



(10) 授权公告号 CN 113661238 B

(45) 授权公告日 2024.08.27

(21) 申请号 202080026711.X

(22) 申请日 2020.04.01

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113661238 A

(43) 申请公布日 2021.11.16

(30) 优先权数据
2019-070329 2019.04.02 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.09.30

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2020/014980 2020.04.01

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/204055 JA 2020.10.08

(73) 专利权人 中外制药株式会社
地址 日本国东京都

(72) 发明人 小松将大 小村健太 若原裕二

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021
专利代理师 张国梁 张莹

(51) Int.Cl.
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 104818253 A, 2015.08.05

审查员 郭茄慧

权利要求书1页 说明书13页
序列表13页 附图5页

(54) 发明名称

引入靶特异性外源基因的方法

(57) 摘要

本公开提供了可用于通过TI(靶向整合)转化动物细胞的热点。在CHO细胞基因组中LOC103164262附近发现了本公开的热点。或者,本公开涉及已将外源DNA引入到所述热点中的转化细胞,以及通过培养细胞产生由所述DNA编码的多肽的方法。

1. 一种将编码目标多肽的外源DNA引入CHO细胞的方法,其中所述方法包括将外源DNA引入CHO细胞中由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域中包含卷曲螺旋结构域的蛋白质91 (CCDC91) 基因的区域。

2. 一种生产多肽的方法,其中所述方法使用CHO细胞,在所述CHO细胞中编码目标多肽的外源DNA被引入由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域中包含卷曲螺旋结构域的蛋白质91 (CCDC91) 基因的区域。

3. 一种生产多肽的方法,包括以下步骤:

(1) 将编码目标多肽的外源DNA引入CHO细胞,其中将外源DNA引入CHO细胞基因组的由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域中包含卷曲螺旋结构域的蛋白质91 (CCDC91) 基因的区域;

(2) 培养其中引入了外源DNA的CHO细胞;和

(3) 回收目标多肽。

4. 根据权利要求3的方法,其中将编码目标多肽的外源DNA引入CHO细胞的步骤包括以下步骤(i) - (ii):

(i) 将用于通过交换反应引入外源DNA的DNA盒引入CHO细胞;和

(ii) 通过识别(i)的DNA盒作为靶位点的重组酶,将外源DNA引入由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域中包含卷曲螺旋结构域的蛋白质91 (CCDC91) 基因的区域。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述外源DNA的整合位点在CCDC91基因的第一内含子中。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述目标多肽是抗原结合分子。

7. 根据权利要求6的方法,其中所述抗原结合分子是抗体。

8. 一种分离的CHO细胞,其包含用于通过交换反应将外源DNA引入由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域中包含卷曲螺旋结构域的蛋白质91 (CCDC91) 基因的区域DNA盒。

9. 根据权利要求8的CHO细胞,其中所述DNA盒的整合位点在CCDC91基因的第一内含子中。

10. 根据权利要求8或9所述的CHO细胞,其中所述外源DNA是编码目标抗原结合分子的外源DNA。

11. 根据权利要求10所述的CHO细胞,其中所述抗原结合分子是抗体。

引入靶特异性外源基因的方法

技术领域

[0001] 本公开涉及以靶特异性方式将外源DNA引入动物细胞基因组的方法、通过使用这些方法获得的转化细胞、以及生产由外源DNA编码的多肽的方法。

背景技术

[0002] 通过基因重组技术在培养细胞中表达诸如细胞因子或抗体的多肽并大量生产该多肽的方法是众所周知的。此类多肽生产技术通常包括将编码目标多肽的多核苷酸以可表达形式引入细胞以产生转化细胞和从其培养物中回收积累的目标多肽的步骤。广泛用作待转化细胞的是微生物、昆虫、植物或动物的细胞。其中,动物细胞被广泛用作获得动物源多肽的合适的宿主细胞。通过在动物细胞中表达多肽,预期多肽的诸如糖基化和折叠的翻译后修饰将以更接近生物体中产生多肽的环境的方式发生。

[0003] 当在动物细胞中表达外源DNA时,通常用包含编码目标多肽的多核苷酸的表达载体转化动物细胞。然而,与引入基因组时不同,作为表达载体引入细胞的外源DNA通常不会复制,也不会通过细胞分裂遗传,因此难以稳定地保留其性状。因此,尽管用表达载体的转化对于在实验环境中用于瞬时表达是有用的,但它在工业生产中的应用留下了问题。

