccttccatttgatctttcatacacaatctggttctgatgtatgtttttggatg cacttttcaactccaaaagacagagctagttacttttcttcctggtgctccaag cactgtatttgtatctgtattcaagccctttgcaatattgtactggatcattatttc

[0721]

		acctctaggatggcttccccaggcaacttgtgttcacccagagactacatttt gtatcttgttgacctttgaacttccaccagtgtctaaaaataatatgtatgcaa aattacttgctatgagaatgtataattaaacaatataaaaaggagaagcaag gagagaaacacaggtgtgtatttgtgtttgtgtgcttaaaaggcagtgtgga aaaggaagaaatgccatttatagtgaggagacaaagttatattacctcttatc tggcttttaaggagattttgctgagctaaaaatcctatattcatagaaaagcct tacctgagttgccaatacctcaattctaaaatacagcatagcaaaactttaac ctccaaatcaagcctctacttgaatccttttctgagggatgaataaggcatag gcatcaggggctgttgccaatgtgcattagctgtttgcagcctcaccttcttt catggagtttaagatatagtgtattttcccaaggtttgaactagctcttcatttct ttatgttttaaatgcactgacctcccacattccctttttagtaaaatattcagaa ataatttatcatctggaaagtaacaaaattgatgcaaatttgaatgaactttat catggtgtatttacacaatgtgtttcttctccctgcaatgtatttctttctctaatt ccttccatttgatctttcatacacaatctggttctgatgtatgtttttggatgca cttttcaactccaaaagacagagctagttactttcttcctggtgctccaagca ctgtatttgtatctgtattcaagccctttgcaatattgtactggatcattatttcac ctctaggatggcttccccaggcaacttgtgttcacccagagactacattttgt atcttgttgacctttgaacttccaccagtgtctaaaaataatatgtatgcaaaa ttacttgctatgagaatgtataattaaacaatataaaaaggagaagcaagga gagaaacacaggtgtgtatttgtgtttgtgtgcttaaaaggcagtgtggaaa aggaagaaatgccatttatagtgaggagacaaagttatattacctcttatctg gcttttaaggagattttgctgagctaaaaatcctatattcatagaaaagcctta cctgagttgccaatacctcaattctaaaatacagcatagcaaaactttaacct ccaaatcaagcctctacttgaatccttttctgagggatgaataaggcatagg catcaggggctgttgccaatgtgcattagctgtttgcagcctcaccttctttc atggagtttaagatatagtgtattttcccaaggtttgaactagctcttcatttctt tatgttttaaatgcactgacctcccacattccctttttagtaaaatattcagaaa taatttatcccggcttgtcgacgacggaaatccggcttgtcgacgacggcg gtctccgtcgtcaggatcatccggccggccatcaggacatagcgttggct acccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctc gtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgccttctatcgcc ttcttgacgagttcttctgaggggatcaattctctagagctcgctgatcagcc tcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgcct tccttgaccctggaaggtgccactcccactgtccttttcctaataaaatgagg aaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggt ggggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcaggcatg ctggggatgcggtgggctctatggcttctgaggcggaaagaaccagctg ggggcgcgcacctcgaccatctccaggatgcctttgatagagctgggtcc tctgcgttcctttaaagtgtttgagatcaagtccgagaagaggtggcaagac atgcgatcgcgctagtttaaaatacatcattgcaatgaaaataaatgtttttat taggcagaatccagatgctcaaggcccttcataatatcccccagtttagtag ttggacttagggaacaaaggaaccttaatagaaattggacagcaagaaa gctctagctttagaagaactcatcaagaagtctgtagaaggcaattctctgg gagtcaggggctgcaatgccatagagcactaggaacctgtctgcccactc tccccctagctcttctgctatgtccctggttgctagggcaatgtcctggtacc tgtcagccactcccagcctgccacagtctatgaagccagagaacttccat tttcaaccatgatgttgggaaggcaggcatccccatgagtcaccactaggt cctcaccatctggcatggatgccttgagcctggcaaatagttcagcaggg gccaggccctggtgttcttcatccaagtcatcttggtccaccaggccagcct ccatcctggttctggccctctctatcctgtgcttggcctggtggtcaaaggg gcaggtggctgggtcaagggtgtggagtcttctcatggcatcagccatgat

[0722]

		tgacactttctcagctggagctaggtgagaggaaaggaggtcctgcccag gcacctcacctagtaggagccagtcccttccagcttctgtgaccacatcaa ggacagctgcacaggggaccccagttgttgccaaccaggagagtctggc agcctcatcctggagctcattgagagccccactgaggtctgtctttacaaaa aggactggcctgccttgggctgaaagtctgaaaactgctgcatcagagca accaatggtctgctgtgcccagtcatagccaaacagtctctcaacccaggc agctggagaacctgcatgtaggccatcttgttcaatcatgatggctcctcct gtcaggagaggaaagagaagaaggttagtacaattgctatagtgagttgta ttatactatgcttatgattaattgttaaactagggctgcagggttcatagtgcc acttttcctgcactgccccatctcctgcccaccctttcccaggcatagacagt cagtgacttaccaaactcacaggagggagaaggcagaagctttttgcaaa agcctaggctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaa aaggaagagtaccaggtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattcc ctttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaa gtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactg gatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttc caatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattg acgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgac ttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgaca gtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggcc aacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgc acaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctg aatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaa tggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttc ccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggacca cttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagc cggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggta agccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatgg atgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcatt ggtaatcgcgactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaa aacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatg accaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccacgtgc ccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatct gctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccgg atcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgc agataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaag aactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtgg ctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgat agttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcac acagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacag cgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggac aggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgaggga gcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccac ctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctat ggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggc cttttgctcacatggctcgacagatttaatcgggaggatccggagagggca gttaatcgctcgagtgtaca

[0723] 等同方案

[0724] 本技术不限于本申请中描述的特定实施方案,这些特定实施方案旨在作为本技术的各个方面的单一说明。在不背离本技术的精神和范围的情况下,可以对本技术进行许多修改和变化,这对于本领域技术人员而言是显而易见的。除了本文列举的那些之外,在本技

术的范围内的功能上等同的方法和装置对于本领域技术人员而言根据前面的描述将是显而易见的。这样的修改和变化旨在落入本技术的范围内。应当理解,本发明的技术不限于特定的方法、试剂、化合物组合物或生物系统,它们当然可以变化。还应当理解,本文中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并且不旨在进行限制。

[0725] 另外,在根据马库什组描述本公开的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,本公开也因此对于马库什组的任何个体成员或子组(subgroup)成员进行描述。

[0726] 如本领域技术人员将理解的,出于任何和所有目的,特别是在提供书面描述方面,本文公开的所有范围还涵盖任何和所有可能的子范围及其子范围的组合。任何列出的范围均可以很容易地被认为充分描述该范围并允许将同一范围至少分为相等的一半、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等。作为非限制性实例,本文讨论的每个范围可以容易地分为下三分之一、中三分之一和上三分之一等。本领域技术人员还应当理解,所有例如“至多”、“至少”、“大于”、“小于”等的语言均包括所列举的数字并且其指代的范围可以被随后分成如上所述的子范围。最后,如本领域技术人员将理解的,范围包括每个单独的成员。因此,例如,具有1-3个细胞的组是指具有1个、2个或3个细胞的组。类似地,具有1-5个细胞的组是指具有1个、2个、3个、4个或5个细胞的组,等等。

[0727] 本文提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物均通过引用以其全文并入,包括所有附图和表格,只要它们不与本说明书的明确教导不一致。

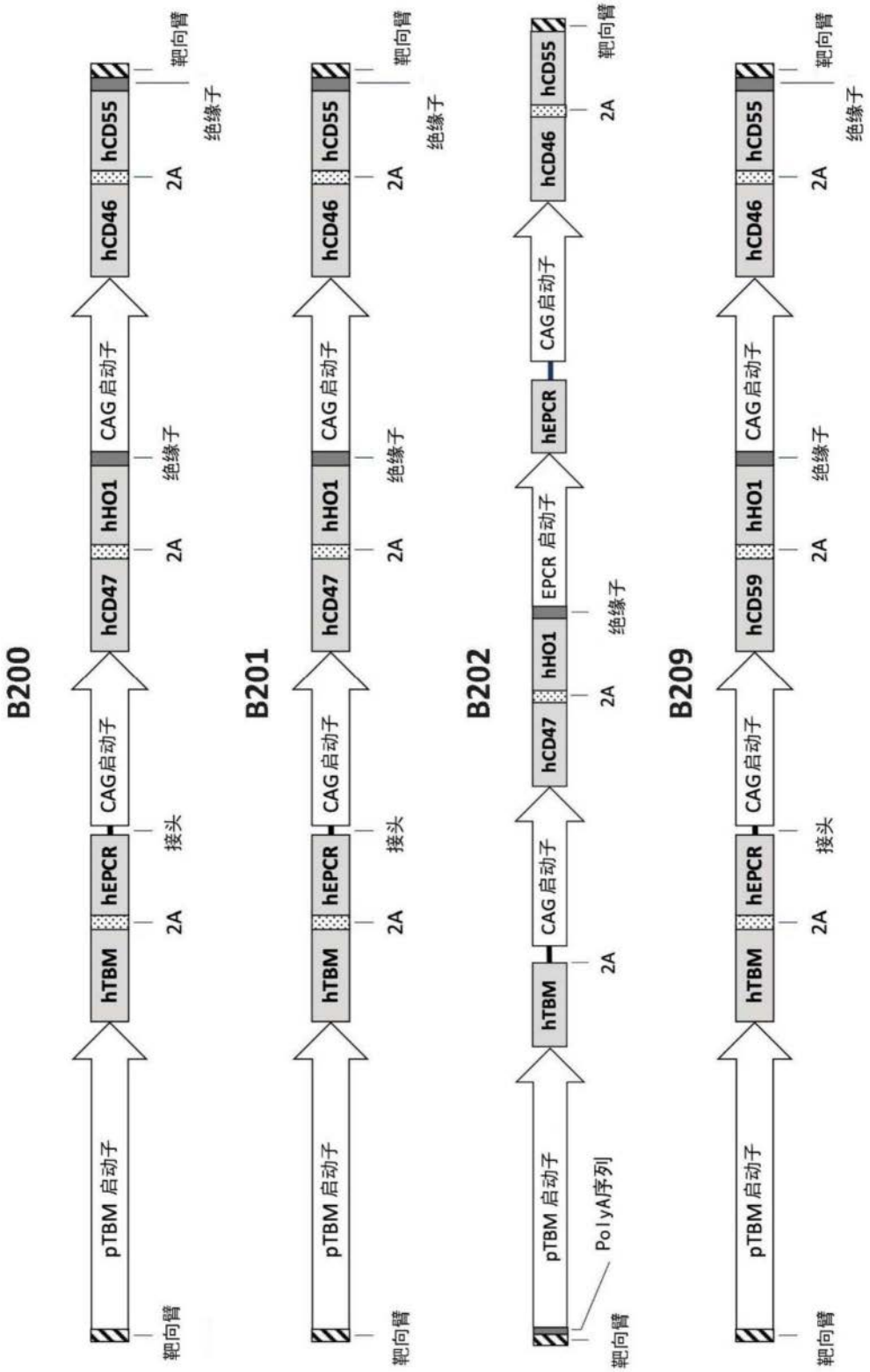

B200
pTBM 启动子
靶向臂
hTBM
hEPCR
2A
接头
CAG启动子
hCD47
hHO1
2A
绝缘子
CAG 启动子
hCD46
hCD55
2A
靶向臂
绝缘子
B201
pTBM 启动子
靶向臂
hTBM
hEPCR
2A
接头
CAG启动子
hCD47
hHO1
2A
绝缘子
CAG 启动子
hCD46
hCD55
2A
靶向臂
绝缘子
B202
pTBM 启动子
PolyA序列
靶向臂
hTBM
2A
CAG 启动子
hCD47
hHO1
2A
绝缘子
EPCR 启动子
hEPCR
CAG 启动子
hCD46
hCD55
2A
靶向臂
B209
pTBM 启动子
靶向臂
hTBM
hEPCR
2A
接头
CAG启动子
hCD59
hHO1
2A
绝缘子
CAG 启动子
hCD46
hCD55
2A
靶向臂
绝缘子

