



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107148470 A

(43)申请公布日 2017. 09. 08

(21)申请号 201580059884.0

(22)申请日 2015.09.04

(30)优先权数据

10201405497U 2014.09.04 SG

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2015/050301 2015.09.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/036319 EN 2016.03.10

(71)申请人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡

(72)发明人 王朔 吴春晓 曾洁铭

Y·I·普尔瓦提 邱锦标

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

代理人 景鹏 姚开丽

(51)Int.Cl.

C12N 5/0784(2006.01)

C12N 5/095(2006.01)

A61K 35/15(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书31页

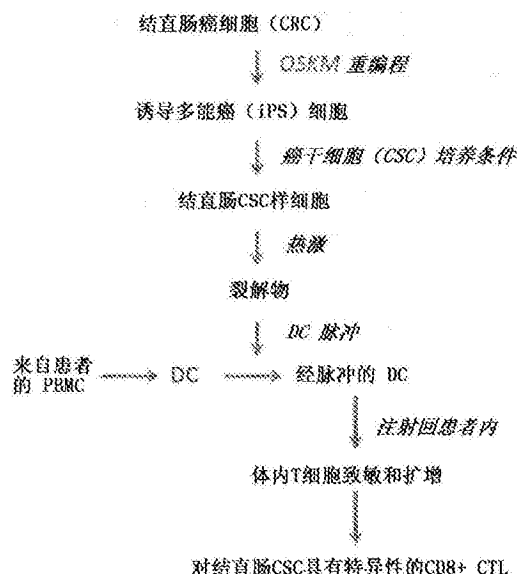
序列表43页 附图7页

(54)发明名称

上调癌干细胞标志物以产生抗原特异性细胞毒性效应T细胞的方法

(57)摘要

本发明涉及制备用于诱导细胞毒性T细胞细胞针对结肠直肠癌的免疫应答的组合物的方法,所述组合物包含经刺激的免疫系统细胞,例如树突细胞(DC)。所述树突细胞通过与结肠直肠癌干细胞(CSC)或其碎片接触而脉冲。这些结肠直肠癌CSC通过对分化的结肠直肠癌细胞(CRC)进行OSKM(Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc)诱导的重编程来产生,OSKM(Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc)诱导的重编程产生未分化的结肠直肠癌CSC样细胞。CSC样细胞和经热激CSC样细胞的裂解物二者均可用于DC脉冲的肿瘤抗原的可及来源以诱导针对结肠直肠癌CSC的特异性免疫应答。



1. 一种组合物,其包含通过与至少一种结肠直肠癌干细胞或其碎片接触而被脉冲的至少一种分离的免疫系统细胞,其中所述结肠直肠癌干细胞通过使至少一种分化的结肠直肠癌细胞逆转以具有未分化的结肠直肠干细胞状态来获得。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述分离的免疫系统细胞是抗原呈递细胞。

3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述抗原呈递细胞是成熟树突细胞。

4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述成熟树突细胞从已通过与所述至少一种结肠直肠癌干细胞或其碎片接触而被脉冲的未成熟树突细胞衍生。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述成熟树突细胞具有上调的CD83、CD40和CD86表达。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的组合物,其中所述结肠直肠癌干细胞是通过在体外使至少一种分化的肿瘤细胞逆转至未分化的结肠直肠干细胞状态获得的体外(试管)结肠直肠干细胞。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的组合物,其中所述结肠直肠癌干细胞是经热激的结肠直肠癌干细胞或其碎片。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述碎片是经热激结肠直肠癌干细胞的裂解物。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的组合物,其中所述结肠直肠癌干细胞是表达能够在体外使分化的结肠直肠癌细胞逆转或重编程为未分化的结肠直肠癌干细胞状态的转录因子的未分化结肠直肠癌干细胞。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的组合物,其中所述未分化结肠直肠癌干细胞通过用能够使分化的结肠直肠癌细胞逆转或重编程为未分化的结肠直肠癌干细胞的转录因子重编程所述分化的结肠直肠癌细胞来获得。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的组合物,其中所述结肠直肠癌干细胞通过用选自Oct4和Sox2的细胞编程因子或转录因子逆转或重编程所述分化的结肠直肠癌细胞来获得。

12. 一种用于刺激对象的免疫系统的组合物,其包含通过与从结肠直肠癌干细胞获得的一种或更多种抗原接触而被脉冲的至少一种抗原呈递细胞,其中所述结肠直肠癌干细胞通过使至少一种分化的结肠直肠癌细胞逆转以具有未分化的结肠直肠干细胞状态来获得,其中所述逆转通过用选自Oct4和Sox2的细胞重编程因子或转录因子重编程从所述对象获得的所述分化结肠直肠癌细胞来实现。

13. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述抗原呈递细胞和所述结肠直肠癌细胞二者从同一或不同对象获得。

14. 根据权利要求11至13中任一项所述的组合物,其中使用杆状病毒载体来将所述细胞重编程因子或转录因子递送到所述结肠直肠癌细胞中,所述杆状病毒载体包含锌指核酸酶编码序列以及含有所述细胞重编程因子或转录因子的融合基因。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述未分化结肠直肠干细胞状态以下列至少一项为特征:

(a) 上皮特征丧失且E-钙粘蛋白表达降低,

(b) 获得间充质特性且波形蛋白(VIM)、纤连蛋白(FN1)、玻连蛋白(VTN)、N-钙粘蛋白(CDH2)、snail(SNAI1)、twist(TWIST1)、锌指E盒结合同源框1(ZEB1)、转化生长因子β1

(TGFB1)、slug (SNAI2) 和SOX4差异表达;以及

(c) 表达选自由以下组成的组的癌干细胞标志物:CD24、CS133、CD144、CD166、醛脱氢酶1 (ALDH1A1)、含有富亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5 (LGR5)、二肽基肽酶4 (DPP4)、连环蛋白 β -1 (CTNNB1)、ATP结合盒亚家族G成员5 (ABCG5) 和整联蛋白 β -1 (ITGB1)。

16. 一种用于脉冲树突细胞使得所述树突细胞能够诱导细胞毒性T淋巴细胞针对体外结肠直肠癌干细胞的特异性免疫应答的组合物,所述组合物包含已从经重编程的体外结肠直肠癌细胞富集的至少一种体外结肠直肠癌干细胞样细胞或其碎片。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其中所述特异性免疫应答的所述诱导包括将来源于所述体外结肠直肠癌干细胞的抗原呈递至T细胞群以及诱导所述T细胞群分化成所述细胞毒性T淋巴细胞,其中所述细胞毒性T淋巴细胞对所述抗原具有特异性。

18. 一种产生经刺激的免疫系统细胞的方法,其包括:使结肠直肠癌干细胞或其碎片与至少一种免疫系统细胞接触,其中所述结肠直肠癌干细胞通过使至少一种分化的结肠直肠癌瘤细胞逆转至其未分化的干细胞状态来获得。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述结肠直肠癌干细胞是表达能够使分化的结肠直肠癌瘤细胞逆转或重编程为未分化的癌干细胞状态的转录因子的未分化的癌干细胞。

20. 根据权利要求18至19中任一项所述的方法,其中所述未分化结肠直肠癌干细胞通过用能够使分化的结肠直肠癌瘤细胞逆转为未分化的结肠直肠癌干细胞的重编程因子或转录因子重编程所述分化的结肠直肠癌瘤细胞来获得。

21. 根据权利要求18至20中任一项所述的方法,其中由分化的结肠直肠癌瘤细胞向其未分化的干细胞状态的所述逆转通过用选自Oct4和Sox2的细胞重编程因子或转录因子重编程所述结肠直肠癌瘤细胞来实现。

22. 根据权利要求18至21中任一项所述的方法,其中所述结肠直肠癌瘤细胞和所述免疫细胞是自体同源细胞或同种异体细胞。

23. 根据权利要求18至22中任一项所述的方法,其中所述经刺激的免疫系统细胞是抗原呈递细胞。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述抗原呈递细胞是成熟树突细胞。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述成熟树突细胞由已与所述结肠直肠癌干细胞或其碎片接触的未成熟树突细胞衍生。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述成熟树突细胞具有上调的CD83、CD40和CD86表达。

27. 根据权利要求18至26中任一项所述的方法,其中所述结肠直肠癌干细胞是体外(或从试管获得的)结肠直肠癌干细胞。

28. 根据权利要求18至27中任一项所述的方法,其中所述癌干细胞是经热激的癌干细胞或其碎片。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述碎片是经热激的癌干细胞的裂解物。

30. 根据权利要求18至29中任一项所述的方法,其中所述方法是体内、离体或体外方法。

31. 根据权利要求19至30中任一项所述的方法,其中使用杆状病毒载体来将所述细胞重编程因子或转录因子递送到所述肿瘤细胞中,所述杆状病毒载体包含锌指核酸酶编码序

列以及含有所述细胞重编程因子的融合基因。

32. 根据权利要求18至31中任一项所述的方法, 其中所述未分化的干细胞状态以下列至少一项为特征:

(a) 上皮特征丧失且E-钙粘蛋白表达降低,

(b) 获得间充质特性且波形蛋白 (VIM)、纤连蛋白 (FN1)、玻连蛋白 (VTN)、N-钙粘蛋白 (CDH2)、snail (SNAI1)、twist (TWIST1)、锌指E盒结合同源框1 (ZEB1)、转化生长因子 β 1 (TGFB1)、slug (SNAI2) 和SOX4差异表达; 以及

(c) 表达选自由以下组成的组的癌干细胞标志物: CD24、CS133、CD144、CD166、醛脱氢酶1 (ALDH1A1)、含有富亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5 (LGR5)、二肽基肽酶4 (DPP4)、连环蛋白 β -1 (CTNNB1)、ATP结合盒亚家族G成员5 (ABCG5) 和整联蛋白 β -1 (ITGB1)。

33. 一种疫苗, 其包含用权利要求18至32中任一项所述的方法刺激的免疫细胞。

34. 根据权利要求33所述的疫苗, 其中所述免疫细胞是抗原呈递细胞。

35. 根据权利要求34所述的疫苗, 其中所述抗原呈递细胞是树突细胞。

36. 根据权利要求33至35中任一项所述的疫苗, 其中所述免疫细胞和肿瘤细胞是从接受所述疫苗的对象获得的自体同源细胞或从接受所述疫苗的不同对象获得的同种异体细胞。

37. 一种经刺激的免疫细胞, 其由权利要求18至32中任一项所述的方法获得。

38. 一种治疗对象中结肠直肠癌的方法, 其包括: 用权利要求1至16中任一项所述的组合物或权利要求33至36中所述的疫苗或通过权利要求18至32中任一项所述的方法刺激的免疫细胞免疫所述对象。

39. 根据权利要求1至16中任一项所述的组合物或权利要求33至36中所述的疫苗或通过权利要求18至32中任一项所述的方法刺激的免疫细胞在制备用于治疗对象中结肠直肠癌的药物中的用途。

40. 一种产生用于对象的包含自体同源树突细胞的抗结肠直肠癌疫苗的方法, 其包括以下步骤: (a) 提取并纯化从来自所述对象的样品获得的外周血单个核细胞 (单核细胞); (b) 将所述单核细胞在有效地诱导单核细胞向树突细胞分化的条件下培养; (c) 使 (b) 中的经培养未成熟树突细胞与癌干细胞或其碎片接触, 所述癌干细胞或其碎片通过使至少一种分化的结肠直肠癌细胞逆转至其未分化的结肠直肠干细胞状态来获得; (d) 用树突细胞成熟诱导剂培养 (c) 中载有所述结肠直肠癌干细胞的树突细胞; 以及 (e) 收获载有所述结肠直肠癌干细胞的成熟树突细胞作为抗癌疫苗。

41. 根据权利要求40所述的方法, 其中 (b) 中的所述条件包括将所述单核细胞在包含GM-CSF和IL-4的培养基中进行培养。

上调癌干细胞标志物以产生抗原特异性细胞毒性效应T细胞的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2014年9月4日提交的新加坡专利申请No.10201405497U的优先权权益,其内容出于所有目的而在此通过引用整体并入。

技术领域

[0003] 本发明一般性地涉及癌症免疫治疗。特别地,本发明涉及使用经重编程的结肠直肠癌干细胞来激活免疫系统细胞对抗癌细胞。

背景技术

[0004] 结肠直肠癌(Colorectal cancer,CRC)是世界范围内最常诊断的癌症之一,并且在很多工业化国家是癌症相关致死率的第二或第三主要原因。最初诊断患有局部化CRC的患者中有超过50%最终发展成伴随远端转移或复发的IV期CRC。已发现,高肿瘤发生性(或肿瘤引发性)细胞(即,结肠直肠癌干细胞(cancer stem cell,CSC))的小亚群存在于多种人恶性肿瘤例如CRC中。CSC使干细胞保持自我更新并且产生表型多样的肿瘤细胞群的能力。这些肿瘤发生性细胞在维持肿瘤生长并且引发远端转移中是关键的。CSC还被认为导致肿瘤对主要常规治疗策略(例如化学治疗和放射治疗)的抗性。认为这些常规策略尽管去除原发性肿瘤和减小肿瘤体积但是未能完全消除CSC使得肿瘤复发和转移。因此,认为CSC导致肿瘤发生、癌症复发、转移和CRC治疗失效。

[0005] 因此,需要靶向CSC的新治疗方法来防止CRC转移和肿瘤发生。探索的一种方法是基于癌干细胞的癌症免疫治疗。然而,开发该策略的限制之处在于:缺乏足够量的肿瘤细胞来提供用于激活针对CRC细胞的免疫系统细胞的肿瘤特异性抗原(tumor-specific antigen,TSA)和肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen,TAA)。

[0006] 因此,本发明的一个目的是提供针对结肠直肠癌的经改进的癌症免疫治疗,其克服或至少改善上述一个或更多个缺点。

[0007] 本发明的另一个目的是提供足够量的携带肿瘤特异性抗原(TSA)和肿瘤相关抗原(TAA)的肿瘤细胞来激活针对CRC细胞的免疫系统细胞以用于癌症治疗。

[0008] 本发明的又一个目的是提供足够量的抗原(例如肿瘤特异性抗原(TSA)和肿瘤相关抗原(TAA))来激活针对CRC细胞的免疫系统细胞以用于癌症治疗。

发明内容

[0009] 在第一方面,提供了一种组合物,其包含通过与至少一种结肠直肠癌干细胞或其碎片接触而脉冲的至少一种分离的免疫系统细胞,其中所述结肠直肠癌干细胞通过使至少一种分化的结肠直肠癌细胞逆转以具有未分化的结肠直肠干细胞状态来获得。

[0010] 在第二方面,提供了用于刺激对象的免疫系统的组合物,其包含通过与从结肠直肠癌干细胞获得的一种或更多种抗原接触而脉冲的至少一种抗原呈递细胞,其中所述结肠

直肠癌干细胞通过使至少一种分化的结肠直肠癌细胞逆转以具有未分化的结肠直肠干细胞状态来获得,其中所述逆转通过用选自Oct4和Sox2的细胞重编程因子或转录因子重编程从该对象获得的分化结肠直肠癌细胞来实现。

[0011] 在第三方面,提供了一种用于脉冲树突细胞使得所述树突细胞能够诱导细胞毒性T淋巴细胞针对体外结肠直肠癌干细胞的特异性免疫应答的组合物,所述组合物包含已从经重编程的体外结肠直肠癌细胞富集的至少一种体外结肠直肠癌干细胞样细胞或其碎片。

[0012] 在第四方面,提供了一种产生经刺激的免疫系统细胞的方法,其包括:使结肠直肠癌干细胞或其碎片与至少一种免疫系统细胞接触,其中所述结肠直肠癌干细胞通过使至少一种分化的结肠直肠癌细胞逆转至其未分化的干细胞状态来获得。

[0013] 在第五方面,提供了一种疫苗,其包含用如本文中限定的方法刺激的至少一种免疫细胞。

[0014] 在第六方面,提供了通过如本文中限定的方法获得的经刺激的免疫细胞。

[0015] 在第七方面提供了一种在对象中治疗结肠直肠癌的方法,其包括:用本文中限定的组合物或本文中限定的疫苗或通过如本文中限定的方法刺激的免疫细胞免疫所述对象。

[0016] 在第八方面,提供了本文中限定的组合物或本文中限定的疫苗或通过如本文中限定的方法刺激的免疫细胞在制备用于治疗对象中结肠直肠癌的药物中的用途。

[0017] 在第九方面,提供了一种制备用于对象的包含自体同源树突细胞的抗结肠直肠癌疫苗的方法,其包括以下步骤:(a)提取并纯化从来自所述对象的样品获得的外周血单个核细胞(单核细胞);(b)将所述单核细胞在有效地诱导单核细胞向树突细胞分化的条件下培养;(c)使(b)中的经培养未成熟树突细胞与癌干细胞或其碎片接触,所述癌干细胞或其碎片通过使至少一种分化的结肠直肠癌细胞逆转至其未分化的结肠直肠干细胞状态来获得;(d)用树突细胞成熟诱导剂培养(c)中装载有结肠直肠癌干细胞的树突细胞;以及(e)收获装载有结肠直肠癌干细胞的成熟树突细胞作为抗癌疫苗。

附图说明

[0018] 在参照发明详述的同时结合非限制性实施例和附图考虑将更好地理解本发明,在附图中:

[0019] 图1

[0020] [图1]示出了结肠直肠癌(CRC)细胞产生诱导多能癌(induced pluripotent cancer, iPC)细胞的重编程。(A)是显示根据BV-ZFN诱导的DNA DBS由杆状病毒(BV) DNA供体BV-OSKM提供的OSKM表达盒的AAVS1基因座整合。HR(L) & HR(R):HR的左臂和右臂。FP&RP:用于PCR基因分型的PCR正向和反向引物的结合位点。(B)示出了BV转导之后的iPC细胞产生。观察到在丝裂霉素C失活小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)上形成iPS细胞样集落。示出了由HCT8细胞衍生的集落的相差图像(左)和eGFP荧光图像(右)。细胞在人iPS细胞培养基中进行培养。示出了来自人CRC HCT8亚克隆的结果。(C)示出了PCR基因分型的结果以确定OSKM盒靶向地整合到AAVS1基因座中。利用(A)中所示的3-kb DNA碎片的扩增来鉴定所靶向插入。(D)示出了由HCT-8细胞衍生的iPC细胞中多能性标志物的表达。进行了免疫染色以检测iPC细胞集落中Nanog、SSEA-4和TRA-1-60的表达。(E)示出了由所衍生iPC细胞形成的畸胎瘤的组织切片的苏木精和伊红染色。该畸胎瘤中发现的分化组织的组

织学显示了未成熟的神经胶质组织和神经上皮玫瑰花结(外胚层)、软骨(中胚层)和腺(内胚层)。

[0021] 图2

[0022] [图2] 显示OSKM的异位表达导致人CRC中的CSC样特性提高。(A) 是显示通过RT-qPCR量化的OSKM基因表达的图。引物设计成扩增内源和外源OSKM基因二者。使用GAPDH基因表达来归一化和计算倍数变化。(B) 是举例说明肿瘤球形成效率的图。测试了两个OSKM表达克隆HCT3.11和SW1.9的效率。将结果相对于其亲代细胞的归一化。(C) 是量化CSC标志物阳性细胞的百分比的流式细胞术分析的结果。所示结果是三个实验的平均值 $\pm$ SD。

[0023] 图3

[0024] [图3] 描述了通过定量RT-PCR分析的OSKM表达结肠直肠CSC样细胞的分子表征。(A) 是显示结肠直肠CSC标志物的结果的图。(B) 是显示上皮-间充质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 标志物的结果的图。(C) 是显示常用的CRC临床生物标志物的结果的图。(D) 是显示通过GWAS鉴定的与CRC高风险基因座相关的基因的结果的图。使用进行OSKM遗传修饰的野生型HCT-8衍生单细胞克隆作为对照。所有倍数变化均相对于GAPDH表达水平归一化。