[0004] 通过将外源DNA引入动物细胞的基因组,可以稳定地保留源自表达载体的性状。这是因为引入基因组的多核苷酸极有可能通过细胞分裂进行复制并稳定保留。基于这一想法,以动物细胞为平台,以工业规模稳定生产多种生物物质成为可能。

[0005] 但是,很明显,即使将外源DNA引入基因组,也不总是能够获得高表达的转化细胞。引入基因组的外源DNA的表达水平通常根据引入的位置而不同,并不总是能够有效地选择所需的转化细胞。

[0006] 已提出定点整合(TI)作为能够解决将外源DNA引入基因组(专利文献1-3)中的问题的技术之一。在TI中,预先确认适合外源DNA引入和表达的基因组区域,并将待表达的外源DNA位点特异性整合到确认的基因组区域中。TI可以说是随着基因组位点特异性重组技术的改进而产生的一种新的基因重组技术。作为TI的结果,获得的转化细胞的外源DNA等的表达水平的可预测性提高,并且可以预期有效获得具有所需性状的转化细胞。在TI中,适合引入外源DNA的基因组区域通常被称为热点。到目前为止,已经在用作用于转化的宿主细胞的各种细胞的基因组上的广泛区域中发现了热点。此外,还报道了将TI应用于通过动物细胞生产单克隆抗体以获得可用于生产的转化细胞的尝试(专利文献4,非专利文献1-2)。

[0007] [引文列表]

[0008] [专利文献]

[0009] [专利文献1]国际公开号:WO 2008/151219

[0010] [专利文献2]国际公开号:WO 2013/190032

[0011] [专利文献3]国际公开号:WO 2016/064999

[0012] [专利文献4]国际公开号:WO 2017/184831

[0013] [非专利文献]

[0014] [非专利文献1]Biotechnol.Prog.,2015,第31卷,第6期,第1645-1656页

[0015] [非专利文献2]Methods 95(2016)第3-12页

发明内容

[0016] 技术问题

[0017] 本公开的一个目的是提供用于定点整合(TI)的新热点。

[0018] 解决方案

[0019] 本发明人持续寻找能够在动物细胞中高水平表达编码诸如抗体的多肽的外源DNA的区域。在迄今为止报道的TI转化细胞的生产中,最初的表达水平并不能一直保持很长时间,有时在培养过程中表达水平最终会下降(PLoS ONE,2017 12(6):e0179902,Biotechnology Letters,2018,第40卷,第8期,第1209-1218页)。当这种转化细胞用于生产多肽时,表达产物的生产量变得不稳定,生产效率会降低。或者,如果转化细胞无法维持工业生产水平,则需要重建生产线。本发明人怀疑培养物中多肽表达水平的降低可能取决于外源多核苷酸的基因组整合位点而发生。因此,本发明人等通过尝试寻找可以预期长期维持外源DNA表达水平的热点,成功地发现了新的热点,从而完成了本公开。

[0020] 本公开具体包括以下实施方式:

[0021] [1]一种将编码目标多肽的外源DNA引入CHO细胞的方法,该方法包括将外源DNA引入CHO细胞中由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域;

[0022] [2]根据[1]的方法,其中外源DNA的整合位点选自在由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域中包含卷曲螺旋结构域蛋白91(CCDC91)基因及其启动子区域的区域;

[0023] [3]根据[2]的方法,其中外源DNA的整合位点选自CCDC91基因区域;

[0024] [4]根据[3]的方法,其中外源DNA的整合位点在CCDC91基因的第一内含子中;

[0025] [5]根据[1]至[4]中任一项的方法,其中通过选自同源重组、重组酶介导的盒式交换(RMCE)和基因组编辑的任何方法将外源DNA位点特异性地引入基因组区域;

[0026] [6]根据[1]至[5]中任一项所述的方法,其中,目标多肽是抗原结合分子;

[0027] [7]根据[6]的方法,其中,抗原结合分子是抗体。

[0028] [8]一种生产CHO细胞或CHO细胞系的方法,其中,该方法包括将编码目标多肽的外源DNA引入CHO细胞中由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域;