图1A

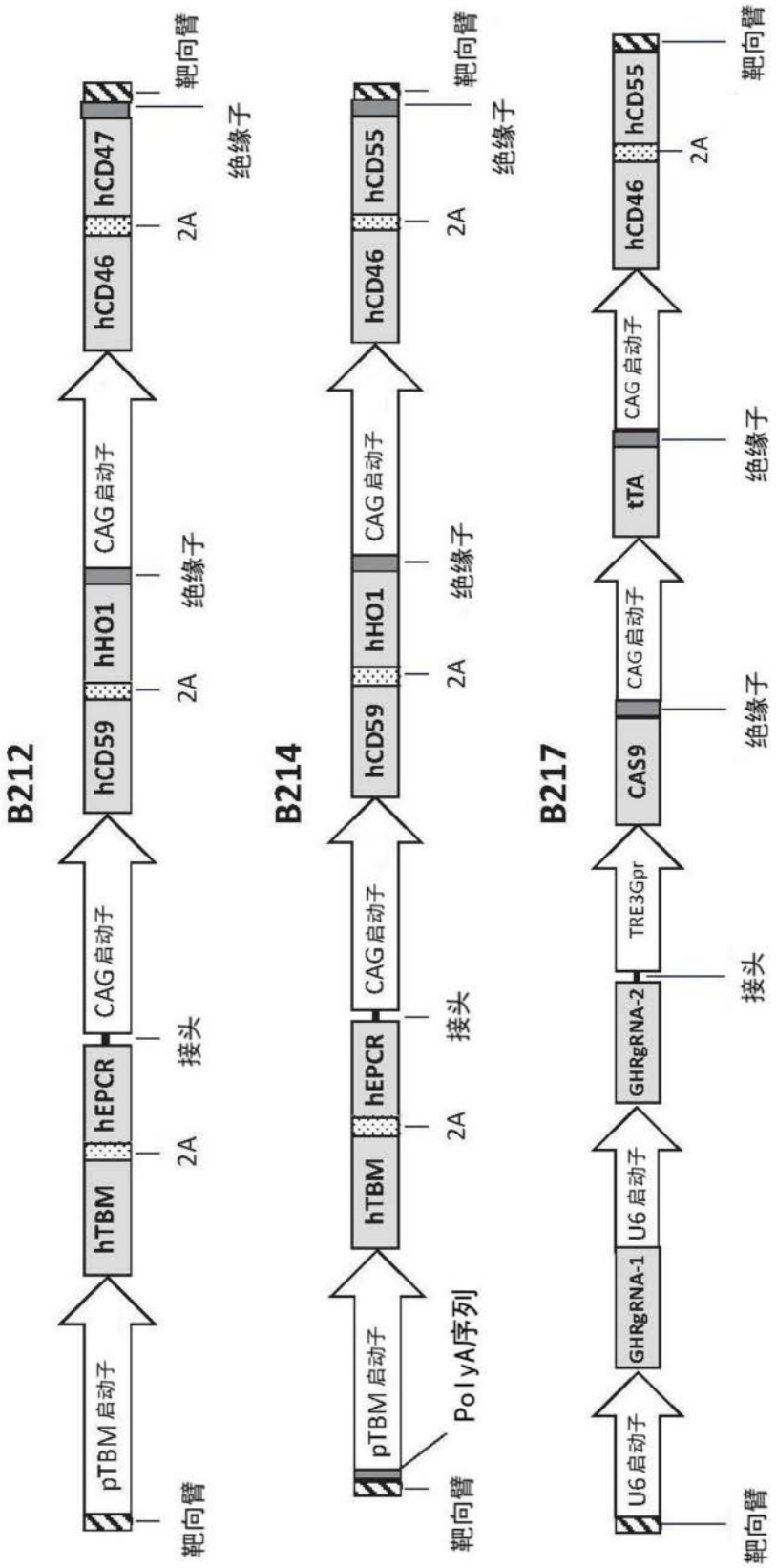

B212
pTBM 启动子
hTBM
hEPCR
2A
接头
CAG 启动子
hCD59
2A
hHO1
2A
CAG 启动子
hCD46
2A
hCD47
靶向臂
绝缘子
靶向臂
B214
pTBM 启动子
hTBM
hEPCR
2A
接头
CAG 启动子
hCD59
2A
hHO1
2A
CAG 启动子
hCD46
2A
hCD55
靶向臂
绝缘子
靶向臂
PolyA序列
B217
U6 启动子
GHRgRNA-1
U6 启动子
GHRgRNA-2
TRE3Gpr
接头
CAS9
CAG 启动子
绝缘子
tTA
CAG 启动子
hCD46
2A
hCD55
靶向臂
绝缘子
靶向臂

图1B

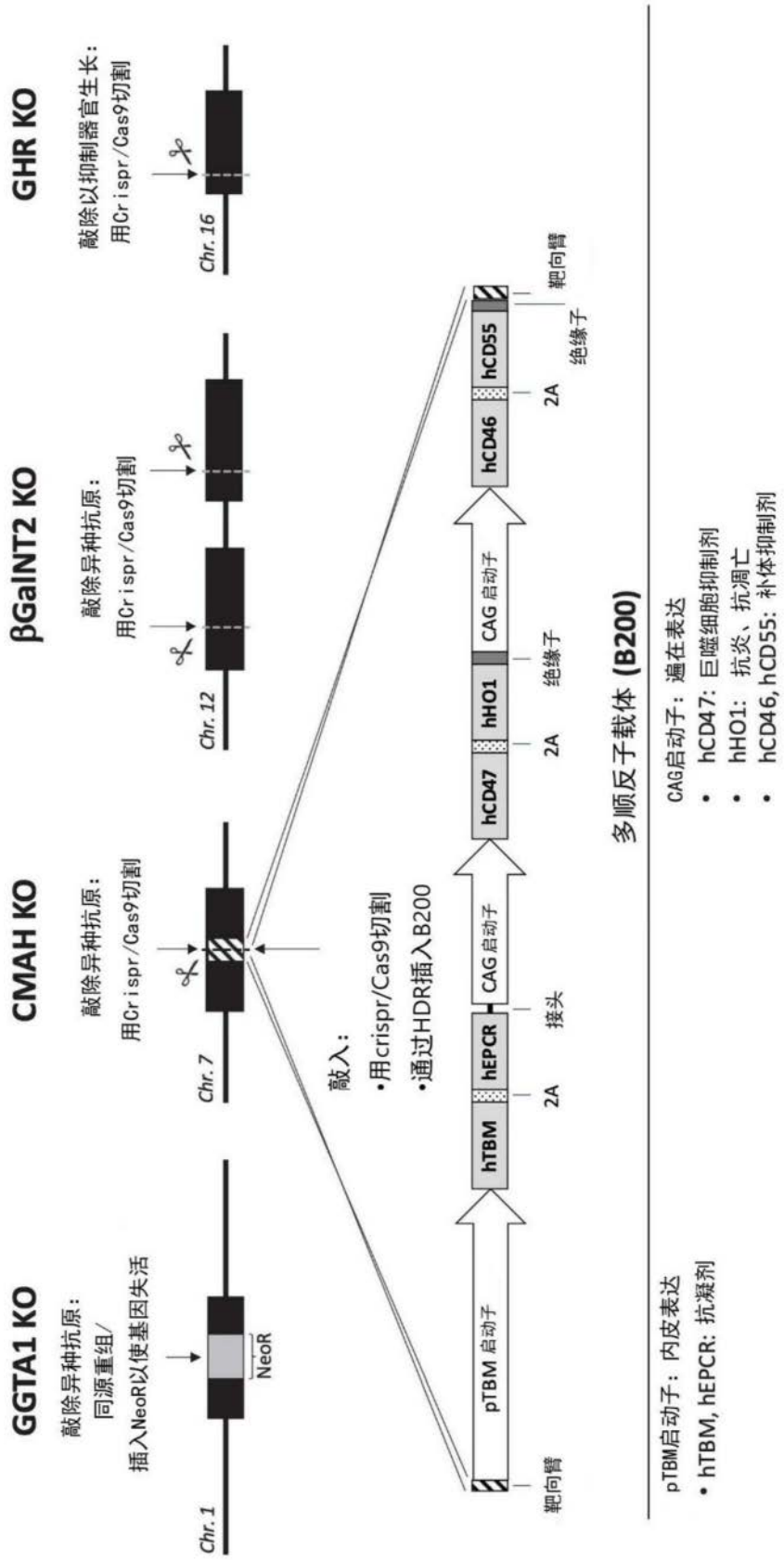

GGTA1 KO
敲除异种抗原：
同源重组/
插入NeoR以使基因失活
NeoR
Chr.1
CMAH KO
敲除异种抗原：
用Crispr/Cas9切割
Chr.7
βGalNT2 KO
敲除异种抗原：
用Crispr/Cas9切割
Chr.12
GHR KO
敲除以抑制器官生长：
用Crispr/Cas9切割
Chr.16
敲入：
•用crispr/Cas9切割
•通过HDR插入B200
多顺反子载体 (B200)
靶向臂
pTBM 启动子
hTBM
2A
hEPCR
CAG 启动子
接头
hCD47
2A
hHO1
CAG 启动子
绝缘子
hCD46
2A
hCD55
绝缘子
靶向臂
pTBM启动子：内皮表达
• hTBM, hEPCR: 抗凝剂
CAG启动子：遍在表达
• hCD47: 巨噬细胞抑制剂
• hHO1: 抗炎、抗凋亡
• hCD46, hCD55: 补体抑制剂

图2A

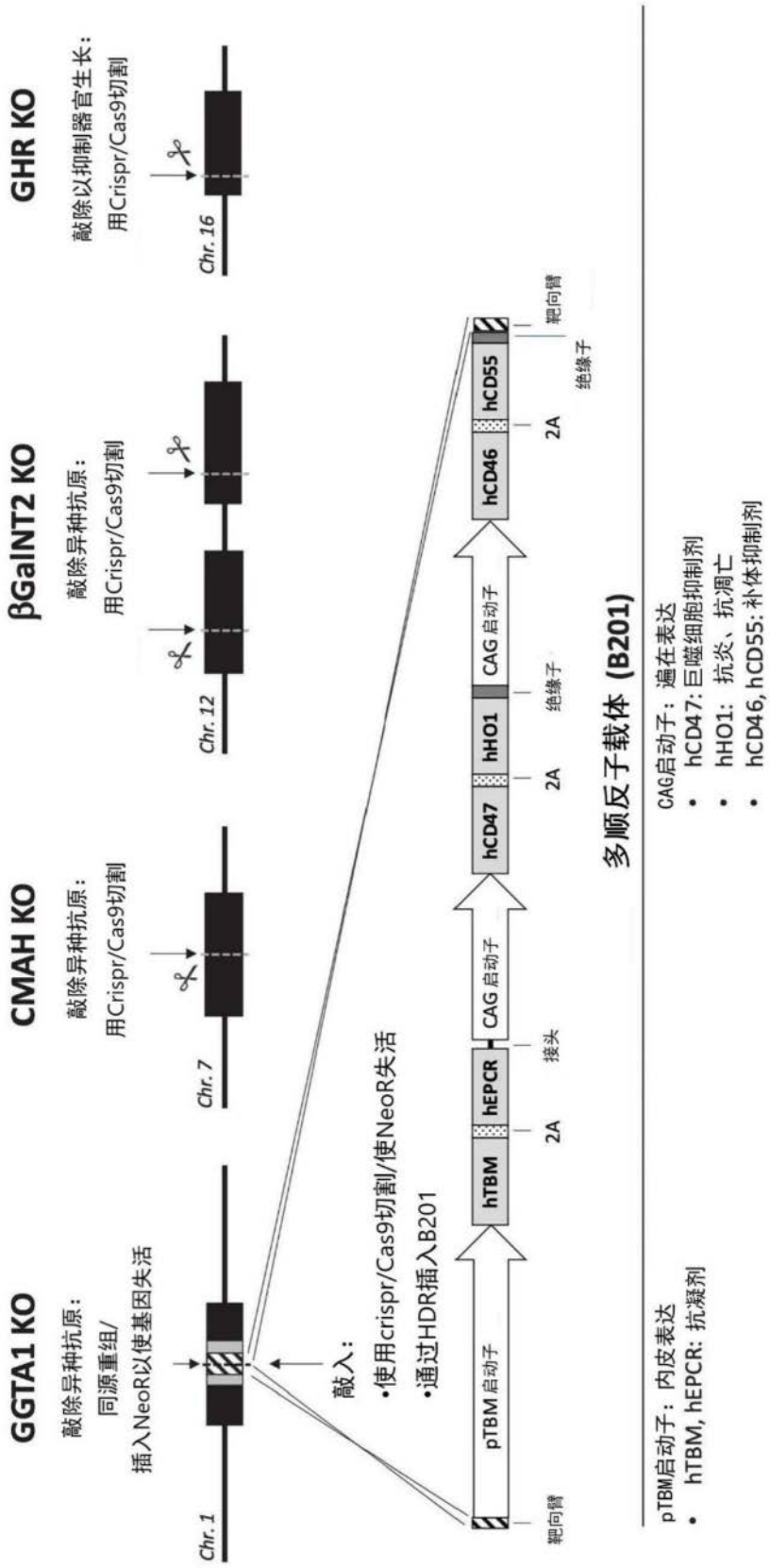

GGTA1 KO
敲除异种抗原：
同源重组/
插入NeoR以使基因失活
Chr. 1
CMAH KO
敲除异种抗原：
用Crispr/Cas9切割
Chr. 7
βGalNT2 KO
敲除异种抗原：
用Crispr/Cas9切割
Chr. 12
GHR KO
敲除以抑制器官生长：
用Crispr/Cas9切割
Chr. 16
敲入：
•使用crispr/Cas9切割/使NeoR失活
•通过HDR插入B201
pTBM启动子
hTBM
2A
hEPCR
接头
CAG启动子
hCD47
2A
hHO1
绝缘子
CAG启动子
hCD46
2A
hCD55
绝缘子
靶向臂
靶向臂
多顺反子载体 (B201)
pTBM启动子：内皮表达
• hTBM, hEPCR: 抗凝剂
CAG启动子：遍在表达
• hCD47: 巨噬细胞抑制剂
• hHO1: 抗炎、抗凋亡
• hCD46, hCD55: 补体抑制剂