[0025] 图4

[0026] [图4] 示出了通过用装载有OSKM基因表达CRC细胞的裂解物的树突细胞致敏CD8⁺初始T细胞的来自人PBMC的Oct反应性T细胞的产生。(A) 是该方案的示意图:开发了DC并且CD8⁺初始T细胞选自健康供体的HLA-A2⁺人PBMC。在用肿瘤裂解物进行DC脉冲和DC成熟之后,使用DC来刺激体外自体同源T细胞持续连续两周。然后,收获活T细胞并在IFN- γ ELISPOT测定中评价其抗原特异性IFN- γ 应答。(B) 示出了分化期间以及用肿瘤裂解物脉冲和成熟之后的DC形态。(C) 示出了在脉冲和成熟前后通过流式细胞术分析的DC表征。可以看出,在成熟之后,CD83和CD40的表达显著提高。(D) 示出了在选择前后通过流式细胞术分析的初始T细胞表征。观察到CD8⁺群增加,以及CD45RO⁺和CD57⁺记忆T细胞消耗。(E) 中的图显示,经HCT3.11肿瘤裂解物脉冲的DC刺激体外自体同源Oct4反应性T细胞应答。通过装载有Oct4和GFP(阳性对照)肽的T2细胞重新刺激来在IFN- γ ELiSpot中检测T细胞针对肿瘤抗原的反应性。示出了预先用以下刺激的T细胞的IFN- γ 应答:未经脉冲的DC、经野生型(WT) HCT8细胞的裂解物脉冲的DC以及经Oct4-和GFP-表达HCT3.1克隆、T细胞单独和T2细胞单独的裂解物脉冲的DC。***, $p < 0.001$ 相对于T2单独,通过方差分析。

[0027] 图5

[0028] [图5] 示出了用经热激肿瘤细胞进行DC脉冲对结肠直肠CSC反应性T细胞的产生的作用。(A) 示出了OSKM表达的HCT3.11细胞中热激上调的Hsp70而不影响Oct4表达。样品#1和#2:在具有(#1)或不具有(#2)热激下在Cellgro培养基中的细胞。样品#3和#4:在具有(#4)或不具有(#3)热激下在PBS中的细胞。(B) 显示,在用从经热激HCT3.11细胞收集的上清液脉冲之后不影响成熟DC(mDC)上的DC标志物表达。DC表征用流式细胞术来进行。(C) 是通过流式细胞术分析在DC致敏之后表征T细胞的结果。(D) 显示,用从经热激HCT3.11细胞收集的上清液脉冲的DC在体外刺激针对结肠直肠CSC的自体同源T细胞应答。通过装载指定肽的T细胞重新刺激来在IFN- γ ELiSpot中检测T细胞针对肿瘤抗原的反应性。包括以下用于进行比较:无DC致敏下的T细胞、用经未经脉冲DC刺激的T细胞和用经未热激HCT3.11的全裂解物

脉冲之后的DC刺激的T细胞。

[0029] 图6

[0030] [图6]概括了采用CRC细胞的OSKM重编程来进行针对CRC CSC的DC疫苗接种的策略。OSKM:Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc;CTL:细胞毒性T淋巴细胞。

发明内容

[0031]

[0032] 癌细胞重编程是CSC分化成肿瘤细胞的逆转过程。该过程有利于非肿瘤发生性癌细胞向较不分化的状态去分化,从而产生具有肿瘤引发能力的细胞群。

[0033] 在第一个方面,提供了一种组合物,其包含通过与至少一种结肠直肠癌干细胞或其碎片接触而脉冲的至少一种分离的免疫系统细胞,其中所述结肠直肠癌干细胞通过使至少一种分化的结肠直肠癌细胞逆转以具有未分化的结肠直肠干细胞状态获得。

[0034] 所述分离的免疫系统细胞可以是抗原呈递细胞。示例性的抗原呈递细胞包括但不限于树突细胞、巨噬细胞、B细胞、活化上皮细胞等。

[0035] 在一个实例中,所述抗原呈递细胞是树突细胞。DC作为最有效抗原呈递细胞的鉴定和重组已经是癌症免疫治疗中的显著进展之一。外源抗原可通过DC胞吞被捕获,释放到其细胞质隔室中并路由至MHC-I抗原呈递途径。DC疫苗接种基于该抗原交叉呈递过程,并且可诱导CD8+肿瘤抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL),代表癌症的潜在有效治疗方案。DC还通过直接或间接地经来源于效应细胞的细胞因子促进免疫效应细胞(例如,常规 α T细胞、 γ δ T细胞、NK细胞和非变体NKT细胞)和DC之间的串扰而在桥连先天免疫和获得性免疫中其关键作用。

[0036] 先前的癌症免疫治疗涉及靶向表达分化的肿瘤抗原的细胞。最近来自动物研究、培养人肿瘤细胞和临床血样的发现支持以下观念:基于DC的CSC疫苗接种通过选择性靶向CSC而赋予优越的保护性抗肿瘤免疫。基于DC的CSC疫苗可引发针对干细胞抗原的体液和细胞免疫应答并且与诱导高效的保护性抗CSC免疫相关。例如,与靶向主体肿瘤细胞相比,DC介导的胶质瘤CSC神经球靶向在小鼠中产生更大的抗肿瘤免疫。这些研究表明,尽管可能CSC和正常成体干细胞之间共有的途径产生免疫耐受,但是免疫系统仍然可识别这两种类型干细胞之间的差异且对此作出反应,并且随后消除CSC。由于CSC公认地对涉及化学和放射的传统治疗失效,因此作为靶向TSA和/或TAA并且较不依赖于癌细胞的代谢或增殖状况的治疗平台的免疫干预变得特别地有吸引力。CSC对常规治疗的抗性表明,这些癌症引发细胞除了包含干细胞抗原之外还可包含多个编码肿瘤特异性新抗原的突变。因此,使用CSC作为DC疫苗制剂的肿瘤抗原源提供刺激针对未鉴定到的新抗原和与CSC相关的肿瘤发生性抗原的免疫应答从而导致CSC杀死且具有持久益处的方式。

[0037] 对于DC癌症免疫治疗,重要的是,有大量的肿瘤细胞可用于提供用于DC脉冲的肿瘤特异性抗原(TSA)和肿瘤相关抗原(TAA)。从原发性肿瘤分离的CSC在体外可容易地分化成代表肿瘤中大部分细胞的非CSC。这是减慢发现靶向CSC药物的一个主要限制性因素,也是阻止大规模生产CSC用于临床癌症免疫治疗的一个技术障碍。

[0038] 本公开内容的免疫系统细胞是“分离的”。本文中使用的术语分离的意指“人工地”由其天然状态改变而来;即,如果其天然存在,则其已发生改变或从其原始环境移出,或者

二者。分离的免疫系统细胞可通过与至少一种结肠直肠癌CSC或其碎片接触而脉冲。分离的免疫系统细胞可以是例如未成熟的树突细胞。术语“脉冲”指向未成熟的树突细胞装载抗原，或者使未成熟的树突细胞暴露于抗原一段短时间。因此，任选地在如本文中所述的一种或多种成熟诱导剂存在下，“脉冲”未成熟树突细胞可导致未成熟树突细胞成熟为成熟树突细胞。

[0039] 通过“接触”，细胞可与其他细胞或其碎片物理结合。例如，分离的免疫系统细胞可以通过与结肠直肠癌干细胞或其碎片紧密接近或者通过与其物理结合而“接触”结肠直肠癌干细胞或细胞碎片。接触可以是直接接触，或者通过中间剂来进行。可以通过用肿瘤抗原“脉冲”未成熟树突细胞来使其与肿瘤抗原接触，所述肿瘤抗原例如经热激的肿瘤裂解物中存在的那些。

[0040] 因此，在一个实例中，所述结肠直肠癌干细胞可以是经热激的结肠直肠癌干细胞或其碎片。所述碎片可以是经热激的结肠直肠癌干细胞的裂解物。垂死肿瘤细胞提供肿瘤抗原源和能够触发细胞活化的内源性危险信号。因此，可使用热应激来诱导肿瘤细胞死亡，之后使用其裂解物，例如用于DC脉冲。热激通常涉及使细胞经受比细胞体内的正常生理温度更高的温度。热激的过程可以在多种介质，例如在CO₂培养箱、O₂培养箱中或在热水浴中进行。例如，可以在约42℃下将细胞热处理约60分钟。有利地，如下文实施例4所述，结肠直肠癌干细胞的热激过程使得产生更擅长引发CSC抗原特异性CTL的成熟树突细胞。

[0041] 在一个实例中，所述树突细胞可以是未成熟的树突细胞。例如，未成熟树突细胞可如本文中所述由外周血单个核细胞(PBMC)产生。在用至少一种CSC或其碎片脉冲之后，未成熟树突细胞可变为成熟树突细胞，任选地如本文中所述在暴露于一种或多种成熟诱导剂之后。成熟树突细胞可具有上调的CD83、CD40和CD86表达。有利地，本发明的成熟树突细胞能够诱导细胞毒性T淋巴细胞针对癌症干细胞抗原(例如结肠直肠癌干细胞抗原)的特异性免疫应答。

[0042] 所述结肠直肠癌干细胞可以通过在体外使至少一种分化的肿瘤细胞逆转为未分化的干细胞状态而获得的体外(试管衍生的)结肠直肠癌干细胞。术语“体外结肠直肠癌干细胞”、“试管结肠直肠癌干细胞”和“试管衍生的结肠直肠癌干细胞”在本文中可互换使用。

[0043] 术语“逆转”或“重编程”可指将分化的肿瘤细胞转化回未分化或非完全分化的细胞，即癌干细胞。例如，可将分化的结肠直肠癌肿瘤细胞(例如SW480或HCT-9细胞)“逆转”或“重编程”为结肠直肠癌干细胞。

[0044] 术语“分化的结肠直肠癌肿瘤细胞”可指完全分化(即其不具有进一步分化的能力)的初始结肠直肠癌肿瘤细胞(即，直接从对象获得的结肠直肠癌肿瘤细胞)。其还可指完全分化的结肠直肠癌肿瘤细胞系。示例性的分化结肠直肠癌肿瘤细胞包括人肠腺癌HCT-9细胞或人结肠腺癌SW480细胞。分化的结肠直肠癌肿瘤细胞还可包括但不限于人结肠腺癌SW620细胞、人结肠腺癌CACO-2细胞、人结肠腺癌LoVo细胞、人结肠腺癌COLO 205细胞、人结肠癌HT55细胞和人结肠癌HT155细胞。

[0045] 术语“未分化的”当在提及细胞使用时指能够分化成一种或多种特化细胞类型的细胞。因此，“未分化”细胞是未分化的细胞或未完全分化的细胞。“未分化细胞”可以是干细胞、诱导多能干细胞或去分化细胞。例如，“未分化”细胞可以是已经重编程为未分化结肠直肠癌干细胞状态的结肠直肠癌肿瘤细胞。“未分化”细胞可以是多能的、多潜能的、寡能的或单能

的。

[0046] “结肠直肠癌干细胞”可指未分化的、去分化的或未完全(部分)分化的结肠直肠癌细胞。在一个实例中,“结肠直肠癌干细胞”处于“未分化结肠直肠癌干细胞状态”。因此,“结肠直肠癌干细胞”可具有分化成多种分化结肠直肠癌细胞的潜力。其还可具有继续增殖并产生更多“结肠直肠癌干细胞”的能力。

[0047] 在一个实例中,所述结肠直肠癌干细胞是表达能够在体外将分化结肠直肠癌细胞逆转或重编程为未分化结肠直肠癌干细胞状态的转录因子的未分化结肠直肠癌干细胞。

[0048] 在一个实例中,所述未分化结肠直肠癌干细胞通过用能够将分化结肠直肠癌细胞逆转或重编程为未分化结肠直肠癌干细胞的转录因子重编程分化结肠直肠癌细胞而获得。

[0049] 在另一个实例中,所述结肠直肠癌干细胞通过用细胞重编程因子或转录因子逆转或重编程分化结肠直肠癌细胞来获得。所述细胞重编程因子或转录因子可包括但不限于Oct4和Sox2。

[0050] “结肠直肠癌干细胞”可表达多种结肠直肠癌干细胞标志物或“肿瘤相关”抗原,例如Oct4和Sox2。这些标志物中的有一些可能是维持细胞的癌干细胞样特性所必需的。“结肠直肠癌干细胞”可以是结肠直肠癌CSC样细胞。结肠直肠癌CSC样细胞可如下获得:将结肠直肠癌细胞(CRC)OSKM重编程为诱导多能癌(iPC)细胞并在癌症干细胞(CSC)培养条件下培养诱导多能癌(iPC)细胞以产生结肠直肠癌CSC样细胞,如图6所示。

[0051] 本公开内容的结肠直肠癌干细胞可以在体外制备。换言之,所述结肠直肠癌干细胞可在试管中制备,因此术语“体外结肠直肠癌干细胞”、“试管结肠直肠癌干细胞”和“试管衍生的结肠直肠癌干细胞”。以此方式制备结肠直肠癌干细胞克服了在使用癌干细胞进行DC癌症免疫治疗中的两个主要技术障碍。这两个障碍是:1) 癌干细胞在原发性肿瘤中罕见,因此难以分离和获得足够的用于DC疫苗接种的细胞;和2) 从原发性肿瘤分离的癌干细胞将在体外迅速地分化成代表肿瘤中大多数细胞的非CSC,因此不能提供用于DC疫苗接种的癌干细胞抗原。因此,本公开内容能够大规模生产用于临床癌症免疫治疗的癌干细胞。

[0052] 本公开内容的特别令人惊讶的优点是试管癌干细胞可提供足够量和广谱的肿瘤抗原,其可分为三类:1) 多能性相关抗原,包括Oct4和Sox2:编码多能性相关抗原的基因被位点特异性地引入癌细胞基因组中稳定且高水平地表达,这在从原发性肿瘤分离的癌干细胞中很少见到;2) 癌干细胞相关基因:试管癌干细胞表达许多癌干细胞相关的肿瘤发生性抗原,其由于多能性基因介导的细胞重编程而产生;和3) 试管癌干细胞由分化的肿瘤细胞衍生,因此其还携带原始体细胞突变、内部缺失、亲代癌细胞中的染色体易位和与亲代癌细胞相关的许多未鉴定的新抗原。

[0053] 使用可作为稳定癌细胞系培养的试管癌干细胞为疫苗制备和应用提供许多技术优势。以此方式,可提供针对未被免疫系统识别为自体抗原的抗原的免疫保护。首先,使用已建立的细胞系有助于规避耗时且成本高的患者个体化GMP生产,并且消除连续生产定制的单次疫苗的需求。其次,使用已建立的细胞系简化物流、降低疫苗生产和递送过程的劳力并且提高其成本效用。第三,使用已建立的细胞系允许高度标准化地大规模生产适合于具有特定肿瘤类型的所有患者的同种异体疫苗,所谓的“现成”产品。最后,与HLA单倍型无关,使用单一批次的同种异体疫苗消除疫苗在质量和组成方面的变化,有利于临床结果的可靠比较分析。

[0054] 在第二方面,提供了用于刺激对象的免疫系统的组合物,其包含通过与从结肠直肠癌干细胞获得的一种或多种抗原接触而被脉冲的至少一种抗原呈递细胞,其中所述结肠直肠癌干细胞通过使至少一种分化结肠直肠肿瘤细胞逆转以具有未分化结肠直肠干细胞状态获得,其中所述逆转是通过用包括但不限于Oct4和Sox2的细胞重编程因子或转录因子重编程从对象获得的分化结肠直肠肿瘤细胞获得。

[0055] 术语“刺激”免疫系统指激活免疫系统的多种组分,例如,如激活细胞毒性T细胞淋巴细胞,以针对特定的威胁作出反应。例如,可刺激免疫系统以靶向和除去癌细胞。一种或多种抗原或疫苗可刺激免疫系统以针对这样的威胁作出反应。

[0056] 抗原呈递细胞和结肠直肠肿瘤细胞都可从相同或不同的对象获得。换言之,抗原呈递细胞和结肠直肠肿瘤细胞二者均可以是自体同源细胞,或者其可以是同种异体细胞。在一个实例中,抗原呈递细胞和结肠直肠肿瘤细胞二者均从同一对象获得。因此,抗原呈递细胞和结肠直肠肿瘤细胞二者均是自体同源细胞。在另一个实例中,抗原呈递细胞和结肠直肠肿瘤细胞从不同的对象获得。因此,抗原呈递细胞和结肠直肠肿瘤细胞是同种异体细胞。这些同种异体细胞在遗传上是不相似的并且因此可能是免疫不相容的,即使两个对象是同一物种。

[0057] 可使用本领域已知的多种方法例如通过使用载体来将细胞重编程因子或转录因子递送到结肠直肠肿瘤细胞中。所述载体可包括核酸,包括表达控制元件,例如转录/翻译控制信号、复制起点、多聚腺苷酸化信号、内部核糖体进入位点、启动子、增强子等,其中所述控制元件与编码基因产物例如Oct4和Sox2的核酸可操纵地相连。这些及其他共有载体元件的选择是常规的,并且很多这样的序列可从市售载体获得。所述载体可以是质粒载体、病毒载体或任何其他适于插入外来序列并导入真核细胞(例如结肠直肠癌细胞)中的合适载体。优选地,所述载体是能够指导细胞重编程因子或转录因子的DNA序列转录的表达载体。病毒表达载体包括例如基于杆状病毒、前列腺病毒、牛乳头瘤病毒、腺病毒和腺相关病毒的载体。在一个实例中,通过使用杆状病毒载体促进递送。

[0058] 在一个实例中,使用包含以下的杆状病毒载体来将细胞重编程因子或转录因子递送到结肠直肠肿瘤细胞中:锌指核酸酶编码序列和包含细胞重编程因子或转录因子的融合基因。本领域技术人员还将理解,可使用其他载体,例如细菌载体(即质粒)或其他病毒载体(例如上述腺病毒载体)来将细胞重编程因子或转录因子递送到细胞中。

[0059] 已经重编程的结肠直肠干细胞的未分化状态可基于癌细胞特有的多种特征来鉴定。例如,未分化的结肠直肠干细胞可以以上皮特征丧失且E-钙粘蛋白表达降低为特征。可替代地或另外地,未分化的结肠直肠干细胞状态还可以以获得间充质特性且例如波形蛋白(VIM)、纤连蛋白(FN1)、玻连蛋白(VTN)、N-钙粘蛋白(CDH2)、snail(SNAI1)、twist(TWIST1)、锌指E盒结合同源框1(ZEB1)、转化生长因子 β 1(TGFB1)、slug(SNAI2)和SOX4差异表达为特征。仍然可替代地或另外地,未分化的结肠直肠干细胞状态可以以表达包括但不限于以下的癌细胞标志物为特征:CD24、CS133、CD144、CD166、醛脱氢酶1(ALDH1A1)、含有富亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5(LGR5)、二肽基肽酶4(DPP4)、连环蛋白 β -1(CTNNB1)、ATP结合盒亚家族G成员5(ABCG5)和整联蛋白 β -1(ITGB1)。

[0060] 在一个实例中,提供了如本文中限定的组合物,其中所述未分化的结肠直肠干细胞状态以下列至少一项为特征:(a) 上皮特征丧失且E-钙粘蛋白表达降低;(b) 获得间充质特性且波形蛋白(VIM)、纤连蛋白(FN1)、玻连蛋白(VTN)、N-钙粘蛋白(CDH2)、snail

(SNAI1)、twist (TWIST1)、锌指E盒结合同源框1 (ZEB1)、转化生长因子 β 1 (TGFB1)、slug (SNAI2) 和SOX4差异表达;以及(c)表达选自以下的癌干细胞标志物:CD24、CS133、CD144、CD166、醛脱氢酶1 (ALDH1A1)、含有富亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5 (LGR5)、二肽基肽酶4 (DPP4)、连环蛋白 β -1 (CTNNB1)、ATP结合盒亚家族G成员5 (ABCG5) 和整联蛋白 β -1 (ITGB1)。

[0061] 在第三方面,提供了用于脉冲树突细胞使得树突细胞能够诱导细胞毒性T淋巴细胞针对体外结肠直肠癌干细胞的特异性免疫应答的组合物,所述组合物包含已从经重编程的体外结肠直肠癌细胞富集的至少一种体外结肠直肠癌干细胞样细胞或其碎片。

[0062] 术语“富集”或其语法上的变化形式指在混合物中提高一个实体相对于其他实体的量的过程。例如,在细胞混合物中,可“富集”特定的细胞类型(例如体外结肠直肠癌干细胞样细胞)使得其在混合物中以比其他细胞类型(例如不具有干细胞样特性的结肠直肠癌细胞)更高的量(即更高的数量)存在。体外结肠直肠癌干细胞样细胞或其碎片可以是如上所述的。