[0029] [9]根据[8]的方法,其中外源DNA的整合位点选自在NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域中包含卷曲螺旋结构域蛋白91(CCDC91)基因及其启动子区域的区域;

[0030] [10]根据[9]的方法,其中,所述外源DNA的整合位点选自CCDC91基因区域;

[0031] [11]根据[10]的方法,其中外源DNA的整合位点在CCDC91基因的第一内含子中;

[0032] [12]根据[8]至[11]中任一项的方法,其中通过选自同源重组、重组酶介导的盒式交换(RMCE)和基因组编辑的任何方法将外源DNA位点特异性地引入基因组区域;

[0033] [13]根据[8]至[12]中任一项的方法,其中,目标多肽为抗原结合分子;

[0034] [14]根据[13]的方法,其中,抗原结合分子是抗体;

[0035] [15]一种生产CHO细胞或CHO细胞系的方法,其中,该方法包括将通过交换反应引入外源DNA的DNA盒引入CHO细胞中由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域;

- [0036] [16]根据[15]的方法,其中DNA盒的整合位点选自在由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域中包含卷曲螺旋结构域蛋白91(CCDC91)基因及其启动子区域的区域;
- [0037] [17]根据[16]的方法,其中DNA盒的整合位点选自CCDC91基因区域;
- [0038] [18]根据[17]的方法,其中DNA盒的整合位点在CCDC91基因的第一内含子中;
- [0039] [19]根据[15]至[18]中任一项的方法,其中,外源DNA是编码目标抗原结合分子的外源DNA;
- [0040] [20]根据[19]的方法,其中,抗原结合分子是抗体;
- [0041] [21]一种分离的CHO细胞,其包含引入由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域中的编码目标多肽的外源DNA;
- [0042] [22]根据[21]的CHO细胞,其中外源DNA的整合位点选自在由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域中包含卷曲螺旋结构域蛋白91(CCDC91)基因及其启动子区域的区域;
- [0043] [23]根据[22]的CHO细胞,其中外源DNA的整合位点选自CCDC91基因区域;
- [0044] [24]根据[23]的CHO细胞,其中外源DNA的整合位点在CCDC91基因的第一内含子中;
- [0045] [25]根据[21]至[24]中任一项的方法,其中通过选自同源重组、重组酶介导的盒式交换(RMCE)和基因组编辑的任何方法将外源DNA位点特异性地引入基因组区域;
- [0046] [26]根据[21]至[25]中任一项所述的CHO细胞,其中,目标多肽为抗原结合分子;
- [0047] [27]根据[26]的CHO细胞,其中,抗原结合分子是抗体;
- [0048] [28]一种分离的CHO细胞,其包含用于通过交换反应将外源DNA引入由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域的DNA盒;
- [0049] [29]根据[28]的CHO细胞,其中所述DNA盒的整合位点选自在由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域中包含卷曲螺旋结构域蛋白91(CCDC91)基因及其启动子区域的区域;
- [0050] [30]根据[29]的CHO细胞,其中DNA盒的整合位点选自CCDC91基因区域;
- [0051] [31]根据[30]的CHO细胞,其中DNA盒的整合位点在CCDC91基因的第一内含子中;
- [0052] [32]根据[28]至[31]中任一项的CHO细胞,其中,外源DNA是编码目标抗原结合分子的外源DNA;
- [0053] [33]根据[32]的CHO细胞,其中,抗原结合分子是抗体;
- [0054] [34]一种生产多肽的方法,其中,该方法使用其中将编码目标多肽的外源DNA引入由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域的CHO细胞;
- [0055] [35]根据[34]的方法,其中外源DNA的整合位点选自在由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域中包含卷曲螺旋结构域蛋白91(CCDC91)基因及其启动子区域的区域;
- [0056] [36]根据[35]的方法,其中外源DNA的整合位点选自CCDC91基因区域;
- [0057] [37]根据[36]的方法,其中外源DNA的整合位点在CCDC91基因的第一内含子中;
- [0058] [38]根据[37]的方法,其中通过选自同源重组、重组酶介导的盒式交换(RMCE)和基因组编辑的任何方法将外源DNA位点特异性地引入基因组区域中;