图2B

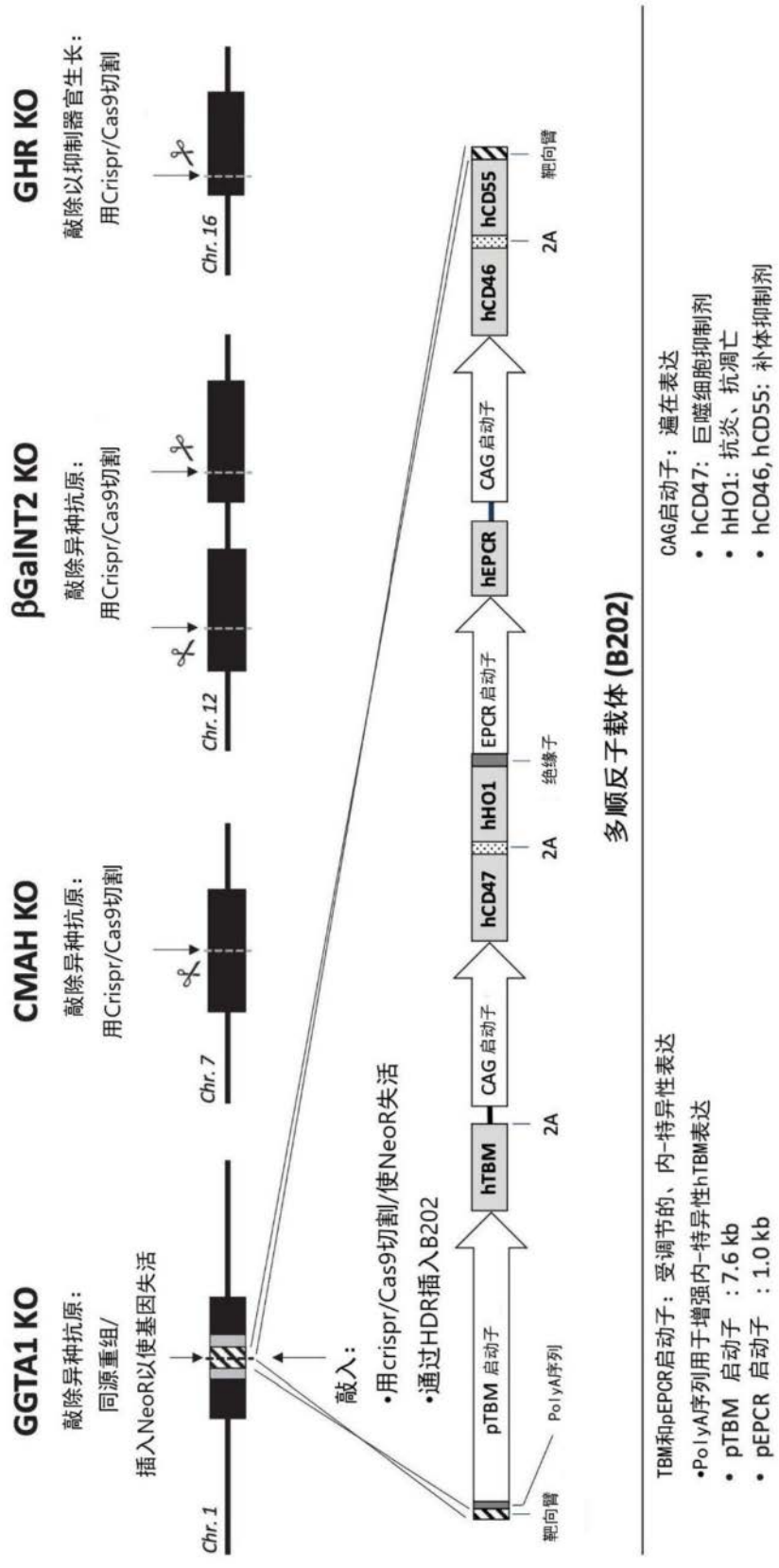

GGTA1 KO
敲除异种抗原：
同源重组/
插入NeoR以使基因失活
CMAH KO
敲除异种抗原：
用Crispr/Cas9切割
βGalNT2 KO
敲除异种抗原：
用Crispr/Cas9切割
GHR KO
敲除以抑制器官生长：
用Crispr/Cas9切割
Chr.1
Chr.7
Chr.12
Chr.16
敲入：
•用crispr/Cas9切割/使NeoR失活
•通过HDR插入B202
靶向臂
pTBM 启动子
PolyA序列
hTBM
CAG 启动子
2A
hCD47
hHO1
EPCR 启动子
2A
绝缘子
hEPCR
CAG 启动子
hCD46
hCD55
2A
靶向臂
多顺反子载体 (B202)
TBM和pEPCR启动子：受调节的、内-特异性表达
•PolyA序列用于增强内-特异性hTBM表达
• pTBM 启动子 ：7.6 kb
• pEPCR 启动子 ：1.0 kb
CAG启动子：遍在表达
• hCD47：巨噬细胞抑制剂
• hHO1：抗炎、抗凋亡
• hCD46, hCD55：补体抑制剂

图2C

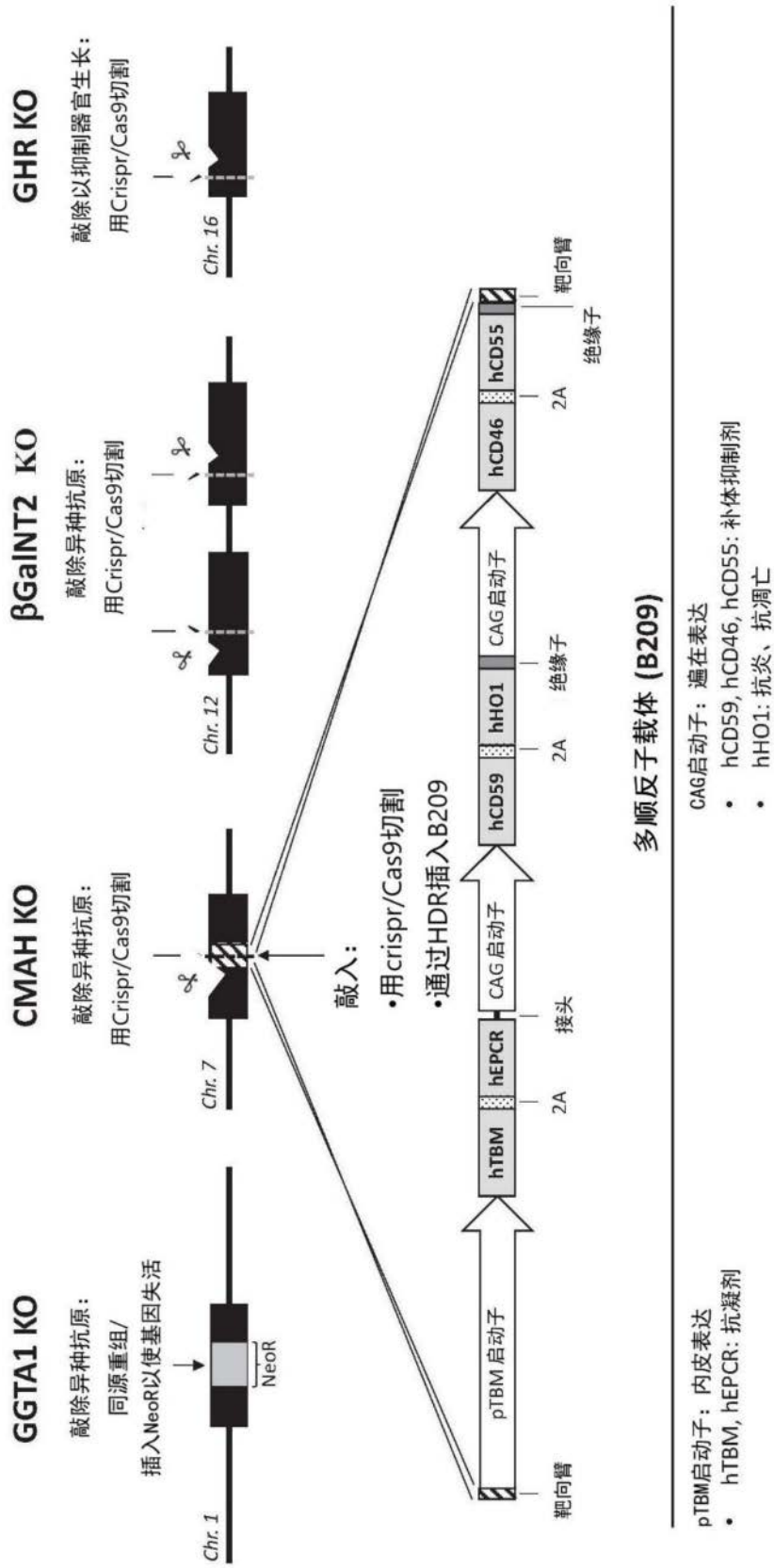

GGTA1 KO
敲除异种抗原：
同源重组/
插入NeoR以使基因失活
NeoR
Chr. 1
CMAH KO
敲除异种抗原：
用Crispr/Cas9切割
Chr. 7
βGalNT2 KO
敲除异种抗原：
用Crispr/Cas9切割
Chr. 12
GHR KO
敲除以抑制器官生长：
用Crispr/Cas9切割
Chr. 16
敲入：
•用crispr/Cas9切割
•通过HDR插入B209
多顺反子载体 (B209)
靶向臂
pTBM 启动子
hTBM
2A
hEPCR
接头
CAG 启动子
hCD59
2A
hHO1
绝缘子
CAG 启动子
hCD46
2A
hCD55
绝缘子
靶向臂
pTBM启动子：内皮表达
• hTBM, hEPCR: 抗凝剂
CAG启动子：遍在表达
• hCD59, hCD46, hCD55: 补体抑制剂
• hHO1: 抗炎、抗凋亡