[0063] 在第四方面,提供了产生经刺激的免疫系统细胞的方法,其包括使结肠直肠癌干细胞或其碎片与至少一种免疫系统细胞接触,其中所述结肠直肠癌干细胞通过使至少一种分化的结肠直肠癌细胞逆转至其未分化的干细胞状态获得。

[0064] 所述结肠直肠癌干细胞可以是表达能够将分化结肠直肠癌细胞逆转或重编程为未分化癌干细胞状态的转录因子的未分化癌干细胞。所述未分化结肠直肠癌干细胞可通过用能够将分化结肠直肠癌细胞逆转成未分化结肠直肠癌干细胞的重编程因子或转录因子重编程分化结肠直肠癌细胞获得。

[0065] 分化结肠直肠癌细胞向其未分化干细胞状态的逆转可通过如上所述的用选自Oct4和Sox2的细胞重编程因子或转录因子重编程结肠直肠癌细胞来实现。结肠直肠癌细胞和免疫细胞可如上所述是自体同源细胞或同种异体细胞。所述免疫系统细胞可以是抗原呈递细胞,例如树突细胞。在一个实例中,所述树突细胞是未成熟的树突细胞。在一个实例中,所述未成熟树突细胞在暴露于经重编程的结肠直肠癌细胞之后并且任选地在暴露于如上所述的成熟诱导剂之后可变成CD83、CD40和CD86表达上调的成熟树突细胞。

[0066] 在所公开方法中使用的结肠直肠癌干细胞可以是如上所述的体外(或试管衍生的)结肠直肠癌干细胞。所述癌干细胞可以进一步是经热激的癌干细胞或其碎片。所述碎片可以是经热激癌干细胞的裂解物。可施加的热激条件如上文和实施例中所述。

[0067] 本文中限定的方法可以是体内、离体或体外方法。

[0068] 可使用如上文和实施例中所述的载体将细胞重编程因子或转录因子递送到肿瘤细胞中。所述载体可以是包含锌指核酸酶编码序列和含有细胞重编程因子的融合基因的杆状病毒载体。

[0069] 如上所述,所述方法中使用的结肠直肠癌干细胞的未分化干细胞状态可通过多种特征来鉴定,所述特征例如下列至少一项:

[0070] (a) 上皮特征丧失且E-钙粘蛋白表达降低;(b) 获得间充质特性且波形蛋白(VIM)、纤连蛋白(FN1)、玻连蛋白(VTN)、N-钙粘蛋白(CDH2)、snail (SNAI1)、twist (TWIST1)、锌指E盒结合同源框1 (ZEB1)、转化生长因子 β 1 (TGFB1)、slug (SNAI2) 和SOX4差异表达;以及(c)表达选自以下的癌干细胞标志物:CD24、CS133、CD144、CD166、醛脱氢酶1 (ALDH1A1)、含有富亮

氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5 (LGR5)、二肽基肽酶4 (DPP4)、连环蛋白 β -1 (CTNNB1)、ATP结合盒亚家族G成员5 (ABCG5) 和整联蛋白 β -1 (ITGB1)。

[0071] 在第五方面,提供了一种疫苗,其包含用本文中限定的方法刺激的至少一种免疫细胞。所述免疫细胞可以是抗原呈递细胞。所述抗原呈递细胞可以是树突细胞。在一个实例中,所述免疫细胞和肿瘤细胞是从接受疫苗的对象获得的自体同源细胞。在另一个实例中,免疫细胞和肿瘤细胞是从接受疫苗的不同对象获得的同种异体细胞。

[0072] 所述疫苗可包含可药用载体。所述疫苗还可包含佐剂,所述佐剂增加对象对疫苗的免疫应答。合适的佐剂包括但不限于氢氧化铝(明矾)、免疫刺激复合物(immunostimulating complex, ISCOMS)、非离子嵌段聚合物或共聚物、细胞因子(如IL-1、IL-2、IL-7、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 等)、皂苷、单磷酸脂质A(monophosphoryl lipid A, MLA)、胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)等。其他合适的佐剂包括例如硫酸铝钾、从大肠杆菌(*Escherichia coli*)分离的热不稳定性或热稳定性肠毒素、霍乱毒素或其B亚基、白喉毒素、破伤风毒素、百日咳毒素、弗氏不完全佐剂或完全佐剂。基于毒素的佐剂,例如白喉毒素、破伤风毒素和百日咳毒素可以在使用前例如通过用甲醛处理灭活。

[0073] 在第六方面,提供了从如本文中限定的方法获得的经刺激免疫细胞。所述经刺激的免疫细胞可以是抗原呈递细胞,例如树突细胞。

[0074] 如上所述的组合物、疫苗或经刺激免疫细胞可用于治疗,例如用于治疗癌症,例如结肠直肠癌。

[0075] 在第七方面,提供了在对象中治疗结肠直肠癌的方法,其包括用如本文中限定的组合物或如本文中限定的疫苗或通过如本文中限定的方法刺激的免疫细胞免疫对象。

[0076] 在第八方面,提供了如本文中限定的组合物或如本文中限定的疫苗或通过如本文中限定的方法刺激的免疫细胞在制备用于在对象中治疗结肠直肠癌的药物中的用途。

[0077] 术语“对象”指人或其他哺乳动物,并且包括期望使用本发明的方法、组合物、疫苗和/或经刺激免疫细胞来检查或治疗的任何个体。然而,应当理解,“对象”并非暗示存在症状。在本发明范围内的合适对象包括但不限于灵长类动物、家畜动物(例如绵羊、牛、马、驴、猪)、实验室试验动物(例如兔、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠)、伴侣动物(例如猫、狗)和捕获的野生动物(例如狐狸、鹿)。所述术语不指示特定的年龄。因此,期望涵盖成年和新生个体。所述对象优选地是人,但还可以是家畜、实验室对象或宠物动物。在一个实例中,所述对象是癌症患者,例如结肠直肠癌患者。所述患者可以是处于癌症的任何阶段例如I期、II期、III期或IV期的患者。所述患者可以是遭受癌症复发或再发的患者。

[0078] 本文中使用的术语“治疗”或其变化形式包括无论如何补救疾病状态或症状、预防疾病建立或以其他方式预防、阻止、延迟或逆转疾病或其他不期望症状以任何方式进展的任何和所有用途。因此,“治疗”包括预防性治疗和治疗性治疗。

[0079] 在第九方面,提供了产生用于对象的包含自体同源树突细胞的抗结肠直肠癌疫苗的方法,其包括以下步骤:(a)提取并纯化从来自对象的样品获得的外周血单个核细胞(单核细胞);(b)在有效诱导单核细胞向树突细胞分化的条件下培养单核细胞;(c)使(b)中的经培养未成熟树突细胞与癌干细胞或其碎片接触,所述癌干细胞或其碎片通过将至少一种分化结肠直肠癌细胞逆转至其未分化结肠直肠干细胞状态获得;和(d)用树突细胞成熟诱导剂培养(c)中装载有结肠直肠癌干细胞的树突细胞;以及(e)收获装载有结肠直肠癌干细

胞的成熟树突细胞作为抗癌疫苗。

[0080] “外周血单个核细胞”可以是具有圆形核的任何血细胞。例如，外周血单个核细胞可以是淋巴细胞、单核细胞或巨噬细胞。外周血单个核细胞可通过本领域已知的技术例如通过Ficoll-Paque™技术和/或通过细胞分选技术例如磁激活细胞分选(magnetic-activated cell sorting, MACS)从取自对象的血样中提取并纯化。由这些技术获得的单核细胞可在“有效诱导单核细胞向树突细胞分化的条件”下培养。例如，可如下所述用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)和白介素-4(interleukin-4, IL4)培养HLA-A2+人外周血单个核细胞以获得未成熟树突细胞。因此，在一个实例中，第九方面的方法中(b)的条件包括在包含GM-CSF和IL-4的培养基中培养单核细胞。

[0081] 如本文中限定的“树突细胞成熟诱导剂”指能够诱导或引起树突细胞从未成熟状态成熟的制剂。树突细胞成熟诱导剂的实例包括但不限于如下所述的脂多糖(LPS)和干扰素- γ 。

[0082] 在一个实例中，提供了包含通过与如上所述的至少一种结肠直肠癌干细胞或其碎片接触而致敏的至少一种分离的免疫系统细胞的组合物，其中如上所述的结肠直肠癌干细胞如上所述通过使至少一种分化结肠直肠癌细胞逆转以具有未分化结肠直肠癌干细胞状态获得。在该实例中，分离的免疫系统细胞可以是例如T细胞，并且所述接触可以是间接接触，例如经由已经用上述结肠直肠癌干细胞或其碎片脉冲的树突细胞接触。

[0083] 本文中举例说明性地描述的本发明可适当地在不存在任何要素、限制下实施，虽然在本文中未具体公开。因此，例如，术语“包括”、“包括”及其变化形式等将被广泛地且无限制地理解。另外，本文中采用的术语和表达用作描述性而不是限制性术语，并且在使用这些术语和表达时并不意在排除所示和所描述的特征或其部分的任何等同物，而是认识到在所要求保护的本发明的范围内多种修改是可能的。因此，应当理解，虽然本发明已经通过优选实施方案和可选特征具体公开，但是本领域技术人员仍可采用本文中体现的本发明的变化方案和改变方案，并且认为这样的变化方案和改变方案在本发明的范围内。

[0084] 本文中已广泛且一般性地描述了本发明。落入一般性公开内容中的每个较窄种类和亚属群组也形成本发明的一部分。这包括具有从属中移除任何主题的附带条件或否定限制的本发明的一般性描述，而不管所排除的材料是否在本文中具体描述。

[0085] 其他实施方案在所附权利要求书和非限制性实例内。此外，当用马库什组描述在发明的特征或方面时，本领域技术人员将认识到，因此还根据马库什组的任何单独成员或亚组成员描述本发明。

[0086] 除非上下文明确地另外指出，否则本申请中使用的没有数量词修饰的名词包括复数参考。例如，术语“制剂”包括多种试剂，包括其混合物。

[0087] 在本公开内容通篇，本发明的各个方面可以以范围形式示出。应当理解，范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁，并且不应被解释为对本发明范围的不灵活限制。因此，范围的描述应认为已经具体公开了所有可能的子范围以及在该范围内的单独数值。例如，例如1至6的范围描述应认为已经具体公开了例如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3到6等的子范围，以及在该范围内的单独数值，例如1、2、3、4、5和6。不管范围的宽度，这均适用。

[0088] 本文中使用的关于数值平均值使用的术语“约”指例如数值的+50%或+30%，优选

+20%，更优选+10%，仍更优选+5%，并且最优选+1%。在必要时，词语“约”可以从本发明的定义中省略。

实施例

[0089] 实施例1材料和方法

[0090] 使用锌指核酸酶技术来将称为OSKM因子(Oct4、Sox2、Klf4和cMyc)的一组细胞重编程因子插入CRC细胞基因组中用于这些癌细胞的诱导重编程。使用肿瘤球形成方法，从经重编程的CRC细胞富集CSC样细胞。这些CSC样细胞一致地显示出CD24和许多其他结肠直肠CSC相关抗原的上调表达。然后，将这些CSC样细胞用于树突细胞(DC)疫苗接种，其已经被测试作为CRC的辅助治疗。在用经OSKM表达CRC的细胞裂解物脉冲的DC致敏自体同源初始T细胞之后，通过用装载有CSC抗原相关肽的T2细胞再刺激来在IFN- γ EliSpot测定中检测T细胞。显著增加的IFN- γ 阳性斑点证明，经脉冲的DC能够在自体同源T细胞中引发抗CSC抗原应答。因此，OSKM表达CRC细胞系可用作提供DC疫苗接种的CSC相关抗原的容易获得的来源，这是可提高患有CRC的患者的治疗效果的方法。

[0091] 质粒和重组BV载体

[0092] 使用允许目的基因通过转座转移到杆状病毒穿梭载体(杆粒)中的供体质粒pFastBac1(Invitrogen, Carlsbad, CA)作为构建用于产生杆状病毒的重组质粒的质粒骨架。如前所述，将锌指核酸酶(ZFN)编码序列亚克隆到pFastBac1供体质粒中(Phang等, 2013; Tay等, 2013)。为了构建pFB-ZFN，使用GeneArt®基因合成服务(Life Technologies, Carlsbad, CA)基于先前报道的氨基酸序列(Hockemeyer等, 2009)来合成编码右侧和左侧ZFN的两个DNA片段，其各自为993bp。工程化的ZFN包含属于与FokI内切核酸酶的专性异二聚体形式融合的AAVS1基因座的右和左同源臂(Miller等, 2007)。将合成的构建体克隆到pMA(ampR)(Life Technologies)中。然后，通过PCR扩增两个片段，并分别使用NotI/XbaI(对于右侧ZFN)和KpnI/HindIII(对于左侧ZFN)将其亚克隆到pFastBac1中。然后，从pFB-EF1 α -EGFP-hyg-lox(Ramachandra等, 2011)扩增1.1kb人延伸因子1 α (EF1 α)启动子，并使用BamHI/NotI克隆到上述构建体中以驱动ZFN表达。最后，从pIRES(Clontech, Mountain View CA)扩增0.6kb内部核糖体进入位点(IRES)，并使用XbaI/KpnI插入在右侧和左侧ZFN ORF之间。AAVS1开始于PPP1R12C基因的外显子1的5'端上游424bp，并且结束于在3'端下游3.35kb。使用pFBZFN来靶向PPP1R12C基因的内含子1内的区域。

[0093] 携带AAVS1同源臂的供体载体pFB-OSKM和pFB-eGFP-OSKM的构建先前已有报道(Phang等, 2013; Zhu等, 2013)。OSKM表达盒含有EF1 α 启动子；由与自切割2A序列和IRES连接的人Oct4、Klf4、Sox2和C-myc基因组成的融合基因(OSKM)；以及土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)。为了构建具有重编程因子的供体质粒pFB-OSKM，从pZDonor-AAVS1(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)扩增属于AAVS1基因座的810bp左同源臂和837bp右同源臂，并使用SnaBbi/SalI(对于左同源臂)和Notq/BstBq(对于右同源臂)插入其是先前构建的pFastBac1载体pFB-PGK-Neo-EGFP-LoxP(Ramachandra等, 2011)中，其包含异种特异性或野生型loxP位点。在去除eGFP编码序列后，使用EcoRI和SbfI将携带EcoRI-AscI-SbfI限制性位点的63bp衔接子序列引入pFB-AAVS1。然后，通过AscI和SbfI限制性位点插入SV40聚(A)信号。

[0094] 最后,从pHAGE-EF1a-STEMCCA (Millipore, Bedford, MA) 扩增含有EF1a启动子、4个iPSC转录因子基因(与自切割2A序列和IRES连接作为融合基因人Oct4、Klf4、Sox2和C-myc基因)和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件的多顺反子盒并使用EcoRI/AscI插入到经修饰的pFB-AAVS1质粒中以构建pFB-OSKM。为了构建pFB-eGFP-OSKM,通过单EcoRI限制性酶将完整的eGFP编码序列引入pFB-OSKM并重新连接。添加小牛肠碱性磷酸酶(CIAP)以防止消化的骨架载体自连接。用于载体构建的引物列于下面的补充表1中。

[0095] 分别使用pFBZFN、pFB-OSKM和pFB-eGFP-OSKM产生重组BV,包括BV-ZFN、BV-OSKM和BV-eGFP-OSKM,并且根据Invitrogen的Bac-to-Bac杆状病毒表达系统的方案在Sf9昆虫细胞中增殖。本研究中的重组DNA研究遵循国家卫生研究院(National Institutes of Health)的指南。

[0096] 人诱导多能癌细胞的产生和结肠直肠CSC的衍生

[0097] 人肠腺癌HCT-8细胞和人结肠腺癌SW480细胞最初由新加坡国立大学(National University of Singapore)的Lin Qinsong博士提供,并且在具有10%胎牛血清(FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA)的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM)(高葡萄糖)中进行培养。使用有限稀释法进行单细胞克隆。使用随机选择的HCT-8和SW480亚克隆进行遗传修饰以将OSKM基因引入AAVS1基因座中。具体地,在杆状病毒转导的前一天,将 1×10^4 个癌细胞接种在6孔板的一个孔中完全生长培养基中。用BV-ZFN和BV-eGFP-OSKM(或BV-OSKM)载体以每个细胞100空斑形成单位(pfu)的感染复数(MOI)共转染细胞,各自持续6小时。第二天,在上述相同条件下再次转导细胞。在转导后第3天开始400 μ g/ml下的G418选择,并且每天更换培养基持续7天。在第10天,将转导的癌细胞解离并且将 1×10^3 个细胞重新铺板在接种有丝裂霉素C失活小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)的新鲜的孔板中一个孔中的人iPSC培养基中,所述培养基由80%DMEM/F12、20%KnockOut血清替代品(Invitrogen)、2mM L-谷氨酰胺、0.1mM β -巯基乙醇(Sigma-Aldrich)、0.1mM非必需氨基酸(Invitrogen)、10ng/ml bFGF(PeproTech, Rocky Hill, NJ)和青霉素/链霉素组成。每天更换培养基。在第20天至25天,机械地分离具有有限边界的紧凑的iPS细胞样集落,并在人iPS细胞培养基中的MEF上扩增成iPC细胞克隆。每7天人工地传代这些HCT-8和SW480衍生的iPC细胞集落。通过用移液管刮取分化细胞或通过机械地传代未分化细胞的单个菌落来使细胞维持在未分化状态。

[0098] 在将HCT-8和SW480衍生的iPC细胞分化成结肠直肠CSC之前,在无饲养条件下在Matrigel包被的板(BDscience, Franklin Lakes, NJ)上用mTesR培养基(STEMCELL Technology, BC, Canada)在标准细胞培养条件(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)在加湿培养箱中扩增iPC细胞集落。使用Accumax (Millipore, Bedford, MA)将扩增的细胞解离为单细胞,并以每孔 1×10^4 的密度接种在0.1%明胶包被的六孔细胞培养板(Nalge Nunc International, Rochester, NY)上。将细胞在由补充有以下的DMEM/F12(1:1混合物)培养基构成的CSC培养基中进行培养:1%FBS、2%B27(Invitrogen)、2mM L-谷氨酰胺、50单位/ml青霉素、50 μ g/ml链霉素和20ng/ml人表皮生长因子(EGF)(Sigma-Aldrich)。传代1个月之后,获得均质细胞群用于CSC表征。对于传代,将细胞用 $1 \times$ Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(Invitrogen)洗涤,用0.25% (w/v)胰蛋白酶-0.53mM EDTA处理,并在未经包被的T25培养瓶上以1:10的分传比(split ratio)进行传代培养。可将这些细胞冷冻保存在含有10%DMSO的CSC完全生长培养基中,并且其在从液氮储存中解冻后保持存活。

[0099] 基因组DNA提取和基因分型

[0100] 使用DNeasy血液和组织试剂盒 (Qiagen, Hilden, Germany) 分离细胞的基因组DNA。使用PCR基因分型来验证OSKM表达盒在由ZFN介导的同源重组驱动的AAVS1位点的位点特异性整合。优化的反应缓冲液由以下组成: 21.5 μ L Platinum® Taq DNA聚合酶高保真度主混合物 (Invitrogen)、0.5 μ L的10 μ M每种正向和反向引物、1.5 μ L DMSO和1 μ L 200 ng/ μ L DNA模板。基因组DNA的PCR扩增使用以下参数进行: 初始变性步骤: 94 $^{\circ}$ C下5分钟; 随后是35个循环: 94 $^{\circ}$ C下25秒, 65 $^{\circ}$ C下45秒和72 $^{\circ}$ C下150秒; 最后是延伸步骤: 72 $^{\circ}$ C下10分钟。在1%琼脂糖凝胶上分析扩增产物。用于PCR扩增的引物列于下面的补充表1中。