- [0059] [39]根据[34]至[38]中任一项的方法,其中,目标多肽为抗原结合分子;
- [0060] [40]根据[39]的方法,其中,抗原结合分子是抗体;
- [0061] [41]一种生产多肽的方法,包括以下步骤:
- [0062] (1)将编码目标多肽的外源DNA引入CHO细胞,其中将外源DNA引入CHO细胞基因组中由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域;
- [0063] (2)培养引入了外源DNA的CHO细胞;和
- [0064] (3)回收目标多肽;
- [0065] [42]根据[41]的方法,其中外源DNA的整合位点选自在由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域中包含卷曲螺旋结构域蛋白91 (CCDC91) 基因及其启动子区域的区域;
- [0066] [43]根据[42]的方法,其中外源DNA的整合位点选自CCDC91基因区域;
- [0067] [44]根据[43]的方法,其中外源DNA的整合位点在CCDC91基因的第一内含子中;
- [0068] [45]根据[41]的方法,其中将编码目标多肽的外源DNA引入CHO细胞的步骤包括以下步骤(i) - (ii):
- [0069] (i)将用于通过交换反应引入外源DNA的DNA盒引入CHO细胞;和
- [0070] (ii)通过将(i)的DNA盒识别为靶位点的重组酶,将外源DNA引入由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域;
- [0071] [46]根据[41]至[45]中任一项的方法,其中,目标多肽为抗原结合分子;和
- [0072] [47]根据[46]的方法,其中,抗原结合分子是抗体。
- [0073] 技术效果
- [0074] 通过本公开,发现了一个适合获得通过TI转化的动物细胞的热点。在一个优选的实施方式中,本公开提供的热点可以长期稳定地维持引入其区域的外源DNA编码的多肽的表达水平。

附图说明

[0075] 图1示出了用于寻找热点的着陆架图谱。已经整合了编码二氢叶酸还原酶 (DHFR) 和绿色荧光蛋白 (GFP) 的基因,二氢叶酸还原酶 (DHFR) 是转化细胞的选择标记,绿色荧光蛋白 (GFP) 是筛选高表达细胞的标记。在这两个基因的两端插入重组酶Cre的识别序列 (loxP1 和loxP2),形成一个DNA盒。

[0076] 图2示出了用于与整合到基因组中的着陆架DNA盒进行盒交换反应的重组质粒的图谱。重组酶识别序列loxP排列在编码选择标记DHFR、轻链(L)和重链(H)的基因的两端,形成DNA盒。

[0077] 图3示出了TI后建立的表达抗体的细胞克隆的两周生产培养的结果。横轴表示建立的抗体产生细胞克隆的名称,纵轴表示每升培养液的抗体产量水平 (mg/L)。

[0078] 图4示出了抗体产生细胞克隆TI-L和TI-J冻融后抗体产量随时间的变化。横轴表示冻存细胞解冻后的时间(天),纵轴表示每升培养液的抗体产量水平 (mg/L)。

[0079] 图5示出了将不同抗体的基因整合到图2的重组质粒中制备的其他抗体产生细胞克隆的抗体产量水平。横轴表示产生的抗体的名称,纵轴表示每升培养液的抗体产量水平 (mg/L)。

[0080] 图6示意性地示出了在具有最高抗体产量水平的抗体产生细胞克隆的亲代细胞TI-L(用交换盒取代着陆架之前的转化细胞)基因组上引入着陆架的位置。图中,“整合位点”指示的部分为本公开确认的着陆架的整合位点。整合位点位于CCDC91基因(5'端)下游6651bp和内含子1上游(5'端)下游6454bp。“整合位点”上游(基因组序列中的5'侧)5kb核苷酸序列和下游5kb核苷酸序列(基因组序列的3'侧)分别示于SEQ ID NO:1和2。