图2D

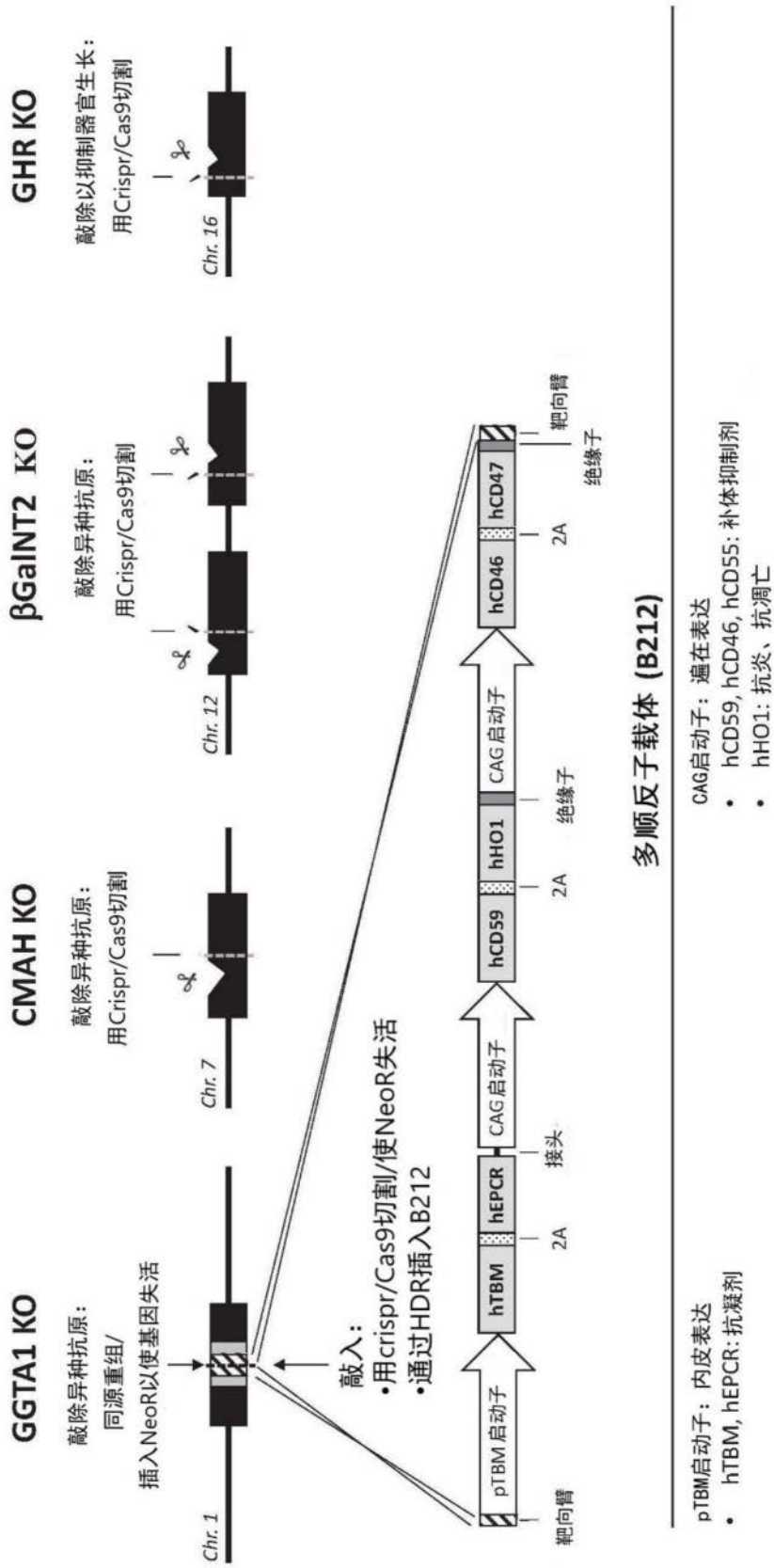

GGTA1 KO
敲除异种抗原：
同源重组/
插入NeoR以使基因失活
Chr. 1
CMAH KO
敲除异种抗原：
用Crispr/Cas9切割
Chr. 7
βGalNT2 KO
敲除异种抗原：
用Crispr/Cas9切割
Chr. 12
GHR KO
敲除以抑制器官生长：
用Crispr/Cas9切割
Chr. 16
敲入：
•用crispr/Cas9切割/使NeoR失活
•通过HDR插入B212
多顺反子载体 (B212)
pTBM 启动子
hTBM
hEPCR
2A
接头
CAG 启动子
hCD59
2A
hHO1
绝缘子
CAG 启动子
hCD46
2A
hCD47
绝缘子
靶向臂
靶向臂
pTBM启动子：内皮表达
• hTBM, hEPCR:抗凝剂
CAG启动子：遍在表达
• hCD59, hCD46, hCD55: 补体抑制剂
• hHO1: 抗炎、抗凋亡

图2E

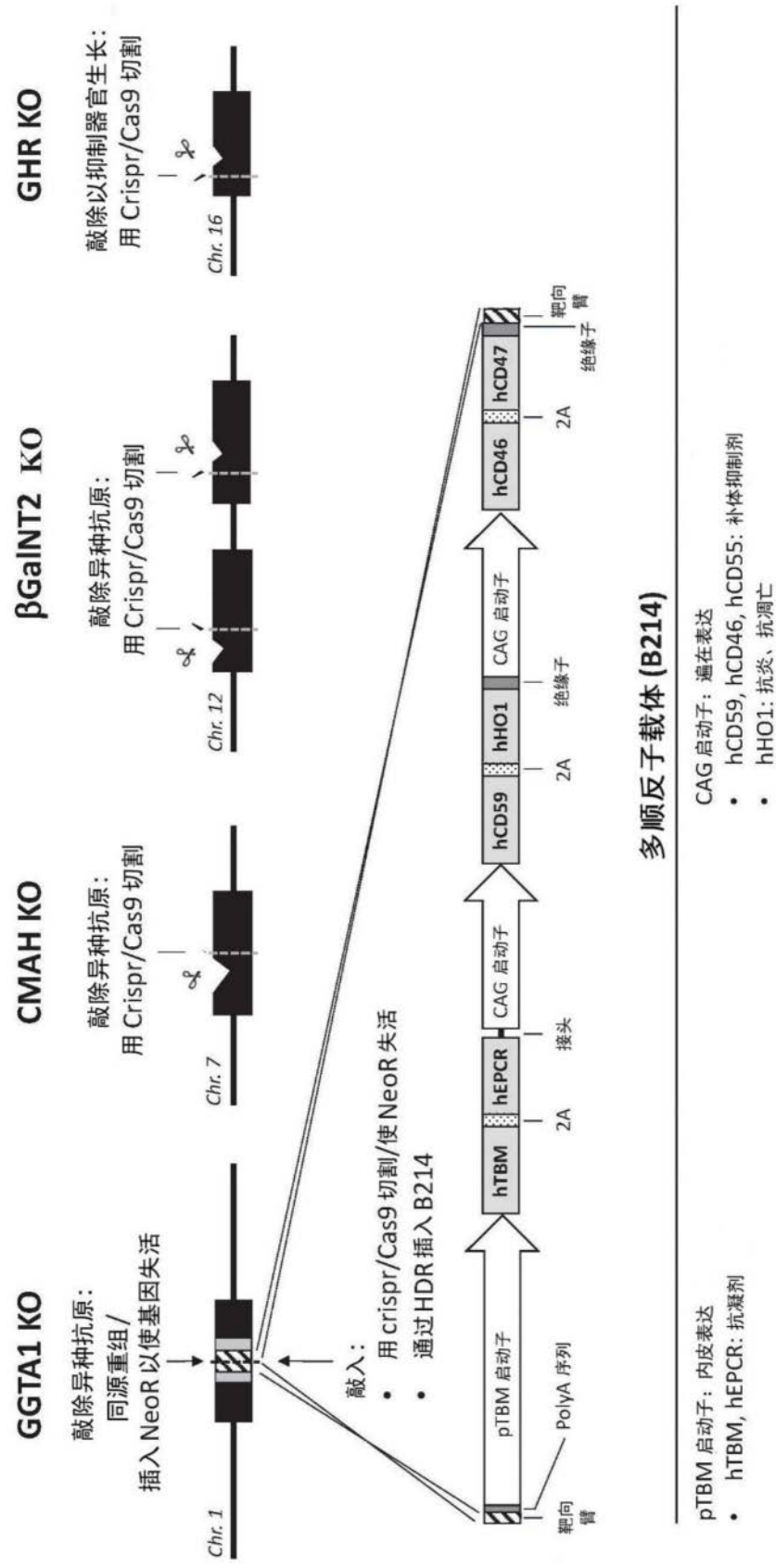

GGTA1 KO
敲除异种抗原：
同源重组/
插入NeoR以使基因失活
Chr. 1
CMAH KO
敲除异种抗原：
用Crispr/Cas9切割
Chr. 7
βGalNT2 KO
敲除异种抗原：
用Crispr/Cas9切割
Chr. 12
GHR KO
敲除以抑制器官生长：
用Crispr/Cas9切割
Chr. 16
敲入：
• 用crispr/Cas9切割/使NeoR失活
• 通过HDR插入B214
pTBM启动子
PolyA序列
靶向臂
hTBM
hEPCR
2A
接头
CAG启动子
hCD59
hHO1
2A
绝缘子
CAG启动子
hCD46
hCD47
2A
绝缘子
靶向臂
多顺反子载体 (B214)
pTBM启动子：内皮表达
• hTBM, hEPCR: 抗凝剂
CAG启动子：遍在表达
• hCD59, hCD46, hCD55: 补体抑制剂
• hHO1: 抗炎、抗凋亡

图2F

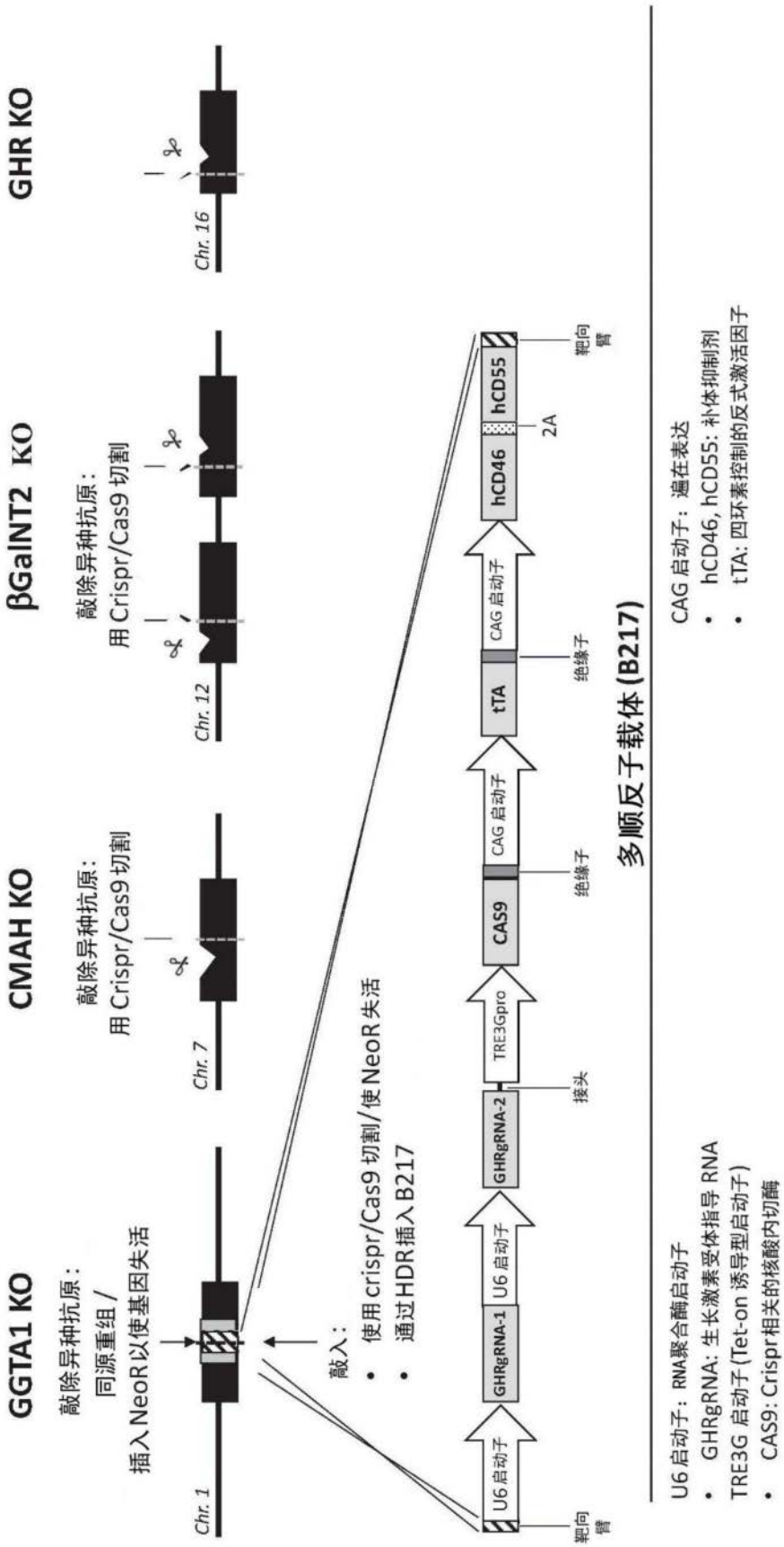

GGTA1 KO
敲除异种抗原：
同源重组 /
插入NeoR以使基因失活
Chr. 1
CMAH KO
敲除异种抗原：
用 Crispr/Cas9 切割
Chr. 7
βGalNT2 KO
敲除异种抗原：
用 Crispr/Cas9 切割
Chr. 12
GHR KO
Chr. 16
敲入：
• 使用 crispr/Cas9 切割/使 NeoR 失活
• 通过HDR插入 B217
多顺反子载体(B217)
U6 启动子
GHRgRNA-1
U6 启动子
GHRgRNA-2
接头
TRE3Gpro
CAS9
CAG 启动子
绝缘子
tTA
CAG 启动子
绝缘子
hCD46
2A
hCD55
靶向臂
靶向臂
U6 启动子：RNA聚合酶启动子
• GHRgRNA: 生长激素受体指导 RNA
TRE3G 启动子(Tet-on 诱导型启动子)
• CAS9: Crispr相关的核酸内切酶
CAG 启动子：遍在表达
• hCD46, hCD55: 补体抑制剂
• tTA: 四环素控制的反式激活因子