[0101] 对于Southern印迹分析, 用EcoRI消化基因组DNA (10 μ g) 过夜。将消化的DNA上样到1%琼脂糖凝胶上, 并在25V下电泳10小时。然后, 使用iBlot®干印迹系统 (Invitrogen) 将DNA转移至包含带正电荷的尼龙膜的iBlot® DNA转移堆 (Invitrogen)。在转移后立即将膜在1.5M NaCl/0.5M NaOH变性溶液中温育10分钟并风干。在130 mJ/cm²下进行UV交联之后, 将膜与DIG Easy Hyb (Roche, Indianapolis, IN) 杂交过夜。使用PCR DIG探针合成试剂盒 (Roche) 合成靶向OSKM表达盒的WP区DIG标记的探针。在杂交之后, 将膜严格洗涤, 封闭, 然后与即用型 (Roche) CDP-Star检测的抗地高辛-AP缀合物 (DIG DNA标记和检测试剂盒, Roche) 孵育。首先, 将膜在40 $^{\circ}$ C下用2xSSC/0.1% SDS洗涤两次, 然后在65 $^{\circ}$ C下用0.1xSSC/0.1% SDS洗涤两次。使用DIG洗涤和封闭缓冲液套装 (Roche) 进行封闭和洗涤。使携带DNA的膜暴露于化学发光成像分析仪 (Chemiluminescent Image Analyzer; ImageQuant LAS 4000 mini, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA) 15分钟。用于合成DIG-标记的探针的引物列于下面的补充表1中。

[0102] PCR定量实时PCR

[0103] 提取总RNA, 并使用SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) 逆转录。对于RT-PCR分析, 使用以下参数进行PCR扩增: 初始变性步骤: 94 $^{\circ}$ C下5分钟; 之后是25至30个循环: 94 $^{\circ}$ C下15秒, 60 $^{\circ}$ C下45秒和72 $^{\circ}$ C下30秒; 最后是延伸步骤: 72 $^{\circ}$ C下5分钟。在2.5%琼脂糖凝胶上分析扩增产物。用于内源、外源和总OSKM (人Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc基因) 分析的PCR引物组列于下面的补充表1中。

[0104] 对于定量实时PCR (qPCR) 分析, 使用RT实时SYBR Green PCR主混合物来扩增合成的cDNA。使用管家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 来进行内部归一化。使用2x QuantiTect SYBR Green PCR主混合物在两步RT-PCR中扩增cDNA。目的基因的表达水平的归一化通过将其相对表达水平除以GAPDH的相对表达水平来进行。每个基因的相对基因表达水平通过一式三份实验获得。使用 $\Delta\Delta C_t$ 方法来评价基因表达的相对量化。通过计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 来确定相对基因表达的倍数变化。进行qPCR分析以量化结肠直肠癌CSC标志物、上皮间充质转化 (EMT) 标志物、常用结肠直肠癌诊断和预后标志物物和在全基因组关联研究中鉴定的最显著结肠直肠癌相关基因座 (GWAS) 的表达。

[0105] 荧光染色、Western印迹分析和流式细胞术分析

[0106] 将iPC细胞集落接种在Matrigel包被的24孔室载玻片上, 并在室温下在4%多聚甲醛中固定30分钟。为了诱导细胞的通透性, 添加0.1% triton并孵育10分钟。在用PBS洗涤之后, 将细胞在封闭溶液 (5% BSA) 中孵育1小时。使用的一抗是针对NANOG (1:100, R&D systems, Minneapolis, MN)、TRA1-60 (1:100, Millipore) 和SSEA-4 (1:200, Santa Cruz) 的

那些。使用山羊抗兔IgG-FITC或小鼠抗兔IgG-罗丹明 (Santa Cruz Biotechnology) 作为二抗。在抗体孵育之后,通过DAPI (1:1000, Chemicon) 染色样品以用于细胞核染色。然后,通过荧光显微镜拍摄图像。

[0107] 对于Western印迹分析,用包含蛋白酶抑制剂混合物 (Nacalai Tesque) 的RIPA缓冲液裂解细胞。使用Xmark微板分光计 (BioRad) 用蛋白质测定染料试剂 (BioRad) 来测量裂解物的蛋白质浓度。上样蛋白裂解物用于进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 并转移至硝酸纤维素膜 (BioRad)。将膜在室温下封闭1小时,然后在4℃下用小鼠抗-CD24 (Beckman Coulter)、兔抗Sox2 (Abcam) 和兔抗-Oct4 (Abcam) 抗体孵育过夜,之后用HRP缀合的二抗孵育。使用Pierce ECL Western印迹底物 (Thermo Scientific) 使免疫反应条带可视化。使用 β -肌动蛋白抗体来确定相等上样。

[0108] 对于流式细胞术分析,使用以下单克隆抗体来鉴定和计数CSC:藻红蛋白 (PE) -或别藻蓝蛋白 (APC) 标记的抗-CD133 (克隆AC133/1; Miltenyi Biotec)、APC标记的抗-CD24 (克隆32D12; Miltenyi Biotec)、APC标记的抗-CD44 (克隆DB105; Miltenyi Biotec) 和PE标记的抗-CD166 (克隆3A6; BD Pharmingen)。添加10 μ L每种抗体缀合物多至每100 μ LMACS缓冲液 (PBS, pH7.2, 0.5% BSA, and 2mM EDTA) 10⁷个有核细胞以用于标记细胞并随后通过流式细胞术进行分析。为了校正与荧光团FITC和PE的光谱重叠, eGFP阳性细胞的流式细胞术分析需要颜色补偿。

[0109] 肿瘤球形成测定、集落形成测定、软琼脂集落形成测定、创伤愈合测定和细胞迁移/侵入测定

[0110] 肿瘤球形成测定如前所述但稍作修改来进行 (Lo等, 2012)。将细胞在无血清的非粘附条件下在96孔超低附着板 (Corning, Corning, NY) 中的CSC培养基中进行培养。将200个细胞接种到96孔板的每个孔中,并对每个克隆测试20个孔 (总共4,000个细胞)。在培养1周之后,使用40x放大倍率透镜在相差显微镜下计数肿瘤球的数目。肿瘤球应具有实体的圆形结构,尺寸为50微米至250微米不等。

[0111] 对于集落形成测定,将RPMI-1640培养基加10% FBS中的细胞 (400个细胞/2mL) 分配到6孔培养板中并培养3周。用Gibco® KaryoMAX® Giemsa染色溶液 (Invitrogen) 染色可视化形成的集落数,并在相差显微镜下计数。

[0112] 对于软琼脂集落形成测定,将细胞以每孔1E4的密度一式三份地铺板在具有0.6% 基础琼脂和0.4% 顶层琼脂的6孔板中,并在37℃, 5% CO₂中孵育一个月。将集落用MTT染色2小时,拍照,并用ImageJ量化。

[0113] 对于创伤愈合测定,将细胞以一式三份接种在6孔板中,并在形成汇合单层之后使用200- μ l尖端刮擦。在孵育后0小时和48小时,在相差显微镜下捕获图像,并分析刮擦的闭合。

[0114] 对于细胞迁移和侵入测定,将细胞悬浮在无血清DMEM中,并以5 $\times$ 10⁴/孔的密度接种到8- μ m孔径transwell室 (BD Bioscience) 的顶室中。用Geltrex (Life Technologies) 包被室用于侵入测定,同时使用未经包被的室进行迁移测定。用钙黄绿素-AM (5 μ g/ml) (Life Technologies) 通过在37℃下孵育30分钟预标记细胞,并将其接种到顶室。用15% FBS作为化学引诱物制备底室。在37℃下孵育24小时后,用固定/染色溶液 (0.1% 结晶紫、1% 福尔马

林和20%乙醇)固定将迁移且通过膜侵入并固定至膜下表面的细胞以用于可视化并在显微镜下计数。通过用通过Geltrex侵入的细胞数除以迁移通过未包被的插入膜的细胞数来计算细胞侵入率。

[0115] 畸胎瘤形成测定

[0116] 为了测试iPC细胞的畸胎瘤形成能力,使用Accutase (Millipore)解离 1×10^6 个细胞,并与PBS中的 0.5×10^6 经丝裂霉素处理的HFF混合至总体积为50 μ l。在移植之前,向制备的细胞中添加50 μ l未经稀释的冷Matrigel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)。将细胞注射到5周龄NOD/SCID IL2Rg (裸) (NSG)小鼠的后腿中。在注射后两个月,取出所得畸胎瘤并固定在4%多聚甲醛中,包埋在石蜡中,切成5 μ m切片,并用苏木精和伊红染色。动物的所有处理和护理均根据由新加坡国家实验动物研究委员会 (National Advisory Committee for Laboratory Animal Research, Singapore) 发布的用于科学目的的动物护理和使用指南进行。

[0117] 实施例2

[0118] 通过稳定表达OSKM基因产生结肠直肠癌iPC细胞

[0119] 最近开发了用于OSKM因子基因的位点特异性整合的基于杆状病毒转导的工程化锌指核酸酶 (ZFN) 技术 (Phang等, 2013)。该技术涉及使用两种非整合型杆状病毒载体:一种表达ZFN (BV-ZFN), 另一种作为供体载体编码OSKM转录因子基因 (BV-OSKM)。BV-OSKM携带含有与自切割2A序列和IRES连接作为融合基因并由EF1a启动子驱动的人Oct4、Klf4、Sox2和c-Myc基因的表达盒。所述表达盒在两侧以与AAVS1基因座同源的序列为侧翼。在用BV-ZFN和BV-OSKM共转导之后 (图1A), 可将表达盒有效地引入人染色体19中的AAVS1基因座中, 这是具有侧翼为保护所整合转基因免于基因沉默从而促进经修饰细胞中的稳健和持续转基因表达的绝缘子元件的开放染色质结构的位点。用该技术来测试人CRC HCT-8和SW480细胞的单细胞衍生亚克隆中的癌细胞重编程。

[0120] 在转导后第15天将转导的细胞转移到丝裂霉素C失活小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 的饲养层并将其在人iPS细胞培养基中培养之后, 在第20天左右观察到早期集落的形成。集落呈现出边界尖锐的紧凑细胞形态 (图1B), 并且对AP染色呈阳性。PCR基因分型证明在6个受检样品中5个中OSKM盒的AAVS1位点整合 (图1C), 其通过Southern印迹分析得到进一步证实。产生的集落表达典型的胚胎干细胞标志物, 如通过免疫染色 (图1D)、RT-PCR分析和流式细胞术分析所证明的。为了检测其分化潜力, 将从集落收集的细胞注射到NSG小鼠的后腿中以形成畸胎瘤。通过组织学检查评估形成的畸胎瘤的分化谱, 并证明在畸胎瘤中来自所有三个胚胎胚层的细胞的存在 (图1E)。这些发现证明, CRC细胞可重编程为iPC细胞, 并且一些重编程细胞显示出多能性。

[0121] 实施例3

[0122] OSKM的异位表达赋予人CRC细胞以CSC样特性

[0123] 将HCT8和SW480衍生的iPC细胞在由补充有1%FBS和20ng/ml人表皮生长因子 (EGF) 的DMEM/F12的1:1混合物组成的CSC培养基中扩增。使用RTqPCR方法, 确定所选择的克隆中OSKM基因的相对表达水平 (图2A)。与野生型 (WT) 细胞相比, 在所有受检HCT8和SW480克隆中观察到8倍至400倍的Sox2过表达。在5个受检克隆中的4个中观察到Oct4的上调2倍至100倍。Western印迹分析证实了这些克隆中Oct4和Sox2蛋白的表达上调。c-Myc和Klf4的上

调不是那么明显,可能是因为HCT8和SW480CRC亚克隆中的内源基因的高水平表达。

[0124] 试图阐明OSKM基因的异位表达在CSC的表型特征中的作用。形成肿瘤球的能力是CSC的一个特征。当将HCT3.11和SW1.9克隆解离成单细胞悬浮液并在超低附着板中培养时,与WT HCT8和SW480亚克隆相比,检测到在第14天形成显著更高数量的肿瘤球数(图2B)。通过流式细胞术在数个OSKM表达的HCT8和SW480克隆中分析常用于CRC的四种充分研究的CSC表面标志物的表达:prominin 1 (CD133)、CD44抗原 (CD44)、小细胞肺癌簇4抗原 (CD24) 和活化白细胞细胞粘附分子 (CD166)。在所有受检克隆中一致地观察到CD24上调,甚至在仅显示Sox2上调的克隆 (HCT1.8) 中也如此(图2C)。确定CSC表型的关键实验是通过将系列稀释物注射到免疫缺陷小鼠中来检查受试细胞的体内肿瘤发生性。通过在NOD SCID小鼠中皮下注射10,000个肿瘤细胞来进行体内肿瘤发生性测试,并检测到在HCT3.11接种后10只小鼠中有6只中形成肿瘤,而在接种HCT/WT细胞后在10只小鼠中根本没有肿瘤形成。用HCT3.11和SW1.9克隆进行的体外测定还证明集落形成、细胞侵入和细胞运动性提高。因此,Oct4和Sox2的过表达足以在CRC细胞中诱导CSC特性。

[0125] 为了进一步表征所衍生的OSKM表达细胞,用实时RT-PCR分析对以下三种HCT克隆进行标志物基因表达的深度评估:无OSKM修饰的单细胞克隆 (HCT/WT)、其中Oct4和Sox2二者均上调的HCT3.11,以及仅Sox2上调的HCT1.8。除CD24、CD133、CD44和CD166之外,其他的受试结肠直肠CSC标志物包括醛脱氢酶1 (ALDH1A1)、含富亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5 (LGR5)、二肽基肽酶4 (DPP4)、连环蛋白 β -1 (CTNNB1)、ATP结合盒亚家族G成员5 (ABCG5) 和整联蛋白 β -1 (ITGB1)。值得注意的是,检测到HCT3.11中的ALDH1A1基因表达上调10倍(图3A)。已经发现,在白血病和数种类型的实体瘤中表达高水平ALDH1A1的肿瘤细胞显示出归因于CSC的特性。由于CSC样细胞可通过异常激活上皮-间充质转化 (EMT) 而产生,因此进行定量RT-PCR分析以确定EMT标志物的表达。上皮特征的丧失可通过E-钙粘蛋白表达来检测,而间充质特性的获得可通过以下的表达来确定:波形蛋白 (VIM)、纤连蛋白 (FN1)、玻连蛋白 (VTN)、N-钙粘蛋白 (CDH2)、snail (SNAI1)、twist (TWIST1)、锌指E盒结合同源框1 (ZEB1)、转化生长因子 β 1 (TGFB1)、slug (SNAI2) 和SOX4。发现在HCT1.8中波形蛋白、ZEB1和slug上调,在HCT3.11中纤连蛋白和slug重新调节(图3B)。还进行实时RT-PCR分析以检测通常用于诊断和预后的临床设置的CRC标志物的基因表达水平,所述标志物包括癌胚抗原 (CEA)、CA19-9 (B3GALT5和ST6GALNAC6)、胸苷酸合酶 (TS)、胸苷磷酸化酶 (TP)、二氢嘧啶脱氢酶 (DPD)、GTP酶KRas (KRAS) 和肿瘤抑制子p53 (TP53)。在HCT3.11中DPD显著上调,高达30倍(图3C)。已知肿瘤组织中DPD的过表达与对化学治疗的不敏感性相关。进一步量化与在GWAS中鉴定的最显著CRC相关基因座相关的14个基因的表达。检测到在HCT3.11中多梳复合蛋白 (polycomb complex protein, BMI-1) 基因、mothers against decapentaplegic homolog 7 (SMAD7) 基因和神经内分泌7B2 (SCG5) 基因上调和在HCT1.8中BMI1和formin-1 (FMN1) 基因的上调(图3D)。OSKM表达对多种与CRC相关的病理标志物的影响表明这些转录因子在肿瘤发生和CRC发育中的重要作用。

[0126] 实施例4

[0127] 装载有OSKM表达CRC的裂解物的人树突细胞在体外致敏自体同源T细胞之后引发结肠直肠CSC抗原特异性T细胞应答

[0128] 鉴于OSKM表达CRC细胞中的CSC样特性增加,对用这些细胞脉冲的DC进行评估以确

定其是否可用于致敏对Oct4抗原具有反应性的人T细胞(图4A)。用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白介素-4(IL-4)由HLA-A2+人外周血单个核细胞(PBMC)产生未成熟DC(图4B)。这些DC对DC标志物例如CD11c、CD86和DC-SIGN呈阳性,但显示T细胞共刺激分子CD40的表达水平低并且CD83几乎不表达,CD83是对刺激T细胞重要的分子(图4C)。为了引发免疫应答,DC应从抗原加工细胞成熟为抗原呈递细胞(APC)。在用脂多糖(LPS)和干扰素- γ (INF- γ)成熟之后,PBMC衍生的DC上调CD83和CD40以及CD86的表达:对于CD83和CD40而言,分别从未成熟DC中的0.96%和48.97%上调至成熟DC中的98.76%和99.30%(图4B、图4C)。还使用MACS从PBMC中选择初始T细胞,其使CD8+细胞从28%增加至98%,并显著减少CD45RO+和CD57+记忆T细胞(图4D)。然后,用HCT3.11肿瘤细胞裂解物脉冲的DC致敏这些初始T细胞以产生CTL。免疫后识别个别抗原的特异性T细胞的频率通常非常低。检测个体细胞因子分泌细胞的方法ELISPOT技术在测量T细胞免疫中高度灵敏,可能在1:10,000至1:1,000,000的频率范围内检测抗原特异性T细胞。因此,进行INF- γ ELISPOT测定以分析针对Oct4的抗原特异性T细胞应答。用装载有Oct4和GFP(阳性对照)肽的T2细胞再刺激后T细胞反应性显著提高(图4E)证明,装载有OSKM表达CRC的裂解物的人DC能够在自体同源T细胞中引发抗CSC抗原应答。

[0129] 由于垂死肿瘤细胞提供肿瘤抗原源和能够触发抗原呈递细胞活化的内源危险信号二者,已经使用热应激来诱导肿瘤细胞死亡,之后使用其裂解物用于DC脉冲。热应激强烈地提高热激蛋白(heat shock protein,HSP)的水平,热激蛋白是在低水平组成型表达并在细胞应激条件下显著诱导的独特蛋白的超家族。在免疫系统中,这些蛋白质可诱导DC的成熟并提供用于特异性触发获得性免疫应答的伴侣多肽。为了测试是否受应激的垂死肿瘤细胞能够用作DC脉冲的优越抗原源,将OSKM表达的HCT3.11细胞在42℃热处理60分钟。在37℃下培养2小时进行细胞回收之后,将经热处理的细胞冷冻并解冻6个循环,收集细胞上清液用于DC脉冲。在经热处理的细胞中观察到Hsp70蛋白的上调且不影响Oct4表达(图5A)。在使用从热激细胞收集的上清液脉冲DC之后,检测DC表面标志物表达,并且在肿瘤上清液脉冲的DC和在未脉冲而成熟的DC之间没有观察到差异(图5B)。然后,将这些DC用于T细胞致敏。在与DC共培养连续两周之后,CD8+T细胞扩增9倍,而对于使用未经脉冲DC致敏的T细胞,观察到6倍扩增。在用DC致敏细胞之后,进一步检测T细胞标志物表达。用从热激细胞收集的上清液脉冲的DC致敏的T细胞已变成效应T细胞,并且其中一些检测为记忆T细胞(图5C)。使用INF- γ ELISPOT测定,与用未经热激的HCT3.11的全裂解物致敏的T细胞相比,在用从热激细胞收集的上清液脉冲的DC致敏T细胞之后,检测到针对Oct4、Sox2以及数种其他CSC-和CRC-相关抗原的抗原特异性T细胞应答提高(图5D)。这些研究表明,摄取热激肿瘤细胞的凋亡小体可产生更擅长引发CSC抗原特异性CTL的成熟DC。

[0130] 实施例5

[0131] 很多临床试验已证明基于自体同源树突细胞(DC)的细胞免疫治疗的安全性和功效。鉴于Oct4、Sox2、CD24以及很多其他CSC标志物的上调与多种人癌症类型中的不良预后相关的临床观察,在此已开发了针对CSC的DC疫苗接种的新策略(图6),其中已证明OSKM表达的CRC细胞的细胞裂解物可用作与未分化CSC相关的抗原的可及来源,未分化CSC用于DC脉冲以诱导针对结肠直肠CSC的特异性免疫应答。如图6中所示,首先对结肠直肠癌细胞(CRC)进行“OSKM重编程”(即使用包含Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc基因的OSKM表达盒重编程)