具体实施方式

[0081] 以下,将更详细地描述用于实施本发明的实施方式。

[0082] 提供以下定义和详细描述以促进对本文解释的本公开的理解。

[0083] 在本说明书中,“抗原结合分子”仅限于与目标抗原的结合。抗原结合分子可以是具有任何结构的结构域,只要所使用的结构域与目标抗原结合即可。这种结构域的例子包括但不限于抗体重链可变区(VH),抗体轻链可变区(VL),单域抗体(sdAb),包含在体内细胞膜蛋白avimer中大约35个氨基酸的称为A结构域的组件(WO2004/04401和WO2005/040229),含有作为来源于在细胞膜上表达的糖蛋白纤连蛋白的蛋白质结合结构域的10Fn3结构域的adnectin(WO2002/032925),含有构成三螺旋束(其由蛋白A的58个氨基酸组成)的IgG结合域支架的Affibody(WO1995/001937),DARPin(设计的锚蛋白重复蛋白),其为锚蛋白重复(AR)的分子表面暴露区域,每个锚蛋白重复具有折叠成一个转角的亚基的33个氨基酸残基结构、两个反平行螺旋和一个环(WO2002/020565),具有四个环区域的anticalin,所述四个环区域连接向在脂质运载蛋白分子(例如中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL))中高度保守的桶状结构一端中的中心轴弯曲的8条反平行链(WO2003/029462),以及马蹄形折叠的内部平行片状结构中的凹陷区域,所述马蹄形折叠由无免疫球蛋白结构的可变淋巴细胞受体(VLR)的重复的富含亮氨酸重复单位(LRR)组件组成,如在诸如七鳃鳗或盲鳗的无颌脊椎动物的获得性免疫系统中观察到的(WO2008/016854)。

[0084] 本发明的抗原结合分子的优选示例包括可以通过仅由抗原结合结构域构成的分子发挥抗原结合功能的抗原结合分子,以及可以在从与其相连的附加肽释放后自身发挥抗原结合功能的抗原结合分子。这种抗原结合分子的示例包括但不限于单域抗体、scFv、Fv、Fab、Fab'和F(ab')₂。

[0085] 本发明的抗原结合分子的一个优选示例包括分子量为60kDa或更小的抗原结合分子。这种抗原结合分子的示例包括但不限于单域抗体、scFv、Fab和Fab'。分子量为60kDa或更小的抗原结合分子在血液中作为单体存在时,通常容易被肾脏清除(参见J Biol Chem. 1988年10月15日;263(29):15064--70)。

[0086] 抗体

[0087] 本文中的术语“抗体”以最广泛的含义使用并涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所需的抗原-结合活性。

[0088] 抗体片段

[0089] “抗体片段”是指除完整抗体之外的分子,其包含完整抗体的一部分,该部分结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的示例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如,scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。因此,抗

体和抗体片段是抗原结合分子的代表性示例。

[0090] Fc区

[0091] 术语“Fc区”在本文中用于定义包含至少一部分恒定区的免疫球蛋白重链的C端区。该术语包括天然序列Fc区和突变Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或Pro230延伸至重链的羧基末端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)或甘氨酸-赖氨酸(残基446-447)可能存在,也可能不存在。除非本文另有说明,Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991所述。

[0092] 核酸/多核苷酸

[0093] “分离的”核酸/多核苷酸是指已与其自然环境的成分分离的核酸/多核苷酸分子。分离的核酸/多核苷酸包括包含在通常含有核酸/多核苷酸分子的细胞中的核酸/多核苷酸分子,但该核酸/多核苷酸分子存在于染色体外或存在于与其天然染色体位置不同的染色体位置。在本公开中,当核酸/多核苷酸从宿主细胞(内源的)以外的环境中获得时,该核酸/多核苷酸对于宿主细胞来说是外源的,无论该核酸/多核苷酸是人工构建的还是天然存在的。因此,例如,当核酸/多核苷酸含有cDNA时,该核酸/多核苷酸对于宿主细胞通常是外源的。

[0094] 当本公开的外源核酸/多核苷酸含有DNA时,其特别描述为“外源DNA”。如果外源DNA保留了所需的遗传信息,它也可以含有DNA以外的成分。例如,与DNA以外的成分(诸如构成病毒颗粒的蛋白质或脂质体)复合的DNA也是外源DNA。在本公开中,宿主细胞为中国仓鼠(*Cricetulus griseus*,日文名为Mongol Kinuge Nezumi)细胞。因此,可以将含有通常不包含在其基因组中的核苷酸序列信息的DNA称为“外源DNA”。