图2G

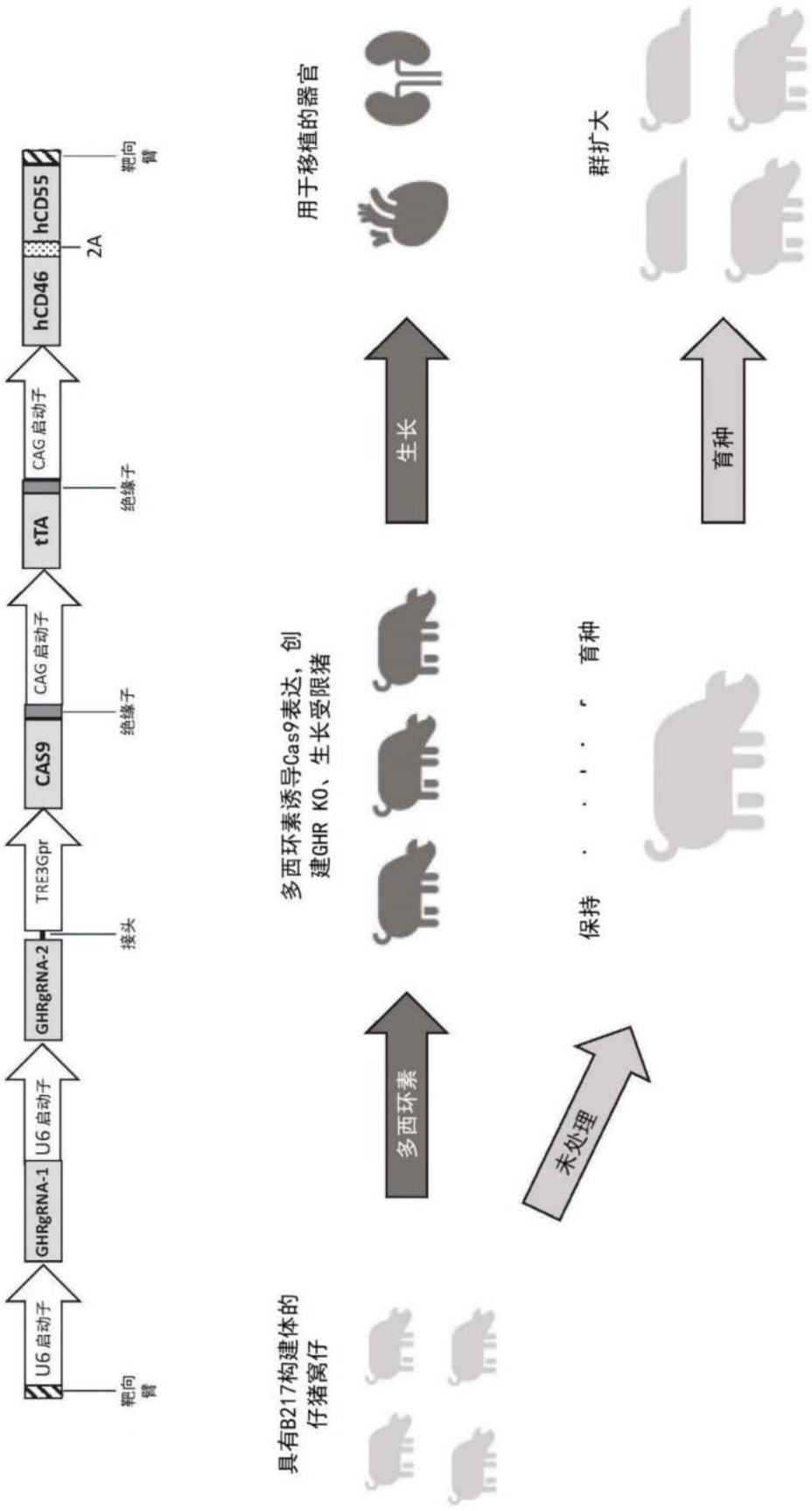

U6启动子
靶向臂
GHRgRNA-1
U6启动子
GHRgRNA-2
接头
TRE3Gpr
CAS9
绝缘子
CAG启动子
tTA
绝缘子
CAG启动子
hCD46
2A
hCD55
靶向臂
具有B217构建体的仔猪窝仔
多西环素
多西环素诱导Cas9表达，创建GHR KO、生长受限猪
保持 · · · · · 育种
未处理
用于移植的器官
生长
群扩大
育种