变为诱导多能癌 (iPC) 细胞。如本文所述将 iPC 细胞在癌干细胞 (CSC) 培养条件下培养以获得结肠直肠 CSC 样细胞。然后,对 CSC 样细胞进行热激处理并裂解以产生包含期望肿瘤抗原的裂解物。使用经热激的裂解物脉冲由已使用本文中所述的方法从患者获得的外周血单个核细胞制备的未成熟 DC (PBMC)。然后,将经脉冲的 DC 注射回患者体内以诱导体内 T 细胞致敏和扩增。这产生对结肠直肠 CSC 具有特异性的 CD8+CTLs。

[0132] Oct4 和 Sox2 基因在癌干细胞中的表达

[0133] 干细胞生物学领域的一项显著发展是通过用 OSKM 转录因子重编程分化的体细胞产生诱导多能干 (iPS) 细胞。Oct4 和 Sox2 以及 Nanog 是编码负责维持胚胎干 (ES) 细胞多能性的调控线路中核心元件的三个基因。Klf4 在癌发生和正常发育二者中均起重要作用,尤其是在对 ES 细胞和 iPS 细胞的自我更新和多能性重要的转录调控网络中起重要作用。Myc 是得到充分研究的典型癌基因,并且是很多不同人癌症中最高度扩增的癌基因之一。

[0134] 已注意到通过重编程的 iPS 细胞衍生和致癌性转化之间具有高相似性:二者均可通过一系列遗传修饰和表观遗传修饰来诱导并且利用类似的转录网络。在由分化体细胞变为 iPS 细胞的过程期间,细胞获得无限的增殖特性和自我更新活性,这两个特征对癌细胞最重要。事实上,研究已经表明,iPS 基因在多种类型的肿瘤中均表达并且参与其发育,支持细胞重编程和肿瘤转化利用共同机制的观念。Oct4 的异位表达可剂量依赖性地提高胚胎干细胞的恶性潜能,并且足以在小鼠中诱导肿瘤。Sox2 已被鉴定为肺和食管鳞状细胞癌中扩增的谱系存活癌基因。在低分化实体瘤中可频繁地检测到多能性相关因子的表达提高,表明这些恶性细胞已获得未分化的干细胞特性。在临床上,癌症亚型中 Oct4 和 Sox2 的表达提高与侵袭性疾病进程例如未分化组织学、对治疗的抗性、转移、复发和较短的患者存活率相关。由于所述相关性,已提出这两种蛋白质为癌症患者中远端复发和预后不良的新预示物。

[0135] 最近,已出现将 Oct4 和 Sox2 基因与 CSC 联系起来的直接证据。发现,与具有相同衍生的相对分化的癌细胞相比,这两种蛋白在数种癌症的 CSC 中富集。在肺癌衍生的 CD133 阳性细胞中,需要 Oct-4 表达以维持细胞的癌干细胞样特性。在胶质母细胞瘤中,Sox2 的敲减导致胶质瘤 CSC 的增殖受到抑制并且肿瘤发生性丧失。在骨肉瘤中,已鉴定到这样的肿瘤细胞亚群,其能够激活外源性 Oct4 报道子并且与用 Oct4 阳性细胞和 Oct4 阴性细胞重建异源性肿瘤的对应物相比更具肿瘤发生性。在乳腺癌中,Oct4 在正常乳腺细胞中的异位表达导致在裸鼠中产生具有肿瘤引发和移生能力的细胞并且发生高级的低分化的乳腺癌。在上皮卵巢癌中,从卵巢原发性肿瘤分离的 CSC 具有增强的 Oct4 表达。在 CRC 中,iPS 基因的异位表达促进入 CRC 细胞的球体形成、增殖、集落形成和迁移,并且 CRC 中 iPS 基因表达的标志可用于预测癌症患者的存活。

[0136] 这些发现表明,iPS 基因可能是 CSC 诱导的主要调控基因和维持 CSC 身份的关键因子。作为在 CSC 上过表达或在这些肿瘤发生性细胞中具有高活性但在正常组织中表达受限的蛋白质,Oct4 和 Sox2 产物是免疫干预的潜在靶标。

[0137] 作为肿瘤抗原源 OSKM 表达 CSC 样细胞

[0138] 本研究的主要目的是研究用经 OSKM 表达 CRC 细胞脉冲的人 DC 是否可诱导 Sox2/Oct4 特异性 CTL 和结肠直肠 CSC 抗原特异性 CTL。这些 CRC 细胞具有在细胞表面上以高密度表达的 OSKM 基因产物作为过表达的“肿瘤相关”抗原。多能性相关抗原作为癌症免疫治疗靶标是有吸引力的,因为这类抗原可能对可限制体内存在的反应性 T 细胞,尤其是高亲和力 T

细胞的库的免疫耐受机制较不易感。在临床上,靶向CSC上多能性相关基因的疫苗可用于针对具有低分化特征的多种癌症,而不是靶向限定的癌症亚群。因此,这些疫苗可用作通用的癌症免疫治疗平台,特别是在维持治疗以预防或延迟癌症复发的情况下。已经研究了人免疫系统介导针对多能性相关基因的T细胞应答的能力。

[0139] 当测试人白细胞抗原 (HLA) -A*0201-限制性Sox2衍生肽对胶质瘤反应性CD8+CTL的活化时,可产生针对该肽的特异性CTL并且其能够裂解胶质瘤细胞,证明Sox2为CTL的靶抗原。虽然可在健康人的外周血中容易地检测到Oct4特异性记忆CD4+T细胞,但是仅在患有新诊断的生殖细胞肿瘤的患者35%中检测到针对Oct4的免疫。

[0140] 然而,生殖细胞肿瘤的化疗导致在这些患者中体内诱导抗Oct 4免疫,表明人中缺乏对Oct4的免疫耐受。除多能性相关基因之外,OSKM工程化CRC细胞还表达很多CSC相关的肿瘤发生性抗原,并且因此用作由于OSKM基因介导的重编程产生的CSC抗原的丰富来源。由于其还携带原始体细胞突变、内部缺失、亲代癌细胞中的染色体易位和与变化相关的很多未鉴定到的新抗原,因此这些OSKM表达CRC细胞将提供广谱的肿瘤抗原。

[0141] 稳定癌细胞系的使用为疫苗制备和应用提供了很多优点。首先,使用已建立的细胞系的使用有助于规避耗时和成本高的患者个体化GMP生产,并且消除对连续生产定制的单疫苗的需求。其次,使用已建立的细胞系简化物流、降低疫苗生产和递送过程的劳力并且提高其成本效用。第三,使用已建立的细胞系允许高度标准化地大规模生产适于具有特定肿瘤类型的所有患者的同种异体疫苗,所谓的“现成”产品。最后,与HLA单倍型无关,对所有疫苗使用单一批次的同种异体疫苗消除疫苗在质量和组成方面的变化,有利于临床结果的可靠比较分析。

[0142] 结论

[0143] 在切除原发性肿瘤之后,在未接受化学治疗的患有IV期CRC的患者中生存中值为8个月,在接受化学治疗的患者中为21个月。已引入例如伊立替康 (CPT-11) 和奥沙利铂 (OHP) 的活性化学治疗性药物来治疗患有转移性CRC的患者。然而,受副作用和累积毒性的限制,连续化学治疗的时长很少超过6个月。作为典型方式,以预定数量的周期 (3至6个月) 进行化学治疗,随后完全中断或用毒性较低的药物维持。当前的研究有可能导致开发基于自体同源免疫细胞的治疗方案,即靶向CSC的基于DC的免疫治疗,希望该方案可用作CRC维持治疗的选择方案。虽然数个实验室已经针对CRC对DC癌症免疫治疗进行了测试,但是使用DC方案来靶向CSC的努力仍然是之前尚未探索的开创性工作。当前的研究是有吸引力的,因为其利用基因工程方法来增强CRC细胞的CSC性质,之后将其用于DC脉冲。本文中关于通过OSKM因子来转录调节CSC基因表达而公开的发现不仅揭示了对CSC中的分子调控机制的基本了解,并且还还为开发新的CRC治疗提供了重要线索。

[0144] 补充表1

[0145] 用于靶向OSKM转基因整合和过表达的引物

	引物序列 (5'至3') (正向, FP; 反向, RP)	SEQ ID NO:	扩增子大 小 (bp)	说明
[0146]	FP: TATTCAGCCAAACGACCATC	1	197	量化总 Oct4 表达
	RP: GCCTCTCACTCGGTTCTC	2		
	FP: ACGACGTGAGCGCCCTGCAGTACAA	3	155	量化总 Sox2 表达
	RP: GCTGGAGCTGGCCTCGGACTTGACC	4		
	FP: CCTACACAAAGAGTTCCCATC	5	123	量化总 Klf4 表达
	RP: AGTGCCTGGTCAGTTCATC	6		
	FP: AGGAACAAGAAGATGAGGAAG	7	170	量化总 c-Myc 表达
	RP: TGCCTAGTTGTGCTGATG	8		
	FP: GTACTCCTCGGTCCCTTTCC	9	143	量化外源 Oct4 表
	RP: CACCTGCAAGTTTCAGCAAA	10		达
	FP: CATGTCCCAGCACTACCAGA	11	123	量化外源 Sox2 表
	RP: ACATCCCCTGCTTGTTTCAA	12		达
	FP: GACCACCTCGCCTTACACAT	13	138	量化外源 Klf4 表
	RP: CCAAAAGACGGCAATATGGT	14		达
	FP: AAGAGGACTTGTGCGGAAA	15	182	量化外源 c-Myc 表
	RP: GGCATTAAAGCAGCGTATCC	16		达
	FP: AAGGAATTGGGAACACAAAGG	17	83	量化内源 Oct4 表
	RP: CAAGAGCATCATTGAACCTCAC	18		达
	FP: GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG	19	151	量化内源 Sox2 表
	RP: TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG	20		达
	FP: TGGTGCTTGGTGAGTCTTG	21	117	量化内源 Klf4 表
	RP: AGGTCATAAATGTTGATCGGAAG	22		达
	FP: CCTTGCCGCATCCACGAAAC	23	77	量化内源 c-Myc 表
	RP: CCTTGCTCGGGTGTGTAAGTTC	24		达
	ACAGAATTTCCTGCGCGCCAAGTTACGGCGCGCC	25	63	携带
	C	26		EcoRI-AscI-SbfI
	TTAGCATACATTATACCTGCAGGCAC			限制性位点的衔接子序列
	FP: GCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATC	27	3038	检测 OKSM-cGFP

[0147]	RP: GCCTCCCTAAGACCCAGAAGTCCAG	28		供体在 AAVS1 基因座处的位点特异性整合
	FP: GACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCC	29	538	检测 OKSM-eGFP
	RP: CAAAGGGAGATCCGACTCGTCTGA	30		盒在基因组中的多重整合的 Southern 印迹的探针设计

[0148] 补充表1 (继续)

[0149] 用于DNA甲基化分析的引物

	引物序列 (5'至3') (正向, FP; 反向, RP)	SEQ ID NO:	扩增子 大小 (bp)	说明
[0150]	FP: GAGGTTGGAGTAGAAGGATTGTTTTGGTTT	31	467	扩增经二硫化物处理的 Oct3/4 启动子
	RP: CCCCCCTAACCCATCACCTCCACCACCTAA	32		
	FP: GAGGCTGGAGCAGAAGGATTGCTTTGGCCC	33	467	扩增未经二硫化物处理的 Oct3/4 启动子
	RP: CCCCCCTGGCCCATCACCTCCACCACCTGG	34		
	FP: TGGTTAGGTTGGTTTTAAATTTTGT	35	335	扩增经二硫化物处理的 Nanog 启动子
	RP: AACCCACCCCTATAAATTCTCAATTA	36		
	FP: TGGCCAGGCTGGTTTCAAACCTCTG	37	335	扩增未经二硫化物处理的 Nanog 启动子
	RP: GACCCACCCCTGTGAATTCTCAGTTA	38		
	FP: GGTTTAAAAGGGTAAATGTGATTATATTTA	39	360	扩增经二硫化物处理的 Rex1 启动子
	RP: CAAACTACAACCACCCATCAAC	40		
	FP: GGCCTAAAAGGGTAAATGTGATTACACCCA	41	360	扩增未经二硫化物处理的 Rex1 启动子
	RP: CAGGCTACAGCCACCCATCAGC	42		

[0151] 补充表1 (继续)

[0152] 用于人结肠直肠癌干细胞标志物的引物

	引物序列 (5'至3') (正向, FP; 反向, RP)	SEQ ID NO:	扩增子大小 (bp)	说明
[0153]	FP: CTTCATCCACAGATGCTCCTAAG	43	191	扩增 mRNA CD133
	RP: TGGATTCATATGCCTTCTGTAAGA	44		

[0154]

FP: AGGGATCCTCCAGCTCCTTTTCG	45	191	扩增 mRNA CD44
RP: CGTCCGAGAGATGCTGTAGCGA	46		
FP: GTGTGTCTGGGAGAAGACGCTG	47	270	扩增 mRNA CD166
RP: GGTACGTCAAGTCGGCAAGGTATG	48		
FP: ATCCACAAGCCAGACTAGAAGGC	49	278	扩增 mRNA ABCB5
RP: AGATCCAACTGCTTCCTTTCTCAG	50		
FP: TGAGCCAGTCACCTGTGTTCCA	51	188	扩增 mRNA
RP: TGGCAGAGCTCCTCCTCAGTTG	52		ALDH1A1
FP: ATCAGACGCGCAGAGGAGGC	53	281	扩增 mRNA CD29
RP: GAGCAAACACACAGCAAACCTGAACTG	54		
FP: ACGGAGGAAGGTCTGAGGAGCA	55	170	扩增 mRNA
RP: TGAGTAGCCATTGTCCACGCTGG	56		CTNNB1
FP: ACAGTGCGGCAGACGTAAGGAT	57	110	扩增 mRNA LGR5
RP: GGAGCAGCTGACTGATGTTGTTTCATAC	58		
FP: GTGGAAGGTTCTTCTGGGACT	59	322	扩增 mRNA CD26
RP: ACTGCCCATCAGGAGATATTGAAT	60		
FP: CATTCACTTTTGAAAAGTTCTCCCTAGAA	198	272	扩增 mRNA DPP4
AG	199		
RP: CGTTTTTGTGCAGTTTTTAAAATGTGTGC			
FP: GGTTCATATGAACCTAACTGGTCAAA	200	258	扩增 mRNA ITGB1
RP: ATCATGTTTATAAAAAGCAATAGAAGGT	201		
ACGGT			
FP: AAGGTGATCTATTTTCCCTTTCTCC	202	171	扩增 mRNA KIT
RP: TTTCATACTGACCAAACTCAGCCT	203		
FP: GACTCCTACAACCCGAATACTGC	204	242	扩增 mRNA MET
RP: CATAGTGCTCCCCAATGAAAGTAGAG	205		

[0155] 补充表1 (继续)

[0156] 用于上皮-间充质转化 (EMT) 标志物的引物

	引物序列 (5'至3') (正向, FP;反向, RP)	SEQ ID NO:	扩增子大小 (bp)	说明
[0157]	FP: GGGTGACTACAAAATCAATC	61	252	扩增 mRNA E-钙粘蛋白
	RP: GGGGGCAGTAAGGGCTCTTT	62		
	FP: TGAAGGAGGAAATGGCTCGTC	63	137	扩增 mRNA 波形蛋白
	RP: GTTTGGAAGAGGCAGAGAAATCC	64		
	FP: GGAGTTTCCTGAGGGTTT	65	208	扩增 mRNA 纤连蛋白
	RP: GCAGAAGTGTTTGGGTGA	66		
	FP: CGAATGGATGAAAGACCCATCC	67	174	扩增 mRNA N-钙粘蛋白
	RP: GGAGCCACTGCCTTCATAGTCAA	68		
	FP: ATCGGAAGCCTAACTACAGCGAGC	69	150	扩增 mRNA Snail
	RP: CAGAGTCCCAGATGAGCATTGG	70		
	FP: GGAGTCCGCAGTCTTACGAG	71	201	扩增 mRNA Twist
	RP: TCTGGAGGACCTGGTAGAGG	72		
	FP: ACCCTTGAAAGTGATCCAGC	73	142	扩增 mRNA ZEB1
	RP: CATTCACATTTTCTGTCTTCCGC	74		
	FP: AGATGCATATTCGGACCCAC	75	258	扩增 mRNA Slug
	RP: CCTCATGTTTGTGCAGGAGA	76		
	FP: ATTCCTGGCGATACCTCAGC	77	186	扩增 mRNA TGFb1
	RP: ACCCGTTGATGTCCACTTGC	78		
	FP: GGCCTCGAGCTGGGAATCGC	79	100	扩增 mRNA Sox4
	RP: GCCCACTCGGGGTCTTGAC	80		

[0158] 补充表1 (继续)

[0159] 用于结肠直肠癌预后生物标志物的引物

	引物序列 (5'至 3') (正向, FP; 反向, RP)	SEQ ID NO:	扩增子大 小 (bp)	说明
[0160]	FP: AACTTCTCCTGGTCTCTCAGCT	81	145	扩增 mRNA CEA
	RP: GCAAATGCTTTAAGGAAGAAG	82		
	FP: CAAACCAAGCCCAGAACCTG	83	153	扩增 mRNA B3GALT5
	RP: TCAATCTCATCTTCGGGAAAGC	84		(CA 19-9)
	FP: GCCGGAGATGAGGAAACTGA	85	180	扩增 mRNA
	RP: GATCACGAACACTGCTGACC	86		ST6GALNAC6 (CA
				19-9)
	FP: ACCTGAATCACATCGAGCCA	87	144	扩增 mRNA TS
	RP: TTGGATGCGGATTGTACCCT	88		
	FP: CGCCTGGTGACTTCTCC	89	238	扩增 mRNA TP
[0161]	RP: TGGGTCAGCACCGAGGT	90		
	FP: GTTGTGGCTATGATTGATGA	91	237	扩增 mRNA DPD
	RP: ATTCACAGATAAGGGTACGC	92		
	FP: TTCCGCCATGGTTTTTAAATCA	93	233	扩增 mRNA DCC
	RP: AGCCTCATTTTCAGCCACACA	94		
	FP: ACTGGGGAGGGCTTTCTTTG	95	246	扩增 mRNA KRAS
	RP: GGCATCATCAACACCCTGTCT	96		
	FP: GGTGGTGCCCTATGAGCCG	97	210	扩增 mRNA TP53
	RP: TCCTCTGTGCGCCGGTCTC	98		
	FP: CCAATCAAAGGAGGGCTCACC	99	385	扩增 mRNA GPA33
[0162]	RP: TTCTCTTAGCTGCTCTGGTGGC	100		
	补充表1 (继续)			
	用于在GWAS中鉴定的结肠直肠癌高风险基因座的引物			
	引物序列 (5'至 3') (正向, FP; 反向, RP)	SEQ ID NO:	扩增子大 小 (bp)	说明
	FP: TGGCTCGCATTCATTTTCTG	101	309	扩增 mRNA BMI-1
[0163]				

[0164]

RP: AGTAGTGGTCTGGTCTTGTG	102		
FP: GGAAGCAGAGAAAGTACTGGA	103	114	扩增 mRNA APC
RP: CTGAAGTTGAGCGTAATACCAG	104		
FP: CTGCTGCTGGAATTGGTGTTGA	105	146	扩增 mRNA
RP: CTGGAGGGCCCCGGTGTAAGT	106		SMAD4
FP: CTGGCTCCAGAAGATCACAAAG	107	239	扩增 mRNA AXIN2
RP: ATCTCCTCAAACACCGCTCCA	108		
FP: GACTACACGGGAGCCACTGTCA	109	117	扩增 mRNA POLD1
RP: GTAACACAGGTTGTGGGCCATC	110		
FP: GAAGTCGGAACACAAGGAAG	111	395	扩增 mRNA STK11
RP: CCGTAACCTCCTCAGTAGTT	112		
FP: GTCAGAAAATGGAGTAACCTTA	113	560	扩增 mRNA
RP: TAGTTCGCTGAACCAATAAAGG	114		BMPR1A
FP: GGCCTCTGTCTCCCCATATCAT	115	397	扩增 mRNA
RP: CTGCTGTAGGGTCTCTGCTGTA	116		MUTYH
FP: CTGCAACCCCCATCACCTTA	117	133	扩增 mRNA SMAD7
RP: CCCTGTTTCAGCGGAGGAA	118		
FP: GGTGGAATGACTGGATTG	119	189	扩增 mRNA BMP2
RP: GCATCGAGATAGCACTG	120		
FP: CTGGTCCACCACAATGTGAC	121	162	扩增 mRNA BMP4
RP: CGATCGGCTAATCCTGACAT	122		
FP: GAGAACGACGGCTACTTTCGGA	123	227	扩增 mRNA RHPN2
RP: AGCTCTTCCTGAGCATCTGCA	124		
FP: ATATCCAGCTCACCAGGCCATGAA	125	131	扩增 mRNA SCG5
RP: TGTTGTCTCCAGTCAACTCTGCCA	126		
FP: GTCACACTCAACTGCCCTGA	127	375	扩增 mRNA
RP: GGTGAGGTGGGTTTCTGGTA	128		GREM1
FP: CAGCATCTCTGTTCCCTCCATCA	129	271	扩增 mRNA FMN1
RP: AGTGCCTTCCATTATGCCTACC	130		