[0095] 可以获得中国仓鼠基因组的核苷酸序列信息,例如作为GenBank参考序列。如果给定DNA的核苷酸序列信息中含有与参考序列不匹配,甚至部分不匹配的核苷酸序列,则可以将其理解为外源DNA。例如,含有中国仓鼠自身遗传信息的DNA,其中一部分被改造为来自另一物种的遗传信息或人工信息,则包含在外源DNA中。因此,大部分外源DNA 通过包含人工构建的核苷酸序列信息而变成外源DNA。当给定的DNA 编码一个氨基酸序列,并且即使在DNA的核苷酸序列被修改后仍保持原始氨基酸序列信息时,它就是人工构建的DNA。或者,从中国仓鼠基因中去除了包含在基因组序列中的内含子的DNA(例如cDNA)通常也是外源的。

[0096] 载体

[0097] 如本文所用,术语“载体”是指能够传播与其连接的另一种核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体,以及整合到其已被引入的宿主细胞基因组中的载体。某些载体可以指导与它们有效连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0098] 宿主细胞

[0099] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,是指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,包括原代转化细胞和由其衍生的后代,不考虑传代次数。后代在核酸含量上可能与亲本细胞不完全相同,但可能包含突变。与在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变后代包括在本文中。

[0100] 在某一实施方式中,本公开提供了一种将编码目标多肽的外源DNA引入CHO细胞的方法,其中该方法包括将外源DNA位点特异性地引入CHO细胞基因组中由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域。

[0101] CHO细胞(中国仓鼠卵巢细胞)是由中国仓鼠的卵巢建立的成纤维细胞系的总称。CHO细胞具有优良的增殖能力,可以通过粘附培养或悬浮培养在人工培养基中培养。以CHO细胞为宿主,通过基因重组产生多种多肽。例如,缺少DHFR基因的dhfr-CHO(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1980)77,4216-4220)和CHO-K1(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1968)60,1275)在基因重组技术中被广泛用作宿主细胞。这些CHO细胞的突变系也包括在本公开的CHO细胞中。此外,作为源自CHO细胞的细胞,CHO-DG44和CHO-DXB11系被用作宿主细胞。这些已知的源自CHO细胞的细胞系也包括在本公开的CHO细胞中。

[0102] 构成本公开的CHO细胞可以从细胞库(如ATCC)或作为商业分发和可获得的细胞系获得。当CHO细胞理论上由从单个细胞建立的一组细胞组成时,它特别被称为“CHO细胞系”。在本公开中,除非另有说明,否则“CHO细胞”可以是CHO细胞系。

[0103] 在本公开中,确认为热点的基因组区域由CHO细胞基因组中的NCBI登录号NW_003614838.1指定。NW_003614838.1是全基因组鸟枪测序法揭示的CHO细胞基因组核苷酸序列,由约465.6kbp组成。因此,在本公开中,引入外源DNA的区域可以是大约465.6kbp内的任何位置。

[0104] 在核苷酸序列中,本公开优选的整合位点包括例如由LOC103164262(含卷曲螺旋结构域蛋白91;CCDC91)基因及其启动子上存在的序列指定的区域。在某个实施方式中,该区域由包含该基因及其启动子区域的大约159.4kbp组成。或者,在另一个实施方式中,也优选在该区域不包含启动子的约121.3kbp的核苷酸序列作为外源DNA的整合位点。例如,在构成CCDC91基因的核苷酸序列中,包括第一内含子上游和下游10kbp在内的约20kbp范围,或包括第一内含子上游和下游5kbp在内的约10kbp范围在本公开中作为引入外源DNA的区域是优选的。例如,第一内含子上游和下游5kbp的核苷酸序列分别显示在SEQ ID NO:1和2中。因此,每个SEQ ID NO与整合位点之间的关系可以如下示出,例如:

[0105] 5'-(SEQ ID NO:1)-[整合位点(即热点)]-(SEQ ID NO:2)-3'

[0106] 这里,当构成CCDC91基因的核苷酸序列被定位(map)到基因组的核苷酸序列上时,从基因组序列来看,它位于反向互补序列(即,反义序列)中。因此,在CCDC91基因的核苷酸序列中,第一内含子被定位在包括SEQ ID NO:2的5'端的区域(SEQ ID NO:2中的1-6454位)到包括SEQ ID NO:1的3'端的区域(SEQ ID NO:1中的3190-5040位)。其中均连接的第一内含子的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示。因此,在本公开的一个优选实施方式中,外源DNA的位点特异性整合位点可以选自CHO细胞基因组上SEQ ID NO:3的核苷酸序列(反向互补序列)指定的区域。