图2H

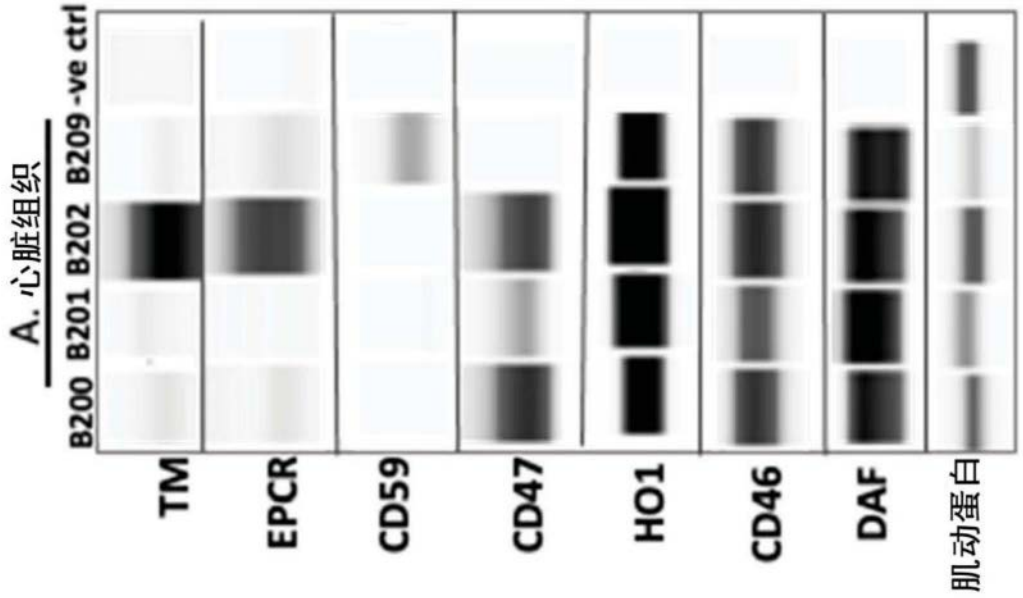

A. 心脏组织
B200 B201 B202 B209 -ve ctrl
TM
EPCR
CD59
CD47
HO1
CD46
DAF
肌动蛋白

图3A

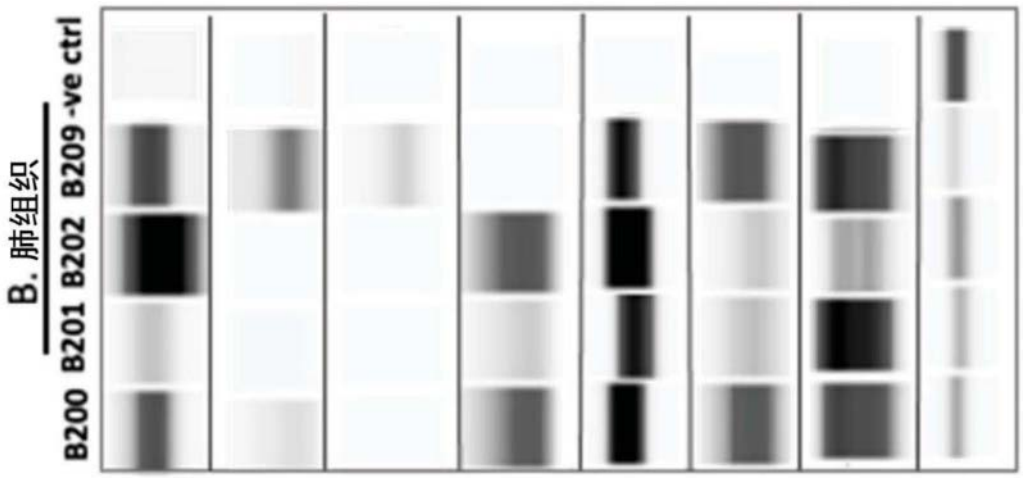

B. 肺组织
B200 B201 B202 B209 -ve ctrl

图3B

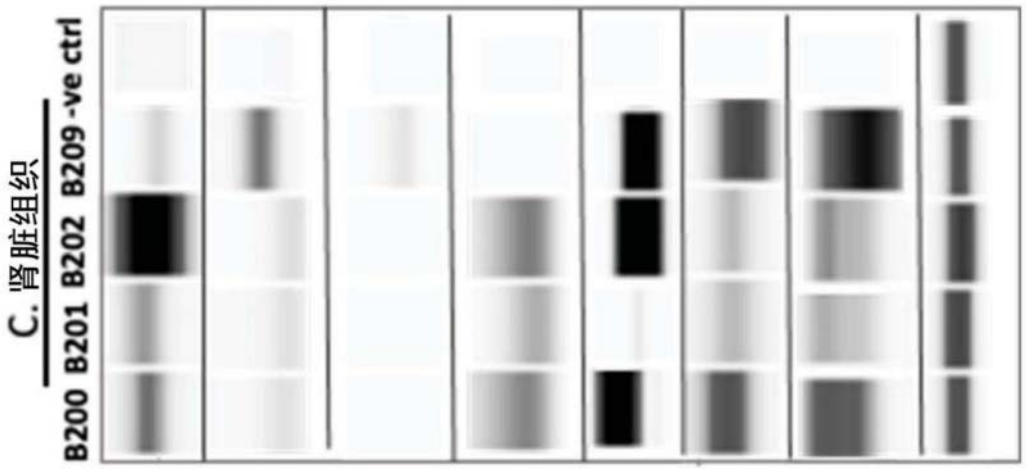


图3C

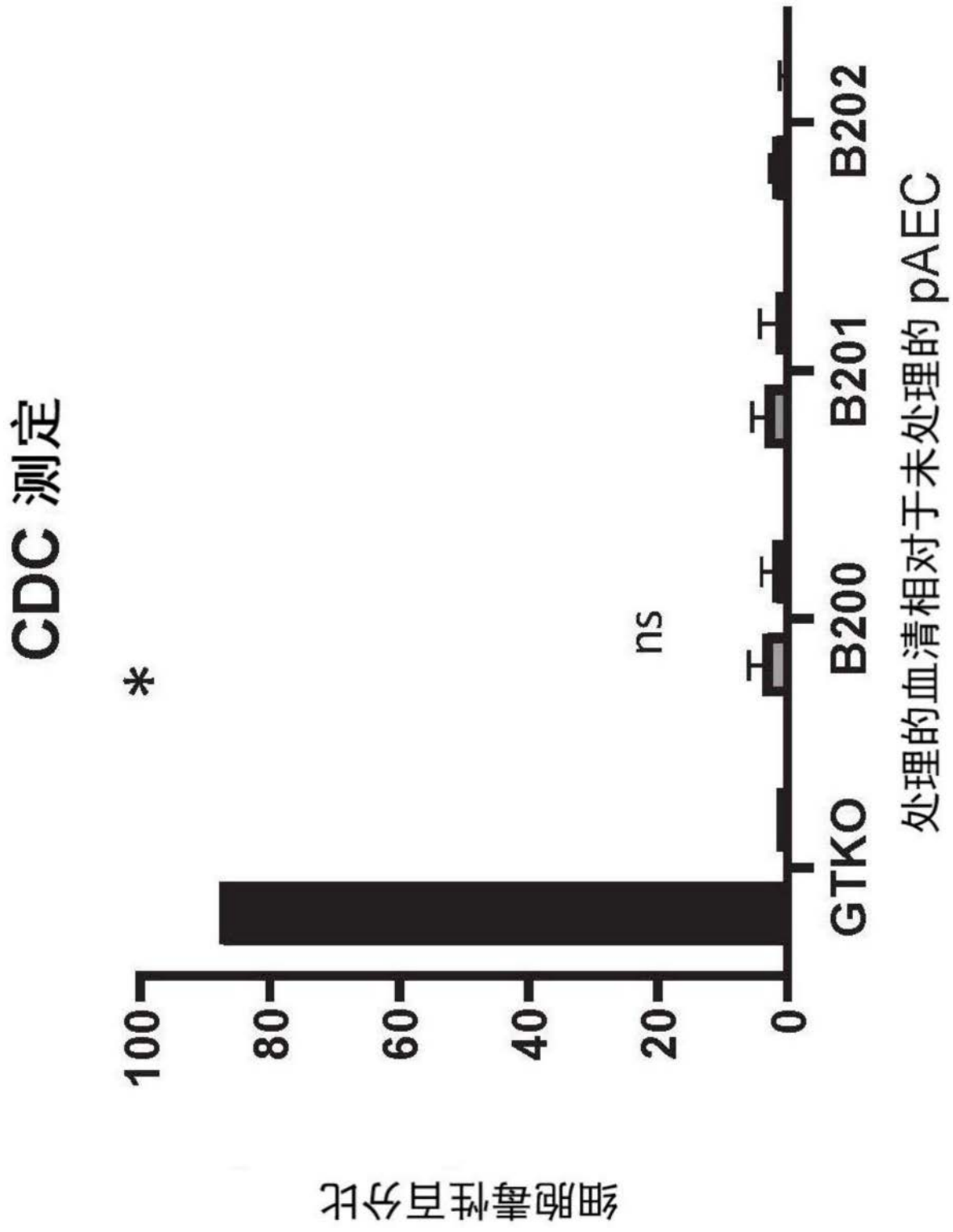

CDC 测定
*
ns
细胞毒性百分比
100
80
60
40
20
0
GTKO
B200
B201
B202
处理的血清相对于未处理的 pAEC

图4

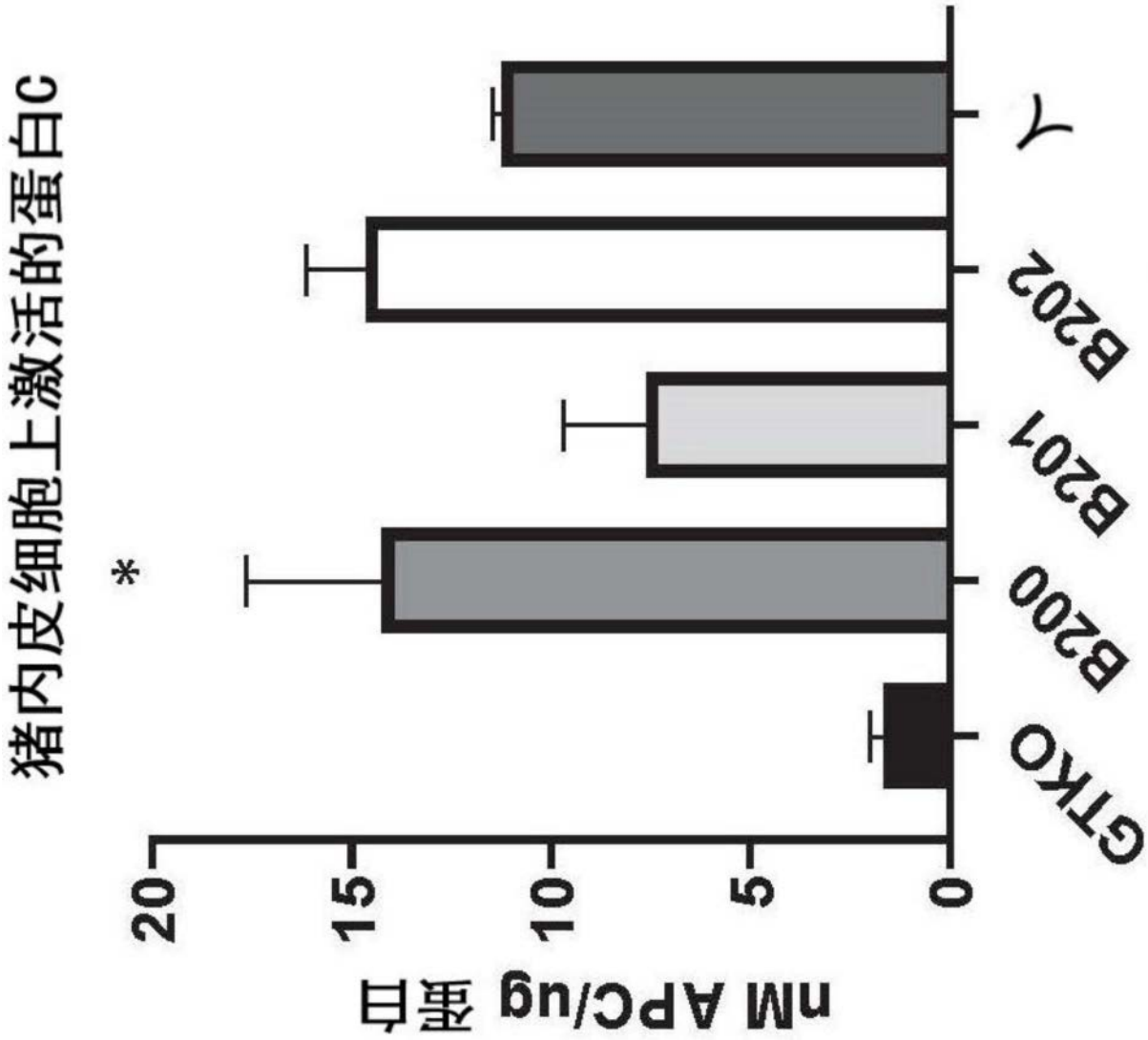


图5

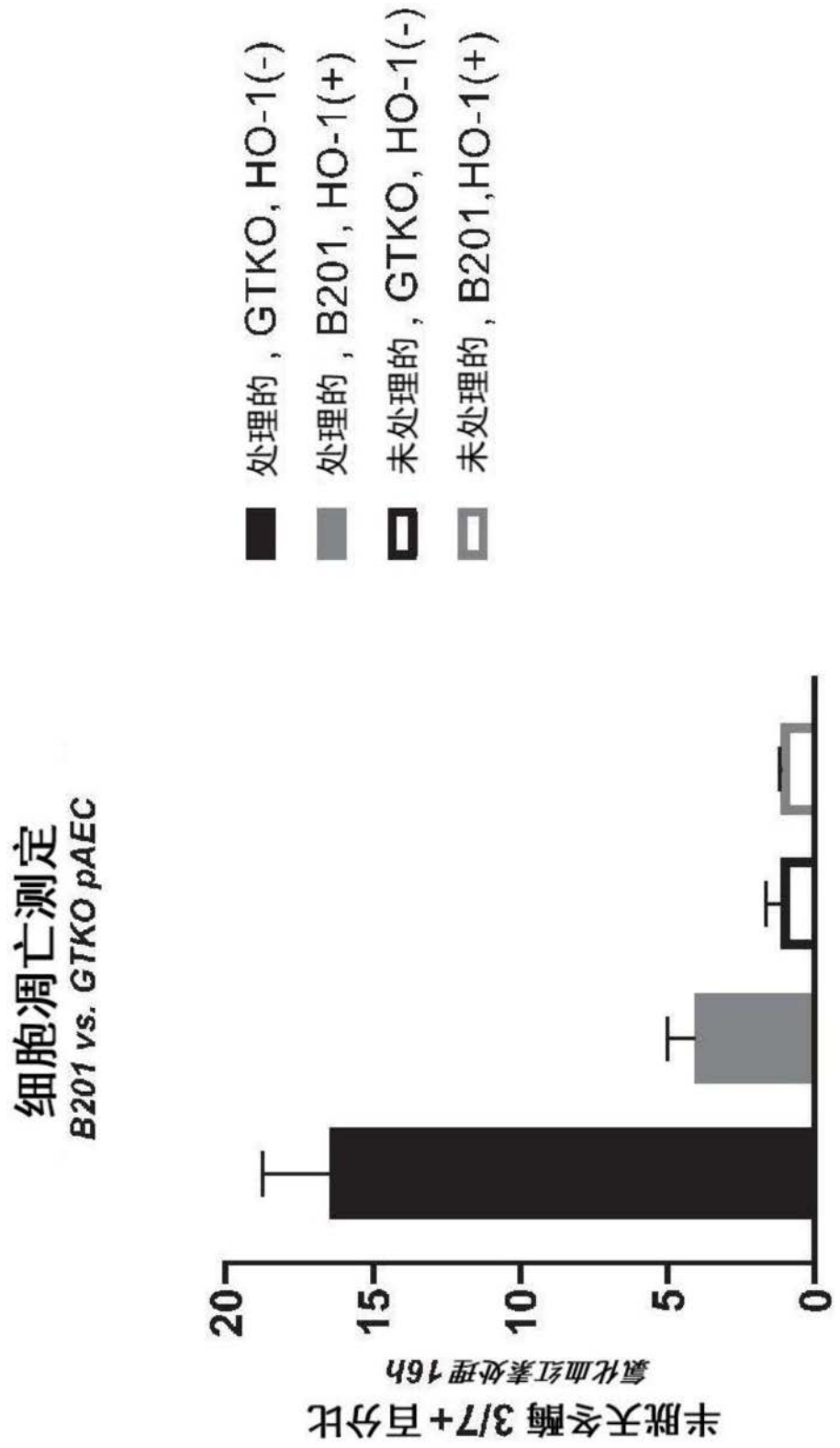

细胞凋亡测定
B201 vs. GTKO pAEC
处理的，GTKO, HO-1(-)
处理的，B201, HO-1(+)
未处理的，GTKO, HO-1(-)
未处理的，B201,HO-1(+)
半胱天冬酶 3/7+ 百分比
氯化血红素处理 16h
0
5
10
15
20

图6

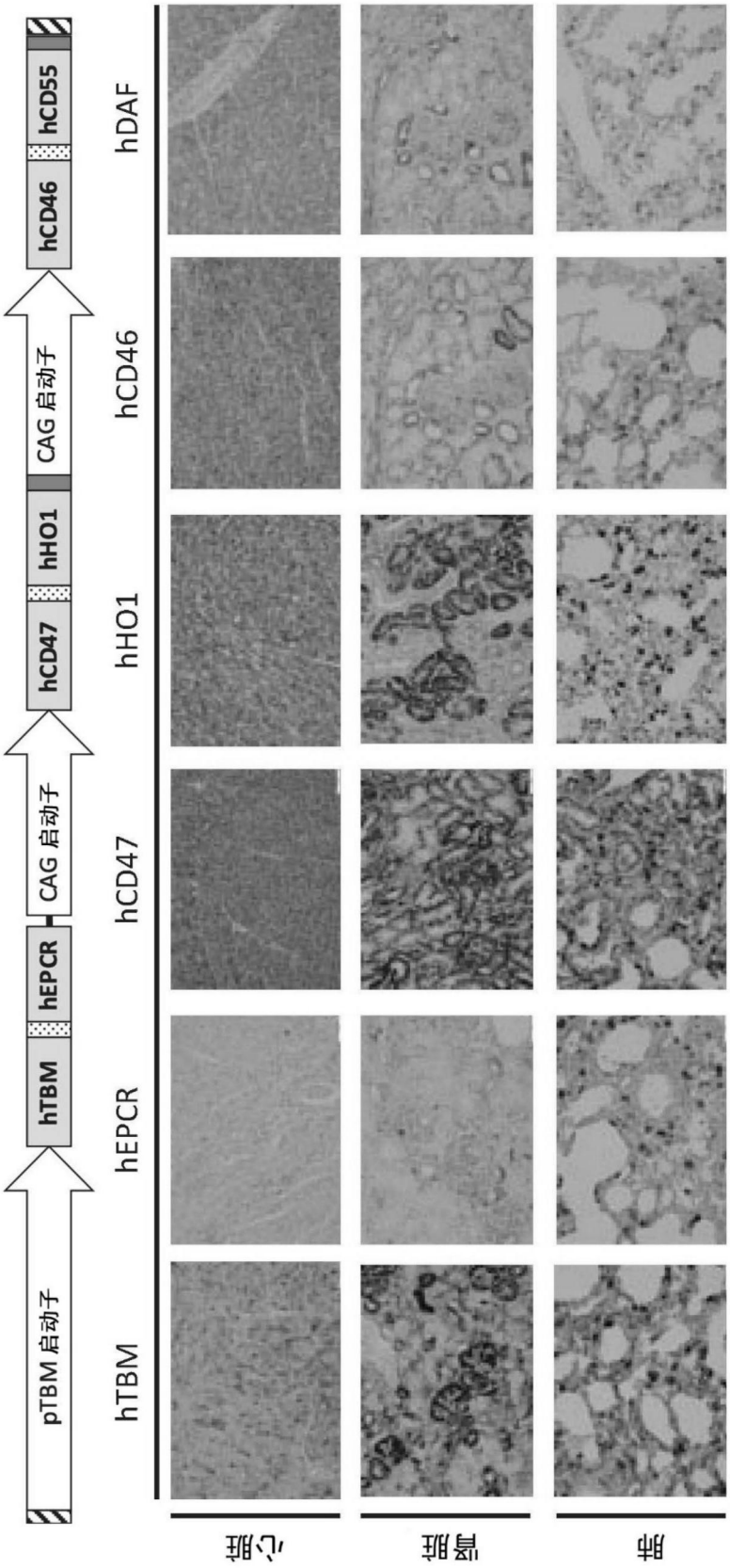

pTBM 启动子
hTBM
hEPCR
CAG 启动子
hCD47
hHO1
CAG 启动子
hCD46
hCD55
hTBM
hEPCR
hCD47
hHO1
hCD46
hDAF
肺
肾脏
心脏