[0165] 补充表1 (继续)

[0166] 用CD24核心启动子的转录转录调控的引物

引物序列 (5'至 3') (正向, FP; 反向, RP)	SEQ ID NO:	扩增子大小 (bp)	说明
FP (XbaI): GCGCTCTAGACTGCAGGGATTAGCGCCTGGAG RP (FseI): ATATGGCCGGCCCCACATCACAGCTACCTC CATGTAC	131 132	2.4k	构建 PGK-Luc-内含子以检测 CD24 的内含子 2 (2.4kb) 转录调控活性
FP (EcoRV): GATGATATCGATACCAGCCGGGTACCAGCAG G RP (HindIII): GATAAGCTTTCAGGATGCTGGGTGCTTGGA G	133 134	0.26k	构建 CD24 衍生的荧光素酶报道子以检测 CD24 的核心启动子活性
FP (EcoRV): GATGATATCGCAGTCTGAGTGGCAATGCAC TTG RP (HindIII): GATAAGCTTTCAGGATGCTGGGTGCTTGGA G	135 136	0.5k	构建 CD24-衍生的荧光素酶报道子以检测 CD24 的核心启动子活性
FP (EcoRV): GATGATATCCCTGTAGTTTGCAGCGTCAGGC A RP (HindIII): GATAAGCTTTCAGGATGCTGGGTGCTTGGA G	137 138	0.9k	构建 CD24 衍生的荧光素酶报道子以检测 CD24 的核心启动子活性
FP (EcoRV): GATGATATCCCACGCCCGGCCAAAGTATTT C RP (HindIII): GATAAGCTTTCAGGATGCTGGGTGCTTGGA G	139 140	1.9k	构建 CD24-衍生的荧光素酶报道子以检测 CD24 的核心启动子活性

[0167]

[0168]

[0169]

补充表1 (继续)
用于EMSA测定的经生物素标记的寡核苷酸

	引物序列 (5'至3') (正向, FP; 反向, RP)	SEQ ID NO:	寡核苷酸 大小 (bp)	说明
[0170]	FP:	141	38	携带 Sox2 结合位点的 CD24 启动子区
	TGGCAGGTCCCGGGAAACAAAGGAAACTT	142		
	GGGCCCCGGC			
	RP:			
	GCCGGGGCCCAAGTTTCCTTTGTTTCCCGGG			
	ACCTGCCA			
	FP:	143	38	携带两个 Sox2 结合位点的 CD24 启动子区
	CCGGGAAACAAAGGAAACTCCGGGAAACA	144		
	AAGGAAACT			
	RP:			
	AGTTTCCTTTGTTTCCCGGAGTTTCCTTTGT			
	TTCCCGG			
	FP:	145	38	不携带 Sox2 结合位点的 CD24 启动子区 (非相关 序列 1)
	CCAGCCGGGTACCAGCAGCCGGCGGCGCCC	146		
	GCCACCT			
	RP:			
	AGGTGGGCGGGCGCCGCGGCTGCTGGTAC			
	CCGGCTGG			
	FP:	147	38	不携带 Sox2 结合位点的 CD24 启动子区 (非相关 序列 2)
	GCTTTCCTGGTATATAAGGTCTCGCCGGCTC	148		
	GCCGCGC			
	RP:			
	GCGCGGCGAGCCGCGGAGACCTTATATAACC			
	AGGAAAGC			
[0171]	FP:	149	38	携带突变的 Sox2 结合位 点的 CD24 启动子区
	TGGCAGGTCCCGGGAAAAGGAGGAAACTT	150		
	GGGCCCCGGC			
	RP:			
	GCCGGGGCCCAAGTTTCCTCTCTTTCCCGGG			
	ACCTGCCA			
	FP:	151	38	携带共有 Sox2 结合位点 的 CD24 启动子区 (阳性 对照)
	TGGCAGGTCCATTTCATAACAAAGAGTTG	152		
	GGCCCCGGC			
	RP:			
	GCCGGGGCCCAACTCTTTGTTATGCAAATGG			
	ACCTGCCA			
[0172]	补充表1 (继续)			
[0173]	用于敲除CD24 3' -UTR上的miR-205结合位点的引物			

引物序列（5'至 3'） （正向, FP; 反向, RP）	SEQ ID NO:	扩增子 大小 （bp）	说明
FP: AAACGAGTTTCATGTACAAGATGAGT	153	-	构建 CRISPR 以敲除 CD24 3'-UTR 上的 miR205 结合位点
RP: TAAAACTCATCTTGTACATGAAACTC	154		
FP: CAGTCAACAGCCAGTCTCTTCGTG	155	714	T7E1 测定以量化对所 靶向 CD24 位点的 CRISPR 介导的切割 效率
RP: CATCATTGCCCTGGCACATGTCA	156		
FP (SnaBI):	157	867	构建携带 CD24 序列 的左同源臂
GCGCTACGTACCAGGATAGACAGTGACCCA	158		
ATGA			
RP (SalI):			
ATATGTCGACCTTGTACATGAAACTCCAGC			
AGAT			
FP (NotI):	159	875	构建携带 CD24 序列 的右同源臂
ATATGCGGCCGCGAAGGAGAGGCAACATC	160		
CAAAATAG			
RP (BstBI):			
GCGCTTCGAATCAAGCCTGTAATCCCAGCA			
CTTTG			
FP: GACATCACCTCCCACAACGAGGACT	161	1.85k	检测 mCherry 转基因 在 CD24 上的位点特 异性整合
RP: AGCATCAGTGTGTGACCATGCGAAC	162		
FP: GAGCAATGGTGGCCAGGCTC	163	290	扩增 6 号染色体上的 mRNA CD24
RP: GGATTGGGTTTAGAAGATGGGGAAA	164		
FP: GAGCAATGGTGGCCAGGCTT	165	290	扩增 Y 染色体上的 mRNA CD24
RP: GGATTGGGTTTAGAAGATGGGGAAG	166		
FP: ATCCAGCCAGACACGCTGCA	167	187	扩增 15 号染色体上的 mRNA CD24
RP: CAGTAGCTGGATTGGGGCAGTC	168		

[0175]

FP: TCTGGAAGTCCAATGTGGCAAG	169	406	扩增由 6 号染色体表达的截短 mRNA CD24
RP: CACTGGAAGTTCCTTCTCATGTAC	170		
FP: AGATCCTCAGACAATCCATGTGCT	171	104	量化前体茎环 hsa-mir-205 表达
RP: AGCTCCATGCCTCCTGAACT	172		
Adaptor: TCCGTCGTTCTAATGCGAACAGACTCCG	173	-	成熟 miR205-5p 的 cDNA 合成
FP: CCTCCATCCTTCATTCCACCG	174	50	量化成熟 miR205-5p 表达
RP: GTTTCGTCGTTCTAATGCGAA	175		
FP: CTCAAGTACCCATCTTGGAGGG	176	244	量化 miR205HG 表达
RP: CACGCACACTCCAGATGTCTC	177		
FP (EcoRI): GCGCGAATTCAAAGATCCTCAGACAATCCA TGTGCT	178 179	114	构建 CMV-miR205
RP (SpeI): ATATACTAGTTGTCAGCTCCATGCCTCCTGA AC			
FP (EcoRI): GCGCGAATTCGAAATGGGCTGAGTCCCTCT TG	180 181	963	构建 CMV-miR205HG (共表达 miR205)
RP (SpeI): ATATACTAGTTTTTTCAGTAGACAAGCAAC TTTTAG			
FP (XbaI): GCGCTCTAGACTTAAGAGACTCAGGCCAAG AAACG	182 183	211	构建 PGK-Luc-UTR 以 检测 CD24 的 3'-UTR (211bp) 转录调控活 性
RP (FseI): ATATGGCCGGCCGGCATCCATCATCTAGTC AAACCTC			
FP (XbaI): GCGCTCTAGACTTAAGAGACTCAGGCCAAG AAACG	184 185	300 301 514	构建 PGK-Luc-UTR 以 检测 CD24 的 3'-UTR (211bp) 转录调控活 性
RP (FseI): ATATGGCCGGCCCAAGCCACATTCAAGGAA ATCATGTCT			

[0176] 补充表1 (继续)

[0177] 用于敲除CD24ORF的引物

	引物序列(5'至3') (正向, FP; 反向, RP)	SEQ ID NO:	扩增子大 小 (bp)	说明
[0178]	FP:	186	-	构建 CRISPR 以敲除 CD24 ORF
	AAACGGACATGGGCAGAGCAATGGGT	187		
	RP: TAAAACCCATTGCTCTGCCCATGTCC			
	FP: CACGTCACGGCTATTGTGGCTTTC	188	532	T7E1 测定以量化对所 靶向 CD24 位点的 CRISPR 介导的切割效 率
	RP: GCCTCTGGGTGAAAGTGGGAAGTAG	189		
	FP (SnaBI):	190	881	构建携带 CD24 序列的 左同源臂
	GCGCTACGTAGCTCACAGAACAAAGCAA	191		
	GGGCTTC			
	RP (SalI):			
	ATATGTCGACTTGCTCTGCCCATGTCCCC			
	T			
	FP (NotI):	192	824	构建携带 CD24 序列的 右同源臂
	ATATGCGGCCGCTGGTGGCCAGGCTCGG	193		
	GCT			
	RP (BstBI):			
	GCGCTTCGAAAGGATCTAGGGAGACCGC			
	GCTGGTAG			
	FP: GACATCACCTCCCACAACGAGGACT	194	1.6k	
	RP: ATCCTCCAAACCCGAACTGACCCA	195		
				检测 mCherry 转基因 在 CD24 上的位点特异 性整合
	FP: GAGCAATGGTGGCCAGGCTC	196	290	
	RP: GGATTGGGTTTAGAAGATGGGGAAA	197		扩增 mRNA CD24

[0179] 参考文献

[0180] 1.Hockemeyer,D.,Soldner,F.,Beard,C.,Gao,Q.,Mitalipova,M.,DeKolver,R.C.,Katibah,G.E.,Amora,R.,Boydston,E.A.,Zeitler,B.et al. (2009)Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases.Nature biotechnology,27,851-857.

[0181] 2.Miller,J.C.,Holmes,M.C.,Wang,J.,Guschin,D.Y.,Lee,Y.L.,Rupniewski,I.,Beausejour,C.M.,Waite,A.J.,Wang,N.S.,Kim,K.A.et al. (2007)An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing.Nature biotechnology,25,778-785.

[0182] 3.Phang RZ,Tay FC,Goh SL,Lau CH,Zhu H,Tan WK,Liang Q,Chen C,Du S,Li Z,Tay JC,Wu C,Zeng J,Fan W,Toh HC,Wang S.Zinc finger nuclease-expressing baculoviral vectors mediate targeted genome integration of reprogramming factor genes to facilitate the generation of human induced pluripotent stem

cells.Stem Cells Transl Med.2013 Dec;2(12):935-45.

[0183] 4.Ramachandra,C.J.,Shahbazi,M.,Kwang,T.W.,Choudhury,Y.,Bak,X.Y.,Yang,J.and Wang,S.(2011)Efficient recombinase-mediated cassette exchange at the AAVS1 locus in human embryonic stem cells using baculoviral vectors.Nucleic Acids Research,39,e107.

[0184] 5.Tay FC,Tan WK,Goh SL,Ramachandra CJ,Lau CH,Zhu H,Chen C,Du S,Phang RZ,Shahbazi M,Fan W,Wang S.Targeted transgene insertion into the AAVS1 locus driven by baculoviral vector mediated zinc finger nuclease expression in human-induced pluripotent stem cells.J Gene Med.2013Oct;15(10):384-95.

[0185] 6.Zhu,H.,Lau,C.H.,Goh,S.L.,Liang,Q.,Chen,C.,Du,S.,Phang,R.Z.,Tay,F.C.,Tan,W.K.,Li,Z.et al.(2013)Baculoviral transduction facilitates TALEN-mediated targeted transgene integration and Cre/LoxP cassette exchange in human-induced pluripotent stem cells.Nucleic acids research,41,e180.

序列列表

<110> 新加坡科技研究局

<120> 上调癌干细胞标志物以产生抗原特异性细胞毒性效应T细胞的方法

<130> 9869SG3314

<160> 205

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 量化总Oct4表达(正向引物)

<400> 1

tattcagcca aacgaccatc 20

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 量化总Oct4表达(反向引物)

<400> 2

gcctctcact cggttctc 18

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 量化总Sox2表达(正向引物)

<400> 3

acgacgtgag cgccctgcag taaaa 25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 量化总Sox2表达(反向引物)

<400> 4

gctggagctg gcctcggact tgacc 25

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化总Klf4表达(正向引物)
<400> 5
cctacacaaa gagttcccat c 21
<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化总Klf4表达反向引物)
<400> 6
agtgcctggc cagttcatc 19
<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化总c-Myc表达(正向引物)
<400> 7
aggaacaaga agatgaggaa g 21
<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化总c-Myc表达(反向引物)
<400> 8
tgcgtagttg tgctgatg 18
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化外源Oct4表达(正向引物)
<400> 9

gtactcctcg gtccctttcc 20
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化外源Oct4表达(反向引物)
<400> 10
cacctgcaag tttcagcaaa 20
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化外源Sox2表达(正向引物)
<400> 11
catgtcccag cactaccaga 20
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化外源Sox2表达(反向引物)
<400> 12
acatcccctg cttgtttcaa 20
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化外源Klf4表达(正向引物)
<400> 13
gaccacctcg ccttacacat 20
<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化外源Klf4表达(反向引物)

<400> 14
ccaaaagacg gcaatatggt 20
<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化外源c-Myc表达(正向引物)
<400> 15
aagaggactt gttgcggaaa 20
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化外源c-Myc表达(反向引物)
<400> 16
ggcattaaag cagcgtatcc 20
<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化内源Oct4表达(正向引物)
<400> 17
aaggaattgg gaacacaaag g 21
<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化内源Oct4表达(反向引物)
<400> 18
caagagcatc attgaacttc ac 22
<210> 19
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 量化内源Sox2表达(正向引物)
<400> 19
gggaaatggg aggggtgcaa aagagg 26
<210> 20
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化内源Sox2表达(反向引物)
<400> 20
ttgcgtgagt gtggatggga ttggtg 26
<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化内源Klf4表达(正向引物)
<400> 21
tggtgcttgg tgagtcttg 19
<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化内源Klf4表达(反向引物)
<400> 22
aggtcataaa tgttgatcgg aag 23
<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化内源c-Myc表达(正向引物)
<400> 23
ccttgccgca tccacgaaac 20
<210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 量化内源c-Myc表达(反向引物)

<400> 24

ccttgctcgg gtgttgtaag ttc 23

<210> 25

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 携带EcoRI-AscI-SbfI 限制性位点的衔接子序列

<400> 25

acagaattcc tgcgcgccaa gttacggcgc gccc 34

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 携带EcoRI-AscI-SbfI 限制性位点的衔接子序列

<400> 26

ttagcataca ttatacctgc aggcac 26

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 检测OKSM-eGFP供体在AAVS1基因座处的位点特异性整合(正向引物)

<400> 27

gctacgtccc ttcggccctc aatc 24

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> OKSM-eGFP供体在AAVS1基因座处的位点特异性整合(反向引物)

<400> 28

gcctccctaa gaccagaag tccag 25

<210> 29

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 检测OKSM-eGFP盒在基因组中的多重整合的Southern 印迹的探针设计(正向引物)
<400> 29
gactggtatt cttaactatg ttgctcc 27
<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 检测OKSM-eGFP盒在基因组中的多重整合的Southern 印迹的探针设计(反向引物)
<400> 30
caaagggaga tccgactcgt ctga 24
<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增经二硫化物处理的Oct3/4启动子 (正向引物)
<400> 31
gaggttggag tagaaggatt gttttggttt 30
<210> 32
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增经二硫化物处理的Oct3/4启动子 (反向引物)
<400> 32
ccccccctaac ccatcacctc caccacctaa 30
<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增未经二硫化物处理的Oct3/4启动子 (正向引物)
<400> 33
gaggctggag cagaaggatt gctttggccc 30

<210> 34
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增未经二硫化物处理的Oct3/4启动子（反向引物）
<400> 34
ccccctggc ccatcacctc caccacctgg 30
<210> 35
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增经二硫化物处理的Nanog 启动子（正向引物）
<400> 35
tggttaggtt ggttttaaatt ttttg 25
<210> 36
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增经二硫化物处理的Nanog启动子（反向引物）
<400> 36
aaccaccct tataaattct caatta 26
<210> 37
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增未经二硫化物处理的Nanog启动子（正向引物）
<400> 37
tggccaggct ggtttcaaac tcctg 25
<210> 38
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增未经二硫化物处理的Nanog启动子（反向引物）
<400> 38

gacccaccct tgtgaattct cagtta 26
<210> 39
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增经二硫化物处理的Rex1启动子（正向引物）
<400> 39
ggttttaaaag ggtaaattgtg attatatatta 30
<210> 40
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增经二硫化物处理的Rex1启动子（反向引物）
<400> 40
caaactacaa ccacccatca ac 22
<210> 41
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增未经二硫化物处理的Rex1启动子（正向引物）
<400> 41
ggcctaaaag ggtaaattgtg attacaccca 30
<210> 42
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增未经二硫化物处理的Rex1启动子（反向引物）
<400> 42
caggctacag ccacccatca gc 22
<210> 43
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CD133（正向引物）

<400> 43
cttcatccac agatgctcct aag 23
<210> 44
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CD133 (反向引物)
<400> 44
tggattcata tgccttctgt aaga 24
<210> 45
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CD44 (正向引物)
<400> 45
agggatcctc cagctccttt cg 22
<210> 46
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CD44 (反向引物)
<400> 46
cgtccgagag atgctgtagc ga 22
<210> 47
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CD166 (正向引物)
<400> 47
gtgtgtctgg gagaagacgc tg 22
<210> 48
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 扩增mRNA CD166 (反向引物)
<400> 48
ggtacgtcaa gtcggcaagg tatg 24
<210> 49
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA ABCB5 (正向引物)
<400> 49
atccacaagc cagactagaa ggc 23
<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA ABCB5 (反向引物)
<400> 50
agatccaact gcttcctttc tcag 24
<210> 51
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA ALDH1A1 (正向引物)
<400> 51
tgagccagtc acctgtgttc ca 22
<210> 52
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA ALDH1A1 (反向引物)
<400> 52
tggcagagct cctcctcagt tg 22
<210> 53
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 扩增mRNA CD29 (正向引物)
<400> 53
atcagacgcg cagaggagc 20
<210> 54
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CD29 (反向引物)
<400> 54
gagcaaacac acagcaaact gaactg 26
<210> 55
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CTNNB1 (正向引物)
<400> 55
acggaggaag gtctgaggag ca 22
<210> 56
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CTNNB1 (反向引物)
<400> 56
tgagtagcca ttgtccacgc tgg 23
<210> 57
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA LGR5 (正向引物)
<400> 57
acagtgcggc agacgtaagg at 22
<210> 58
<211> 27
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA LGR5 (反向引物)
<400> 58
ggagcagctg actgatgttg ttcatac 27
<210> 59
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CD26 (正向引物)
<400> 59
gtggaagggtt cttctgggac t 21
<210> 60
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CD26 (反向引物)
<400> 60
actgcccatac aggagatatt gaat 24
<210> 61
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA E-钙粘蛋白 (正向引物)
<400> 61
gggtgactac aaaatcaatc 20
<210> 62
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA E-钙粘蛋白 (反向引物)
<400> 62
gggggcagta agggctcttt 20
<210> 63
<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA波形蛋白 (正向引物)
<400> 63
tgaaggagga aatggctcgt c 21
<210> 64
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA波形蛋白 (反向引物)
<400> 64
gttttgaaga ggcagagaaa tcc 23
<210> 65
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA纤连蛋白 (正向引物)
<400> 65
ggagtttcct gagggttt 18
<210> 66
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA纤连蛋白 (反向引物)
<400> 66
gcagaagtgt ttgggtga 18
<210> 67
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA N-钙粘蛋白 (正向引物)
<400> 67
cgaatggatg aaagacccat cc 22
<210> 68