图7A

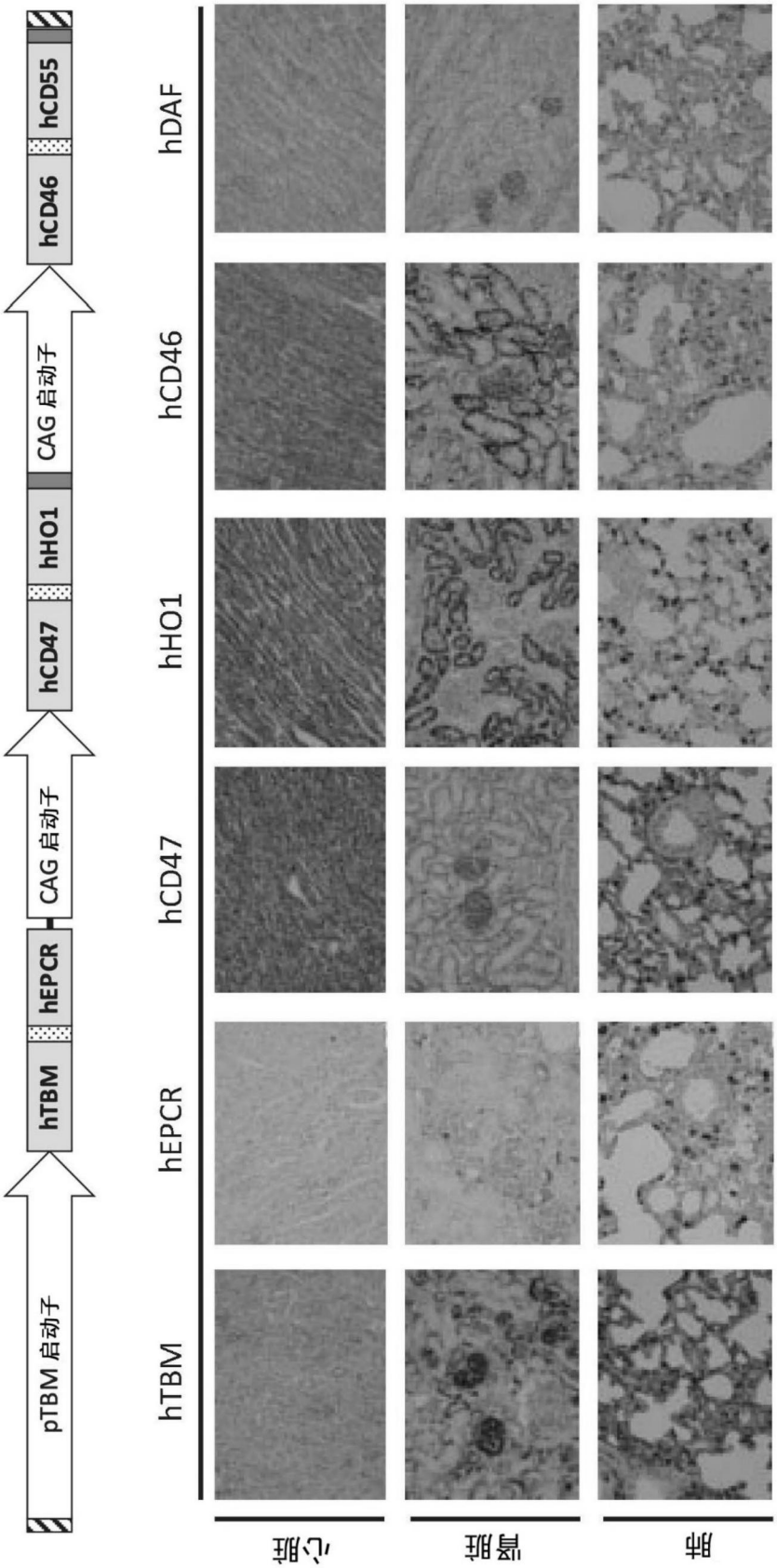

pTBM 启动子
hTBM
hEPCR
CAG 启动子
hCD47
hHO1
CAG 启动子
hCD46
hCD55
hTBM
hEPCR
hCD47
hHO1
hCD46
hDAF
心脏
肾脏
肺

图7B

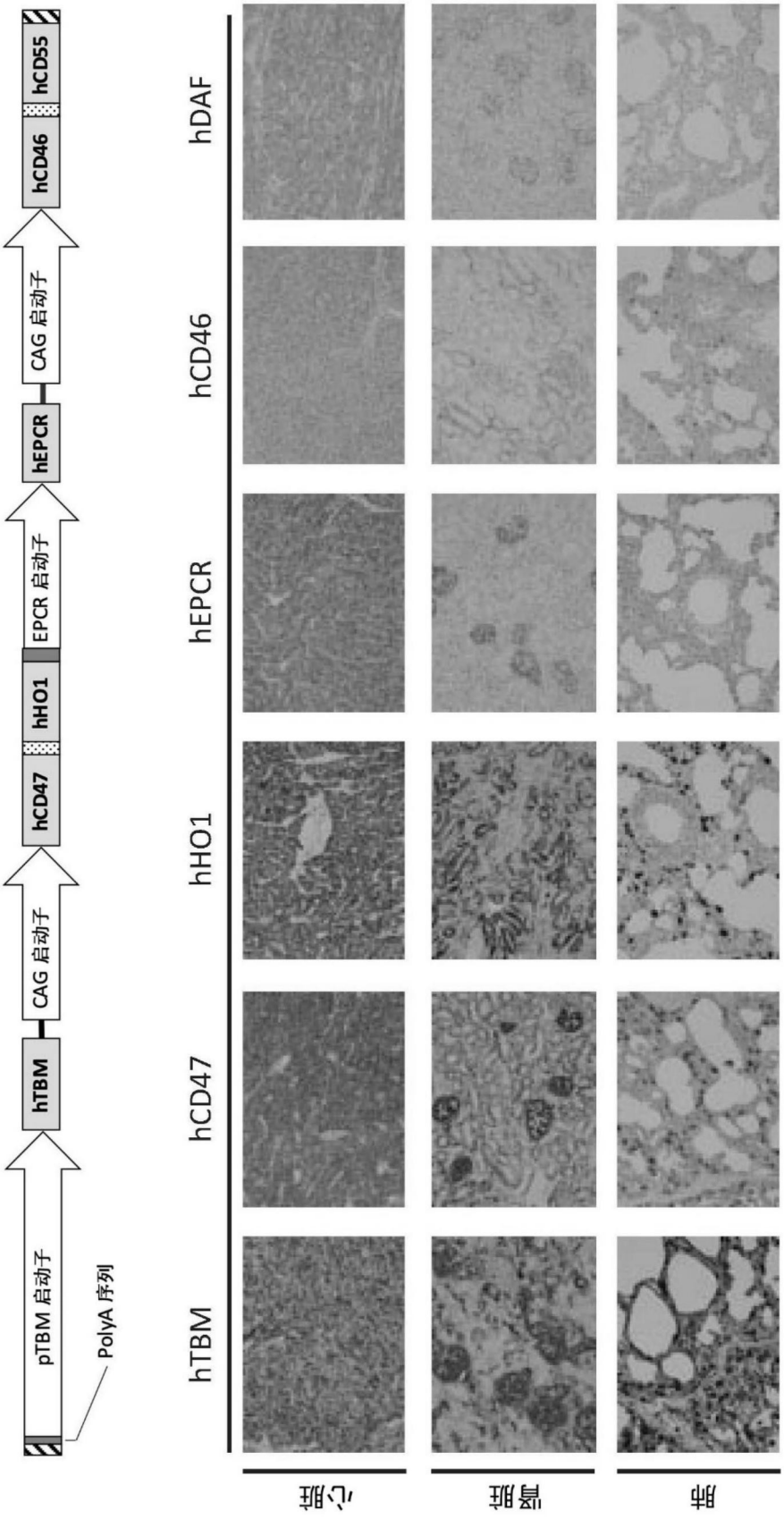

pTBM 启动子
PolyA 序列
hTBM
CAG 启动子
hCD47
hHO1
EPCR 启动子
hEPCR
CAG 启动子
hCD46
hCD55
hTBM
hCD47
hHO1
hEPCR
hCD46
hDAF
心脏
肾脏
肺

图7C

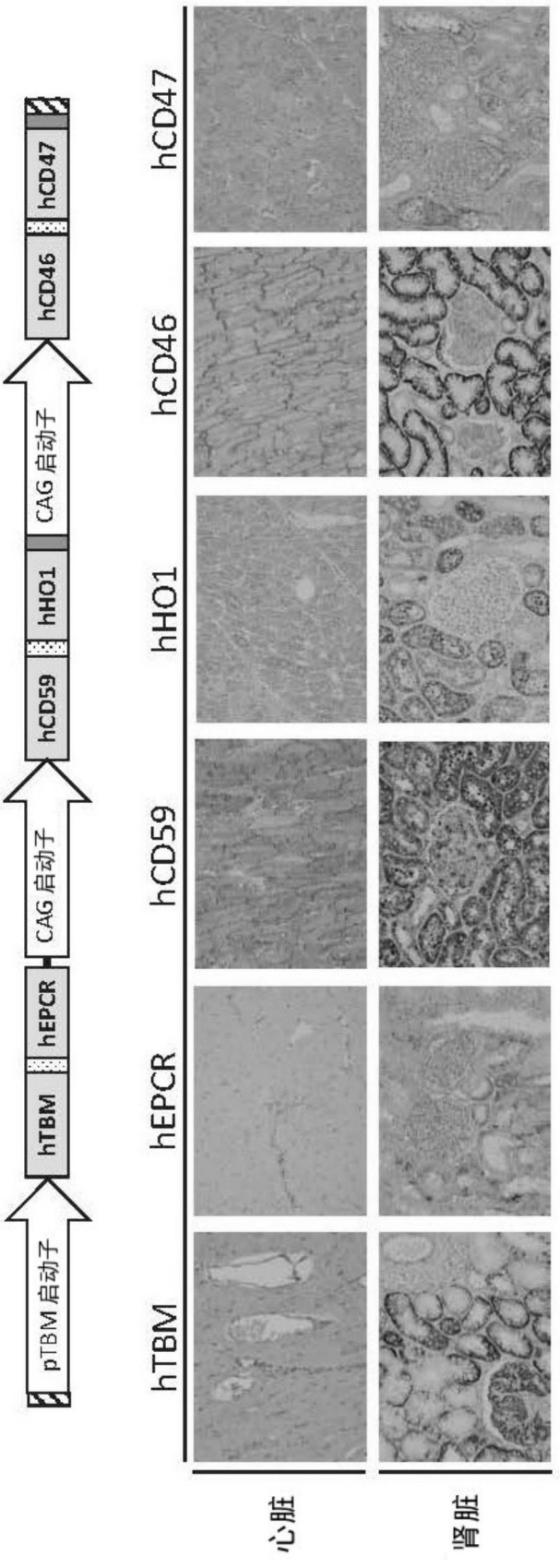

pTBM 启动子
hTBM
hEPCR
CAG 启动子
hCD59
hHO1
CAG 启动子
hCD46
hCD47
hTBM
hEPCR
hCD59
hHO1
hCD46
hCD47
心脏
肾脏