<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA N-钙粘蛋白 (反向引物)
<400> 68
ggagccactg ccttcatagt caa 23
<210> 69
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA Snail (正向引物)
<400> 69
atcggaagcc taactacagc gage 24
<210> 70
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA Snail (反向引物)
<400> 70
cagagtccca gatgagcatt gg 22
<210> 71
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA Twist (正向引物)
<400> 71
ggagtccgca gtcttacgag 20
<210> 72
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA Twist (反向引物)
<400> 72
tctggaggac ctggttagagg 20

<210> 73
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA ZEB1 (正向引物)
<400> 73
acccttgaaa gtgatccagc 20
<210> 74
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA ZEB1 (反向引物)
<400> 74
cattccattt tctgtcttcc gc 22
<210> 75
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA Slug (正向引物)
<400> 75
agatgcatat tcggaccac 20
<210> 76
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA Slug (反向引物)
<400> 76
cctcatgttt gtgcaggaga 20
<210> 77
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA TGFb1 (正向引物)
<400> 77

attcctggcg atacctcagc 20
<210> 78
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA TGFb1 (反向引物)
<400> 78
acccgttgat gtccacttgc 20
<210> 79
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA Sox4 (正向引物)
<400> 79
ggcctcgagc tgggaatcgc 20
<210> 80
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA Sox4 (反向引物)
<400> 80
gcccactcgg ggtcttgcac 20
<210> 81
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CEA (正向引物)
<400> 81
aacttctcct ggtctctcag ct 22
<210> 82
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CEA (反向引物)

<400> 82
gcaaatgctt taaggaagaa g 21
<210> 83
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA B3GALT5 (CA 19-9) (正向引物)
<400> 83
caaaccaagc ccagaacctg 20
<210> 84
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA B3GALT5 (CA 19-9) (反向引物)
<400> 84
tcaatctcat cttcgggaaa gc 22
<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA ST6GALNAC6 (CA 19-9) (正向引物)
<400> 85
gccggagatg aggaaactga 20
<210> 86
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA ST6GALNAC6 (CA 19-9) (反向引物)
<400> 86
gatcacgaac actgctgacc 20
<210> 87
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 扩增mRNA TS (正向引物)
<400> 87
acctgaatca catcgagcca 20
<210> 88
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA TS (反向引物)
<400> 88
ttggatgcgg attgtaccct 20
<210> 89
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA TP (正向引物)
<400> 89
cgccctgggtga cttctcc 17
<210> 90
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA TP (反向引物)
<400> 90
tgggtcagca ccgaggt 17
<210> 91
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA DPD (正向引物)
<400> 91
gttgtggcta tgattgatga 20
<210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 扩增mRNA DPD (反向引物)
<400> 92
attcacagat aagggtacgc 20
<210> 93
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA DCC (正向引物)
<400> 93
ttccgccatg gtttttaaata ca 22
<210> 94
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA DCC (反向引物)
<400> 94
agcctcatatt tcagccacac a 21
<210> 95
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA KRAS (正向引物)
<400> 95
actggggagg gctttctttg 20
<210> 96
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA KRAS (反向引物)
<400> 96
ggcatcatca acaccctgtc t 21
<210> 97
<211> 19
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA TP53 (正向引物)
<400> 97
ggtggtgccc tatgagccg 19
<210> 98
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA TP53 (反向引物)
<400> 98
tcctctgtgc gccggtctc 19
<210> 99
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA GPA33 (正向引物)
<400> 99
ccaatcaaag gagggctcac c 21
<210> 100
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA GPA33 (反向引物)
<400> 100
ttctcttagc tgctctggtg gc 22
<210> 101
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA BMI-1 (正向引物)
<400> 101
tggetcgcac tcattttctg 20
<210> 102
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA BMI-1 (反向引物)
<400> 102
agtagtggtc tggctcttg 20
<210> 103
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA APC (正向引物)
<400> 103
ggaagcagag aaagtactgg a 21
<210> 104
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA APC (反向引物)
<400> 104
ctgaagttga gcgtaatacc ag 22
<210> 105
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA SMAD4 (正向引物)
<400> 105
ctgctgctgg aattggtgtt ga 22
<210> 106
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA SMAD4 (反向引物)
<400> 106
ctggagggcc cgggtgaagt 20
<210> 107

<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA AXIN2 (正向引物)
<400> 107
ctggctccag aagatcacao ag 22
<210> 108
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA AXIN2 (反向引物)
<400> 108
atctcctcaa acaccgctcc a 21
<210> 109
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA POLD1 (正向引物)
<400> 109
gactacacgg gagccactgt ca 22
<210> 110
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA POLD1 (反向引物)
<400> 110
gtaacacagg ttgtgggcca tc 22
<210> 111
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA STK11 (正向引物)
<400> 111
gaagtcggaa cacaaggaag 20

<210> 112
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA STK11 (反向引物)
<400> 112
ccgtaacctc ctcagtagtt 20
<210> 113
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA BMPR1A (正向引物)
<400> 113
gtcagaaaat ggagtaacct ta 22
<210> 114
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA BMPR1A (反向引物)
<400> 114
tagttcgctg aaccaataaa gg 22
<210> 115
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA MUTYH (正向引物)
<400> 115
ggcctctgtc tccccatata at 22
<210> 116
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA MUTYH (反向引物)
<400> 116

ctgctgtagg gtctctgctg ta 22
<210> 117
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA SMAD7 (正向引物)
<400> 117
ctgcaacccc catcacctta 20
<210> 118
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA SMAD7 (反向引物)
<400> 118
ccctgtttca gcggaggaa 19
<210> 119
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA BMP2 (正向引物)
<400> 119
ggtggaatga ctggattg 18
<210> 120
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA BMP2 (反向引物)
<400> 120
gcatcgagat agcactg 17
<210> 121
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA BMP4 (正向引物)

<400> 121
ctggtccacc acaatgtgac 20
<210> 122
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA BMP4 (反向引物)
<400> 122
cgatcggcta atcctgacat 20
<210> 123
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA RHPN2 (正向引物)
<400> 123
gagaacgacg gctactttcg ga 22
<210> 124
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA RHPN2 (反向引物)
<400> 124
agctcttcct tgagcatctg ca 22
<210> 125
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA SCG5 (正向引物)
<400> 125
atatccagct caccaggcca tgaa 24
<210> 126
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 扩增mRNA SCG5 (反向引物)
<400> 126
tgttgtctcc agtcaactct gccca 24
<210> 127
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA GREM1 (正向引物)
<400> 127
gtcacactca actgccctga 20
<210> 128
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA GREM1 (反向引物)
<400> 128
ggtgaggtgg gtttctggta 20
<210> 129
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA FMN1 (正向引物)
<400> 129
cagcatctct gttcctccat ca 22
<210> 130
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA FMN1 (反向引物)
<400> 130
agtgccttcc attatgccta cc 22
<210> 131
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 构建PGK-Luc-内含子以检测CD24的内含子2(2.4kb)转录调控活性(正向引物)

<400> 131

gcgctctaga ctgcagggat tagcgcctgg ag 32

<210> 132

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建PGK-Luc-内含子以检测CD24的内含子2(2.4kb)转录调控活性(反向引物)

<400> 132

atatggccgg cccacatca cagctacctc catgtac 37

<210> 133

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建CD24-衍生的萤光素酶报道子以检测CD24的核心启动子活性(正向引物)

<400> 133

gatgatatcg ataccagccg ggtaccagca g 31

<210> 134

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建CD24-衍生的萤光素酶报道子以检测CD24的核心启动子活性(反向引物)

<400> 134

gataagcttt caggatgctg ggtgcttgga g 31

<210> 135

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建CD24-衍生的萤光素酶报道子以检测CD24的核心启动子活性(正向引物)

<400> 135

gatgatatcg cagtctgagt ggcaatgcac ttg 33

<210> 136

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建CD24-衍生的萤光素酶报道子以检测CD24的核心启动子活性(反向引物)

<400> 136

gataagcttt caggatgctg ggtgcttgga g 31

<210> 137

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建CD24-衍生的萤光素酶报道子以检测CD24的核心启动子活性(正向引物)

<400> 137

gatgatatcc ctgtagtttg cagcgtcagg ca 32

<210> 138

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建CD24-衍生的萤光素酶报道子以检测CD24的核心启动子活性(反向引物)

<400> 138

gataagcttt caggatgctg ggtgcttgga g 31

<210> 139

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建CD24-衍生的萤光素酶报道子以检测CD24的核心启动子活性(正向引物)

<400> 139

gatgatatcc cacgcccggc caaagtatatt c 31

<210> 140

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建CD24-衍生的萤光素酶报道子以检测CD24的核心启动子活性(反向引物)

<400> 140

gataagcttt caggatgctg ggtgcttgga g 31

<210> 141

<211> 38

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Sox2结合位点的CD24启动子区(正向引物)
<400> 141
tggcaggtcc cgggaaacaa aggaaacttg ggcccggc 38
<210> 142
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 携带Sox2结合位点的CD24启动子区(反向引物)
<400> 142
gccgggcca agtttccttt gtttcccggg acctgcca 38
<210> 143
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 携带两个Sox2结合位点的CD24启动子区正向引物)
<400> 143
ccgggaaaca aaggaaactc cgggaaacaa aggaaact 38
<210> 144
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 携带两个Sox2结合位点的CD24启动子区(阳性对照)(反向引物)
<400> 144
agtttccttt gtttcccgga gtttcctttg tttcccgg 38
<210> 145
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 不携带Sox2结合位点的CD24启动子区(非相关序列1)(正向引物)
<400> 145
ccagccgggt accagcagcc ggcggcgccc gcccacct 38
<210> 146

<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 不携带Sox2结合位点的CD24启动子区(非相关序列1)(反向引物)
<400> 146
aggtgggcgg gcgccgccgg ctgctggtac ccggctgg 38
<210> 147
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 不携带Sox2结合位点的CD24启动子区(非相关序列2)(正向引物)
<400> 147
gctttcctgg tatataaggt ctgcccggt cgccgcgc 38
<210> 148
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 不携带Sox2结合位点的CD24启动子区(非相关序列2)(反向引物)
<400> 148
gcgcggcgag ccggcgagac cttatatacc aggaaagc 38
<210> 149
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 携带突变的Sox2结合位点的CD24启动子区(正向引物)
<400> 149
tggcaggtcc cgggaaaagg aggaaacttg ggcccggc 38
<210> 150
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 携带突变的Sox2结合位点的CD24启动子区(反向引物)
<400> 150
gccgggcca agtttcctcc ttttcccggg acctgcca 38

- <210> 151
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 携带共有Sox2结合位点的CD24启动子区(阳性对照)(正向引物)
<400> 151
tggcaggtcc atttgcataa caaagagttg ggccccggc 38
<210> 152
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 携带共有Sox2结合位点的CD24启动子区(阳性对照)(反向引物)
<400> 152
gccgggcccc actctttgtt atgcaaattg acctgcca 38
<210> 153
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 构建CRISPR以敲减CD24 3'-UTR上的miR205结合位点
(正向引物)
<400> 153
aaacgagttt catgtacaag atgagt 26
<210> 154
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 构建CRISPR以敲减CD24 3'-UTR上的miR205结合位点(反向引物)
<400> 154
taaaactcat cttgtacatg aaactc 26
<210> 155
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> T7E1测定以量化对所靶向CD24位点的CRISPR介导的切割效率(正向引物)

<400> 155
cagtcaacag ccagtctctt cgtg 24
<210> 156
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> T7E1测定以量化对所靶向CD24位点的CRISPR介导的切割效率(反向引物)
<400> 156
catcattgcc ctggcacatg tca 23
<210> 157
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 构建携带CD24序列的左同源臂(正向引物)
<400> 157
gcgctacgta ccaggataga cagtgaccca atga 34
<210> 158
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 构建携带CD24序列的左同源臂(反向引物)
<400> 158
atatgtcgac cttgtacatg aaactccagc agat 34
<210> 159
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 构建携带CD24序列的右同源臂(正向引物)
<400> 159
atatgcggcc gcgaaggaga ggcaacatcc aaaatag 37
<210> 160
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 构建携带CD24序列的右同源臂(反向引物)

<400> 160

gcgcttcgaa tcaagcctgt aatcccagca ctttg 35

<210> 161

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 检测mCherry转基因在CD24上的位点特异性整合(正向引物)

<400> 161

gacatcacct cccacaacga ggact 25

<210> 162

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 检测mCherry转基因在CD24上的位点特异性整合(反向引物)

<400> 162

agcatcagtg tgtgaccatg cgaac 25

<210> 163

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 扩增6号染色体上的 mRNA CD24 (正向引物)

<400> 163

gagcaatggg gccaggctc 20

<210> 164

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 扩增6号染色体上的 mRNA CD24 (反向引物)

<400> 164

ggattgggtt tagaagatgg ggaaa 25

<210> 165

<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增Y染色体上的mRNA CD24 (正向引物)
<400> 165
gagcaatggt ggccaggctt 20
<210> 166
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增Y染色体上的mRNA CD24 (反向引物)
<400> 166
ggattgggtt tagaagatgg ggaag 25
<210> 167
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增15号染色体上的mRNA CD24 (正向引物)
<400> 167
atccagccag acacgctgca 20
<210> 168
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增15号染色体上的mRNA CD24 (反向引物)
<400> 168
cagtagctgg atttggggca gtc 23
<210> 169
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增由6号染色体表达的截短mRNA CD24 (正向引物)
<400> 169
tctggaagtc caatgtggca ag 22

<210> 170
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增由6号染色体表达的截短mRNA CD24 (反向引物)
<400> 170
cactggaagt tcccttctca tgtac 25
<210> 171
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化前体茎环hsa-mir-205 表达 (正向引物)
<400> 171
agatcctcag acaatccatg tgct 24
<210> 172
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化前体茎环hsa-mir-205 表达 (反向 引物)
<400> 172
agctccatgc ctcctgaact 20
<210> 173
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 成熟miR205-5p的cDNA合成 (衔接子)
<400> 173
tccgtcgttc taatgcgaac agactccg 28
<210> 174
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化成熟miR205-5p 表达 (正向引物)

<400> 174
cctccatcct tcattccacc g 21
<210> 175
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化成熟miR205-5p 表达(反向引物)
<400> 175
gtttccgtcg ttctaatacg aa 22
<210> 176
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化 miR205HG表达(正向引物)
<400> 176
ctcaagtacc catcttgag gg 22
<210> 177
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 量化miR205HG表达(反向引物)
<400> 177
cacgcacact ccagatgtct c 21
<210> 178
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 构建CMV-miR205 (正向引物)
<400> 178
gcgcgaattc aaagatcctc agacaatcca tgtgct 36
<210> 179
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 构建CMV-miR205 (反向引物)

<400> 179

atatactagt tgtcagctcc atgcctcctg aac 33

<210> 180

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建CMV-miR205HG (共表达miR205) (正向引物)

<400> 180

gcgcgaattc gaaatgggct gagtcctct tg 32

<210> 181

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建CMV-miR205HG (共表达 miR205) (反向引物)

<400> 181

atatactagt tttttcagta gacaagcaac ttttag 36

<210> 182

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建PGK-Luc-UTR以检测CD24的3'-UTR(211bp)转录调控活性正向引物)

<400> 182

gcgctctaga cttaagagac tcaggccaag aaacg 35

<210> 183

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 构建PGK-Luc-UTR以检测CD24的3'-UTR(211bp)转录调控活性(反向引物)

<400> 183

atatggccgg ccggcatcca tcatctagtc aaacctc 37

<210> 184

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 构建PGK-Luc-UTR以检测CD24的3' -UTR(211bp) 转录调控活性(正向引物)
<400> 184
gcgctctaga ctttaagagac tcaggccaag aaacg 35
<210> 185
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 构建PGK-Luc-UTR以检测CD24的3' -UTR(211bp) 转录调控活性(反向引物)
<400> 185
atatggccgg cccaagccac attcaaggaa atcatgtct 39
<210> 186
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 构建CRISPR以敲除CD24 ORF(正向引物)
<400> 186
aaacggacat gggcagagca atgggt 26
<210> 187
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 构建CRISPR以敲除CD24 ORF(反向引物)
<400> 187
taaaacccat tgctctgccc atgtcc 26
<210> 188
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> T7E1测定以量化对所靶向CD24位点的CRISPR介导的切割效率(正向引物)
<400> 188
cacgtcacgg ctattgtggc tttc 24
<210> 189
<211> 25
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> T7E1测定以量化对所靶向CD24位点的CRISPR介导的切割效率(反向引物)
<400> 189
gcctctgggt gaaagtggga agtag 25
<210> 190
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 构建携带CD24序列的左同源臂(正向引物)
<400> 190
gcgctacgta gctcacagaa caaagcaagg gcttc 35
<210> 191
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 构建携带CD24序列的左同源臂(反向引物)
<400> 191
atatgtcgac ttgctctgcc catgtcccct 30
<210> 192
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 构建携带CD24序列的右同源臂(正向引物)
<400> 192
atatgcggcc gctggtggcc aggetcgggc t 31
<210> 193
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 构建携带CD24序列的右同源臂(反向引物)
<400> 193
gcgcttcgaa aggatctagg gagaccgcgc tggtag 36
<210> 194
<211> 25

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 检测mCherry转基因在CD24上的位点特异性整合
(正向引物)
<400> 194
gacatcacct cccacaacga ggact 25
<210> 195
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 检测mCherry转基因在CD24上的位点特异性整合
(反向引物)
<400> 195
atcctccaaa cccgaactga ccca 24
<210> 196
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CD24 (fowrad 引物)
<400> 196
gagcaatggg ggccaggctc 20
<210> 197
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA CD24 (反向引物)
<400> 197
ggattgggtt tagaagatgg ggaaa 25
<210> 198
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA DPP4 (正向引物)
<400> 198

cattcacttt tgaaaagttc tccctagaaa g 31

<210> 199

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 扩增mRNA DPP4 (反向引物)

<400> 199

cgtttttgtg cagttttaaa atgtgtgc 28

<210> 200

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 扩增mRNA ITGB1 (正向引物)

<400> 200

ggtttcata tgaacctaac tggcmeta 28

<210> 201

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 扩增mRNA ITGB1 (反向引物)

<400> 201

atcatgttta taaaagcaat agaaggtacg gt 32

<210> 202

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 扩增mRNA KIT (正向引物)

<400> 202

aagtgatct atttttccct ttctcc 26

<210> 203

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 扩增mRNA KIT (反向引物)

<400> 203
tttcatactg accaaaactc agcct 25
<210> 204
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA MET (正向引物)
<400> 204
gactcctaca acccgaatac tgc 23
<210> 205
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 扩增mRNA MET (反向引物)
<400> 205
catagtgctc cccaatgaaa gtagag 26