图7D

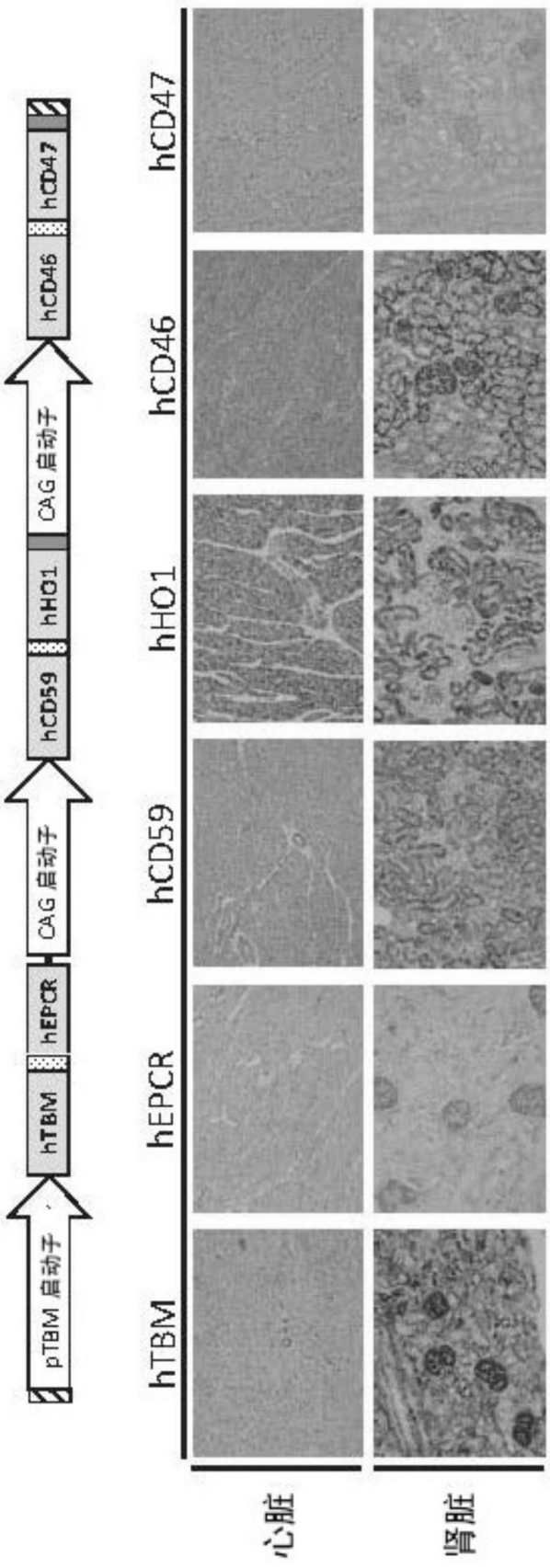

pTBM 启动子
hTBM
hEPCR
CAG 启动子
hCD59
hHO1
CAG 启动子
hCD46
hCD47
hTBM
hEPCR
hCD59
hHO1
hCD46
hCD47
心脏
肾脏

图7E

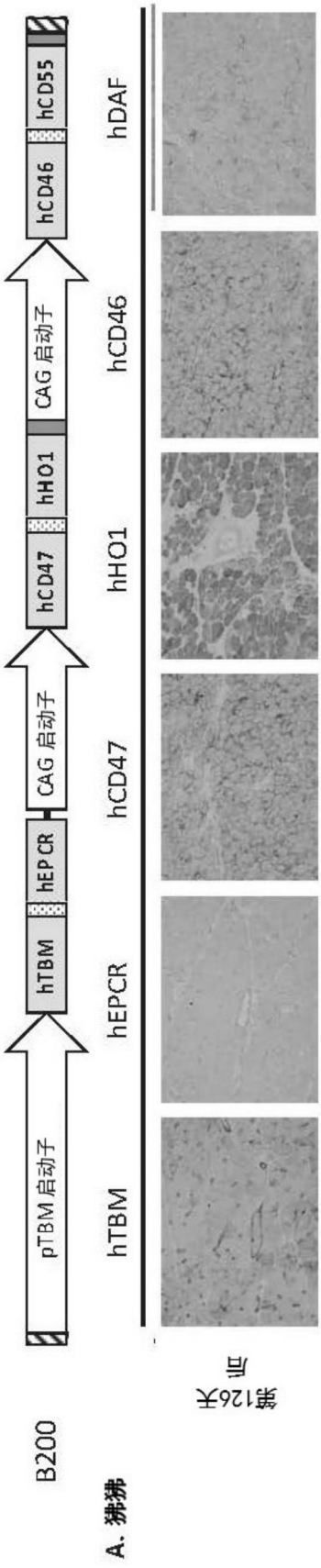

A. 狒狒
B200
pTBM 启动子
hTBM
hEPCR
hTBM
CAG 启动子
hEPCR
hCD47
hCD47
CAG 启动子
hHO1
hHO1
hCD46
hCD46
hDAF
第126天
后

图8A

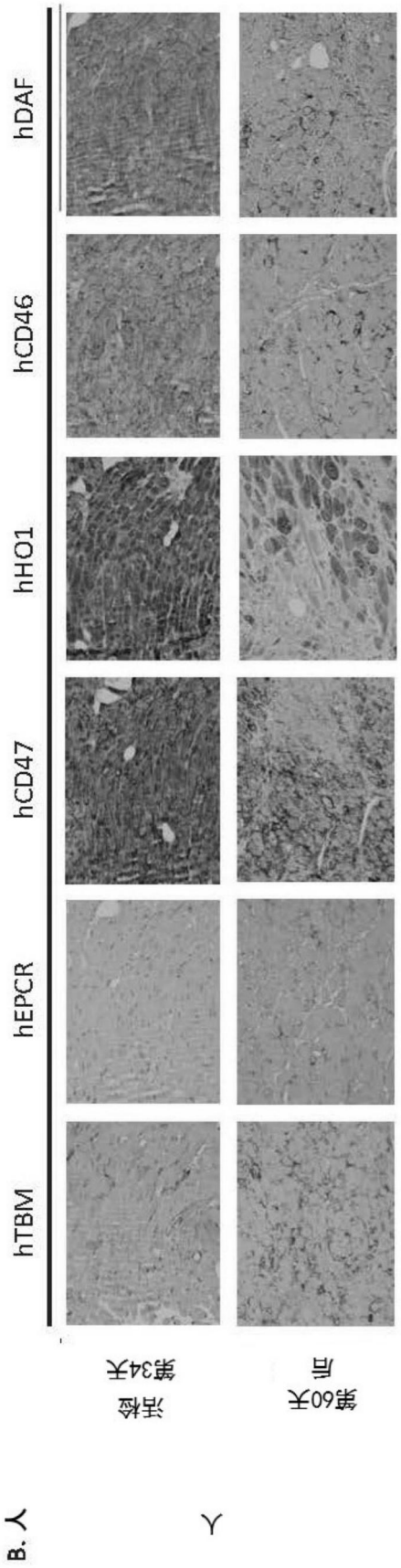


图8B

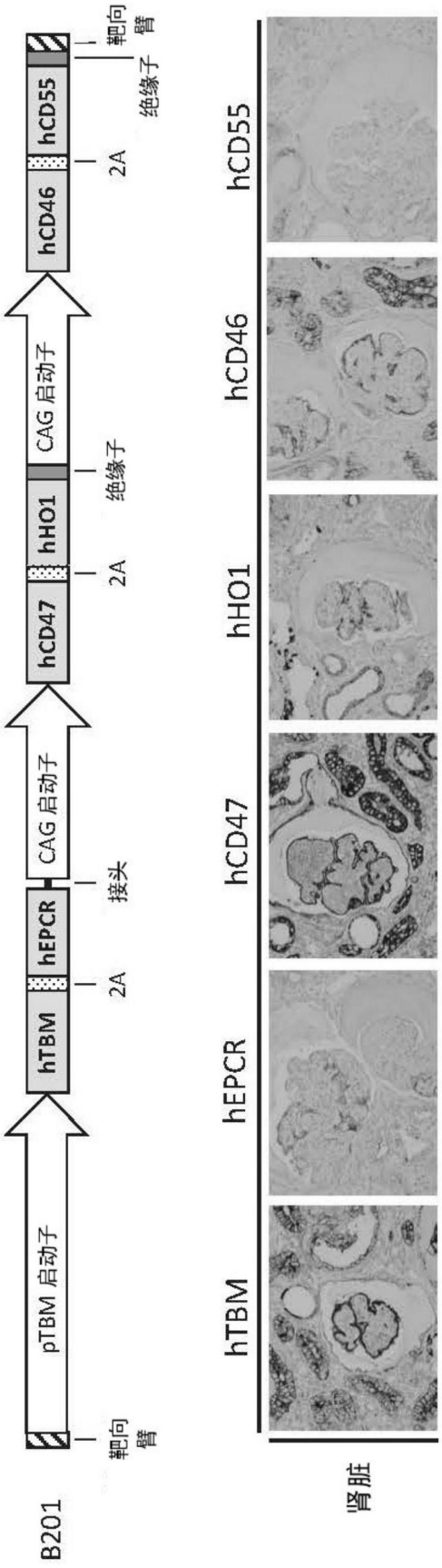

B201
靶向臂
pTBM 启动子
hTBM
2A
hEPCR
接头
CAG 启动子
hCD47
2A
hHO1
绝缘子
CAG 启动子
hCD46
2A
hCD55
绝缘子
靶向臂
hTBM
hEPCR
hCD47
hHO1
hCD46
hCD55
肾脏

图9

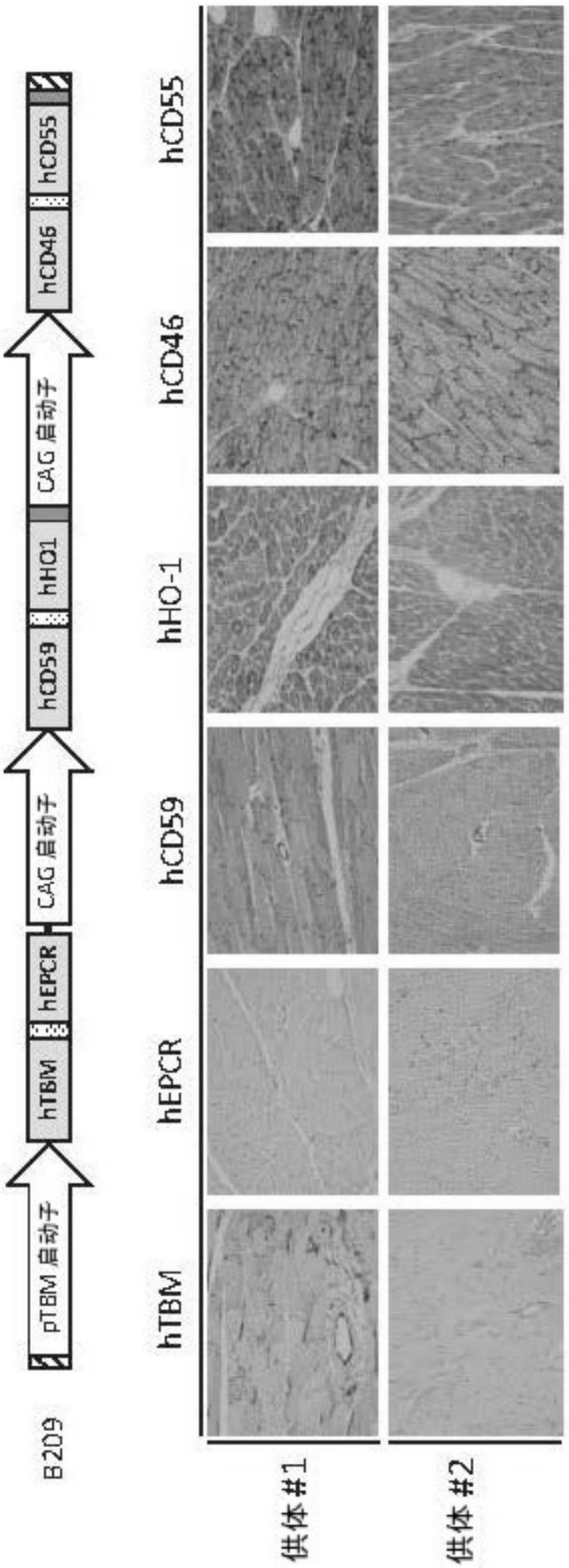

B209
pTBM 启动子
hTBM
hEPCR
CAG 启动子
hCD59
hHO1
CAG 启动子
hCD46
hCD55
hTBM
hEPCR
hCD59
hHO-1
hCD46
hCD55
供体#1
供体#2

图10