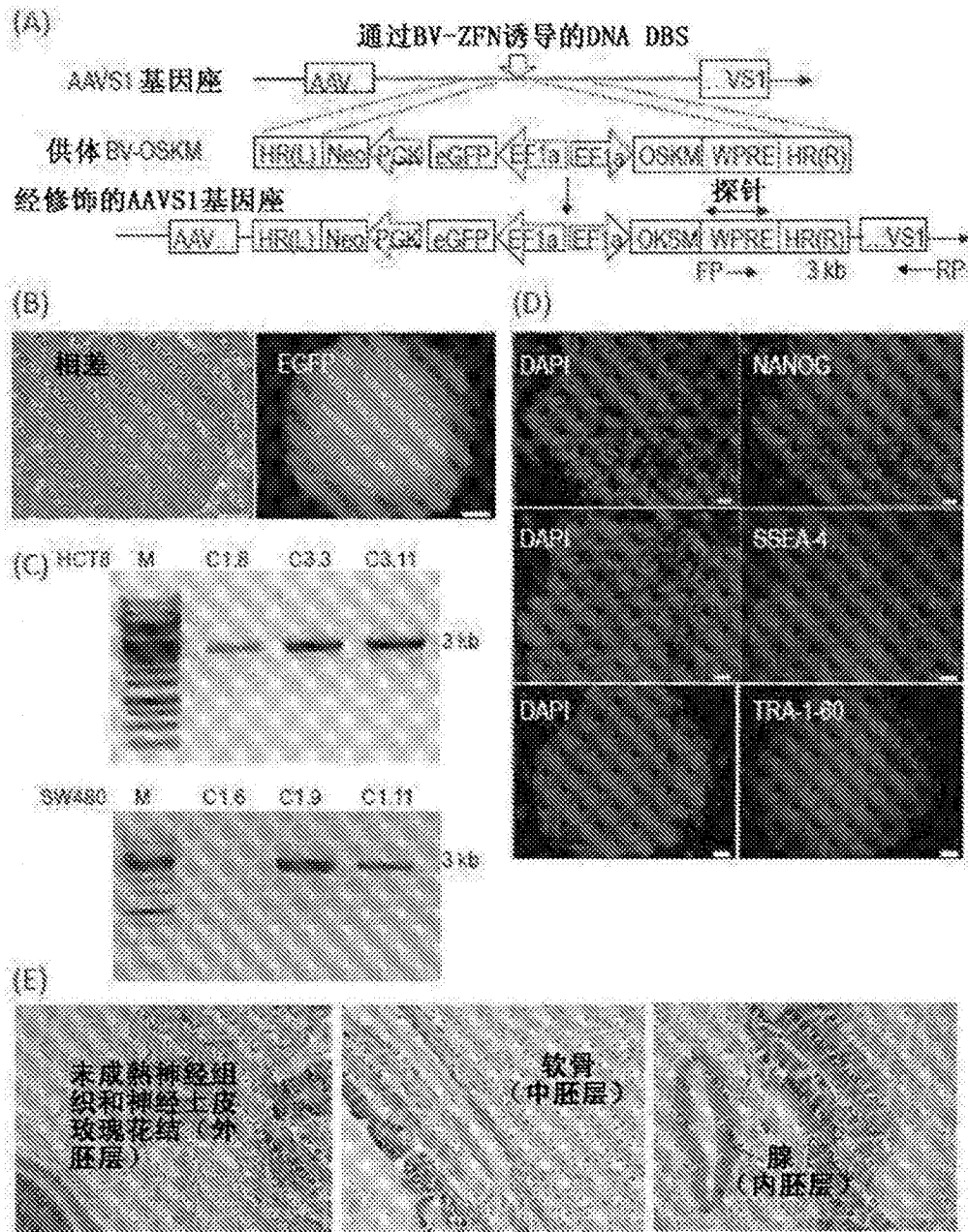


图1

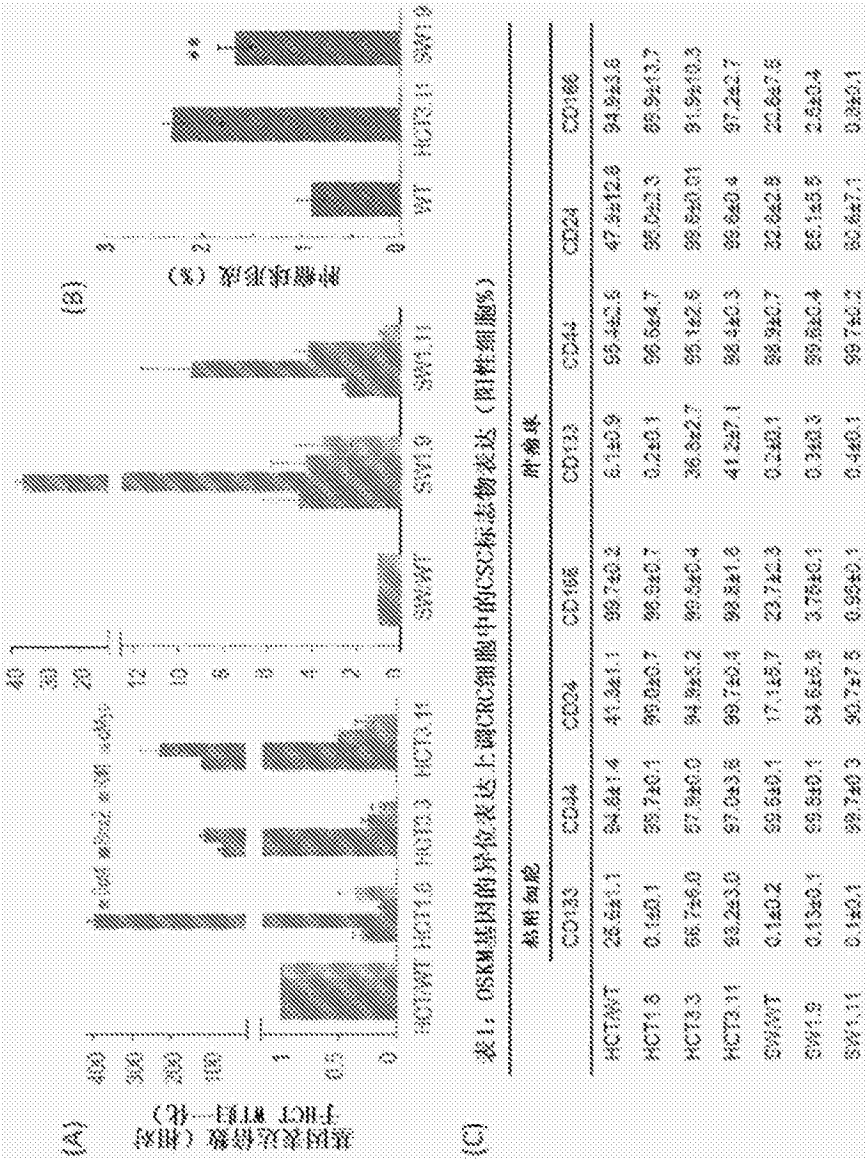


图2

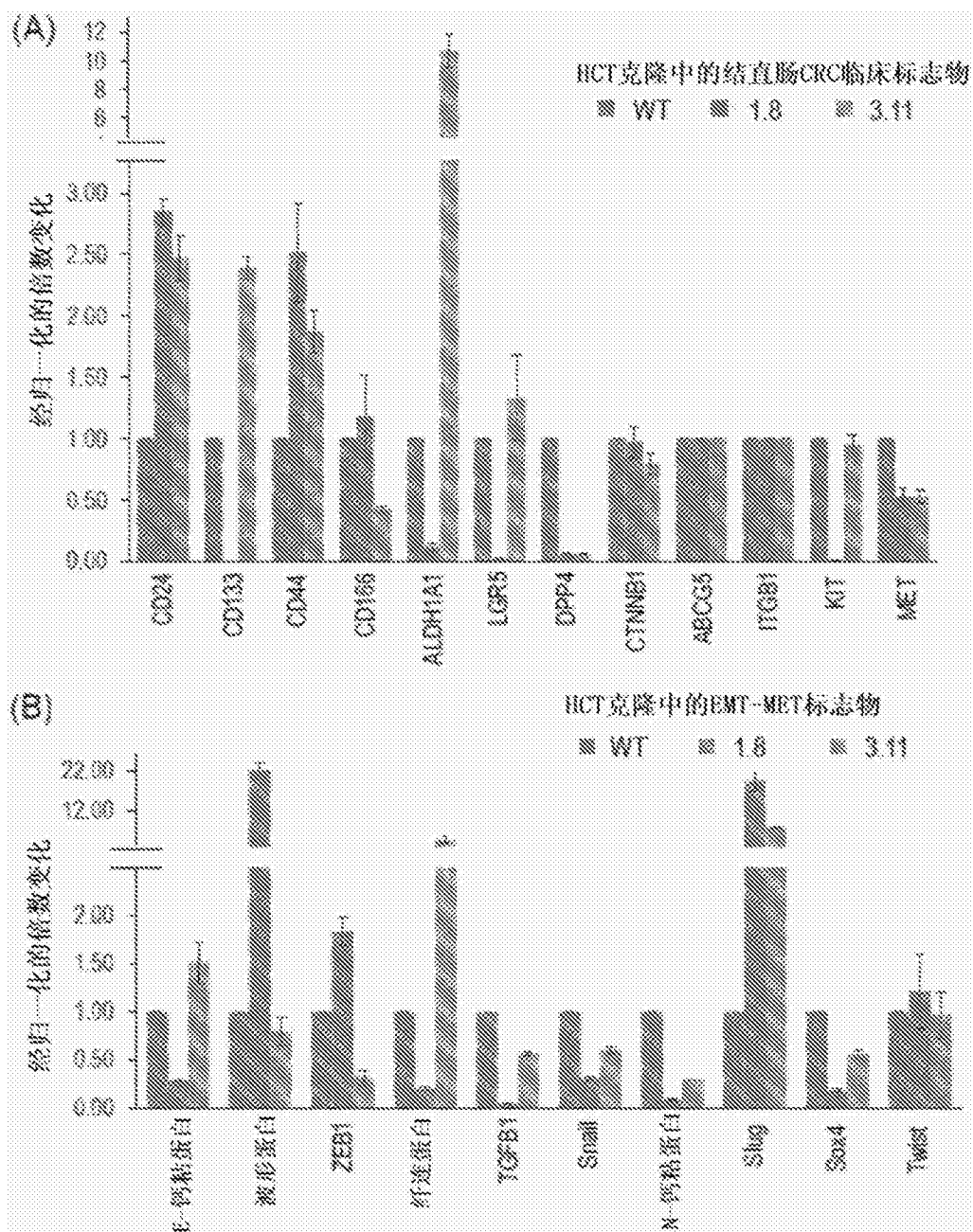


图3A-B

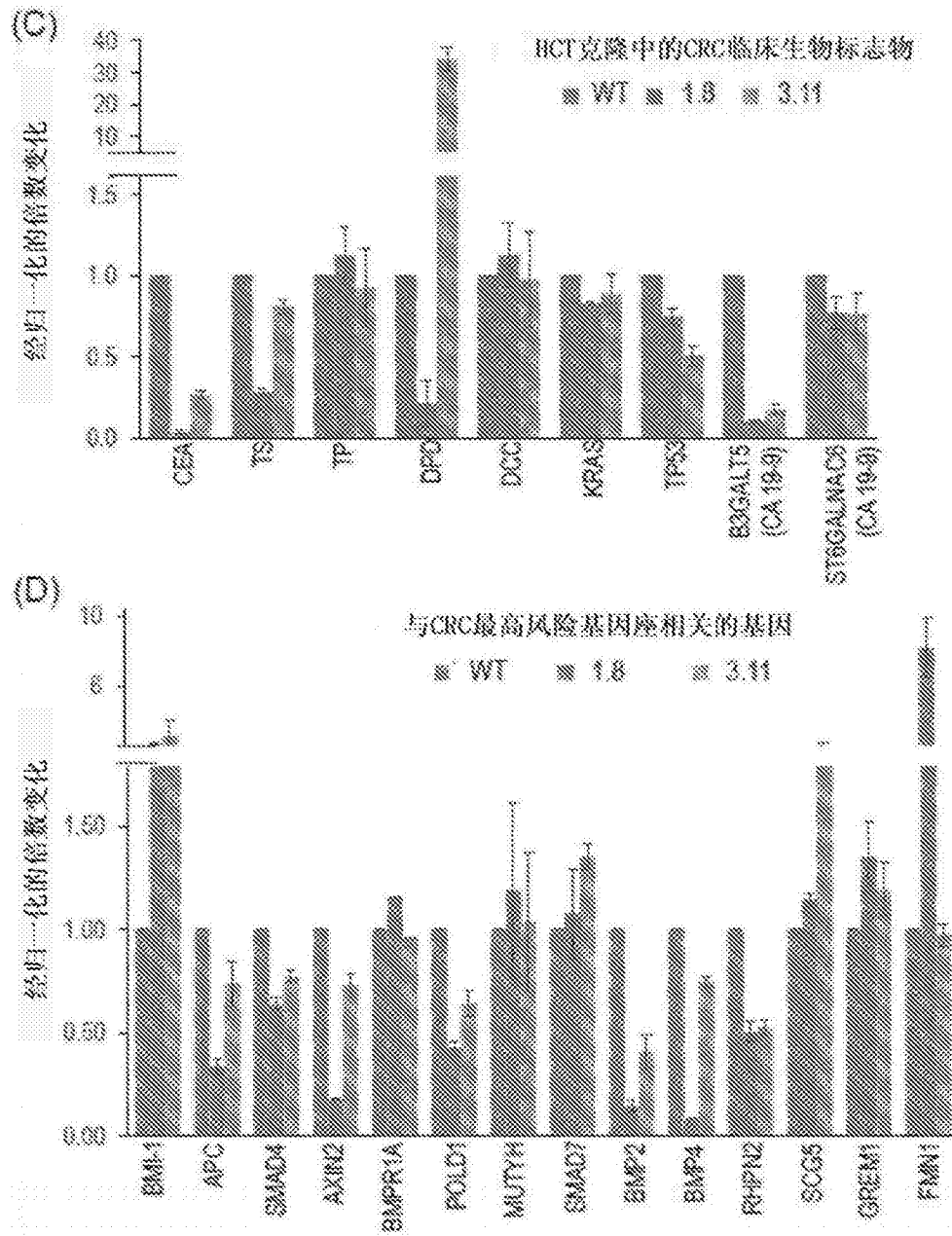


图3C-D

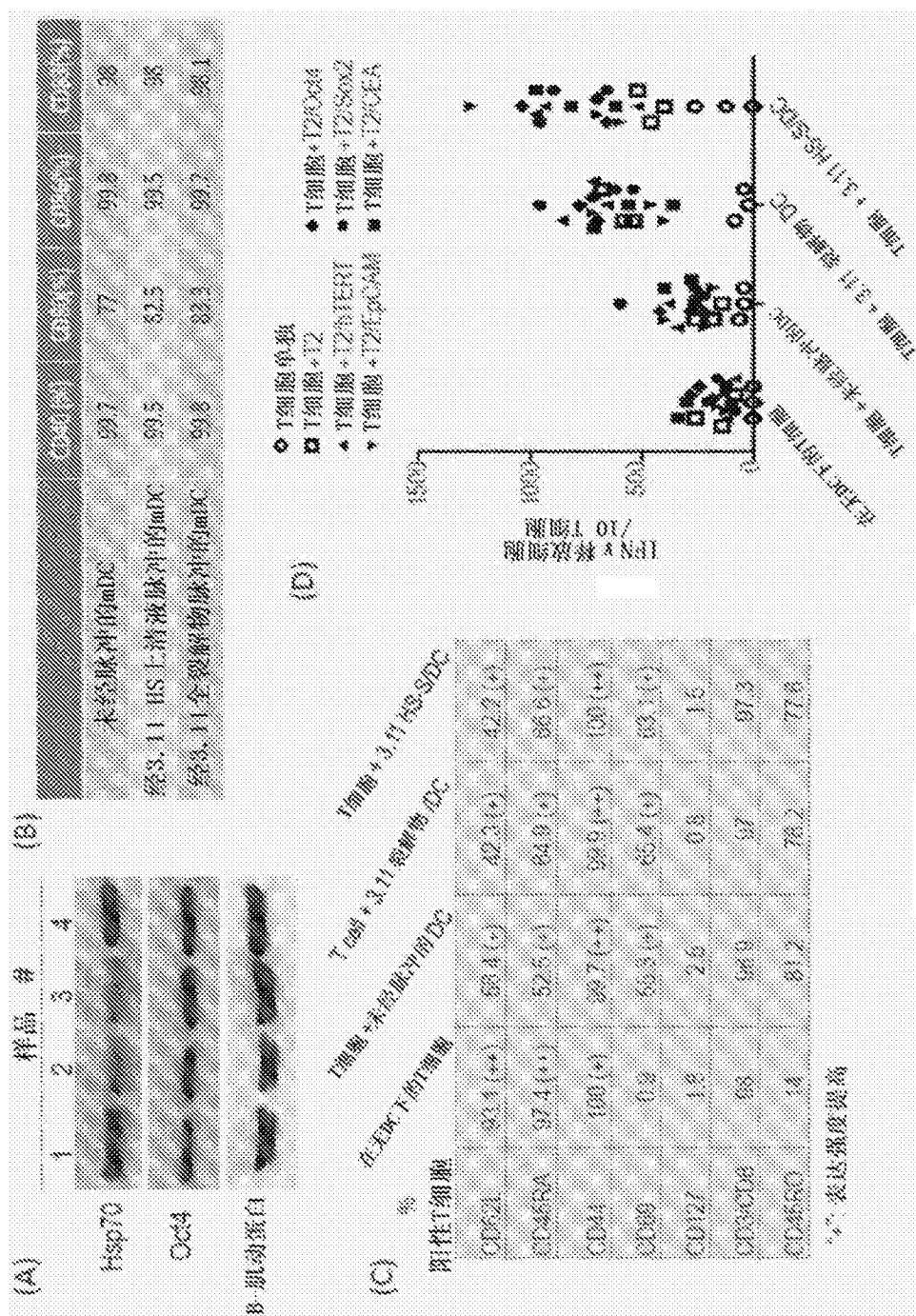


图5

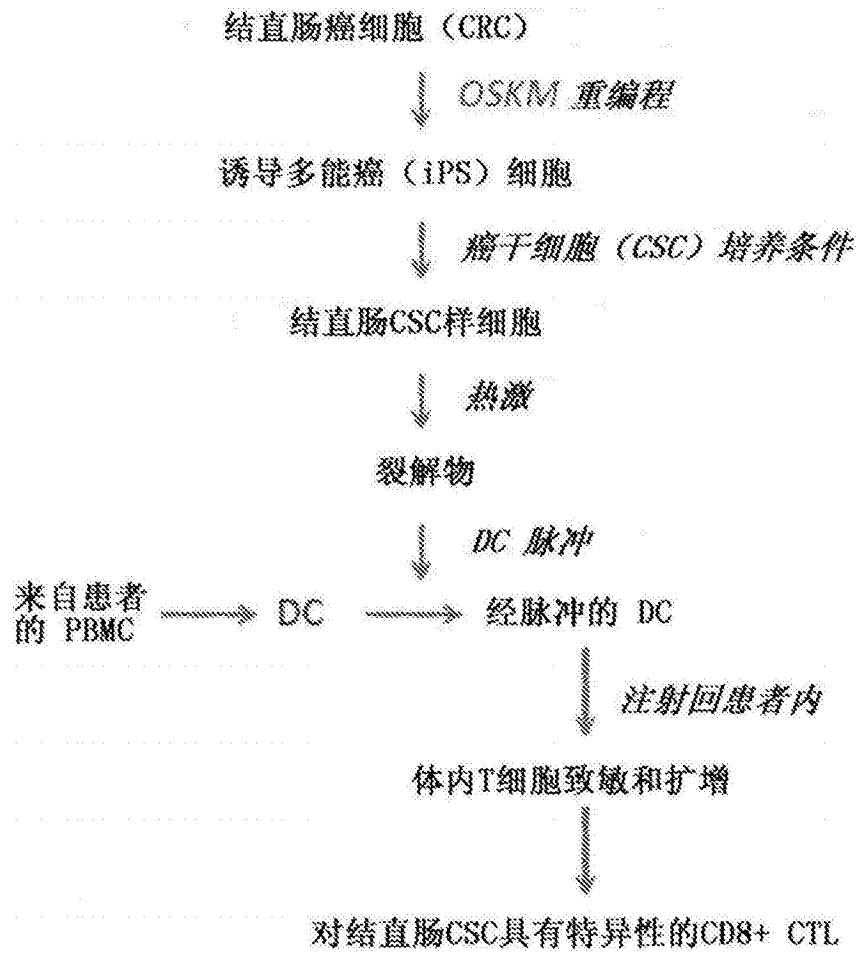


图6