[0107] 在本公开中,由某个核苷酸序列指定的区域包括多个核苷酸序列同源的情况。即,即使靶核苷酸序列X包含一些突变或修饰,如果它作为整体与核苷酸序列A同源,则它是“核苷酸序列A指定的区域”。当多个核苷酸序列同源时,它们通常可以比对。通过比对不同的核苷酸序列A和核苷酸序列X,可以在核苷酸序列X上指定对应于核苷酸序列A中特定位置的位置。用于比对多个核苷酸序列的算法是已知的。例如,BLASTN是用于比对核苷酸序列的常用工具之一。根据这些已知算法可认为与NCBI登录号NW_003614838.1、CCDC91基因及其启动

子、第一内含子等同源的核苷酸序列对应于本公开中的“每个核苷酸序列指定的区域”。

[0108] 如上所述,已知有几种细胞系具有不同的特性,例如CHO细胞中的耐药性和营养需求。如果这些特性的差异是由基因组的核苷酸序列信息的突变或修饰引起的,即使它们发生在本公开指定的区域,如果这些区域可以被确认,它们就是“每个核苷酸序列指定的区域”。基因组核苷酸序列信息的突变和修饰包括核苷酸序列信息的添加、缺失、插入和取代。或者,可以容忍不伴随明显的细胞性状变化(例如多态性)的核苷酸序列信息的变化。此外,如果保留核苷酸序列信息,DNA之间表观遗传修饰状态的差异,例如DNA甲基化,也是可以容忍的。

[0109] 在本公开中,可以通过已知的同源重组技术或基因组编辑技术将外源DNA位点特异性地引入上述区域。“位点特异性”是指在构成基因组的核苷酸序列中选择由某个核苷酸序列指定的位置作为引入位置,并使用该位置作为靶标引入目标DNA。因此,“位点特异性”也可以表示为“靶向”。在本公开中,将核酸/多核苷酸引入基因组可以通过在靶位点插入DNA或用待引入的DNA替换基因组的一部分来实现。

[0110] 例如,以下方法被称为用于通过TI掺入外源DNA的方法:

[0111] 同源重组,

[0112] RMCE(重组酶介导的盒式交换),和

[0113] 基因编辑。

[0114] 同源重组是一种利用细胞原有的DNA修复机制的方法。将具有与基因组上的靶位置同源的核苷酸序列的外源DNA引入细胞以用外源DNA替换存在于靶位置的DNA。在同源重组中,效率一般很低(约 10^{-5} 至 10^{-7} %),因为没有人为使用特异性识别核苷酸序列的特殊酶。

[0115] RMCE是本发明的实施例中使用的方法,是使用重组酶及其识别的核苷酸序列的基因转移方法。通过预先将重组酶的识别核苷酸序列引入基因组上的靶位置,并将类似具有识别核苷酸序列的外源DNA引入细胞,将存在于靶位置的DNA和外源DNA置换。典型的重组酶/识别序列组合是“Cre/loxP”和“FLP/FRT”,但还有其他几种。

[0116] 基因编辑(基因组编辑)是一种基因转移方法,其利用可以靶向并切割基因组上的一个靶位置的基因组编辑技术。将设计用于靶向基因组上靶位置的酶引入细胞,并切割目标位置以促进细胞中的DNA修复。此时,通过与酶一起引入外源DNA,外源DNA很容易连接到切割位点。CRISPR/Cas、TALEN和ZFN是基因组编辑技术中使用的代表性酶。例如,具有代表性的基因组编辑工具CRISPR-Cas9识别与引导RNA互补的核苷酸序列并切割双链DNA(即基因组DNA)。如果共引入供体载体,则在修复切割的双链DNA的过程中,可以将载体上加载的外源DNA引入双链DNA中。

[0117] 因此,通过使用与上述整合位点的核苷酸序列相对应的引导RNA,可以使用CRISPR-Cas9以位点特异性方式引入外源DNA。

[0118] 在本公开中,外源DNA的整合位点由NCBI登录号NW_003614838.1指定。此外,在确认整合位点时,如已经描述的,可以从与由NCBI登录号NW_003614838.1所指定的核苷酸序列同源的核苷酸序列中确认整合位点。此处,当设计用于将外源DNA引入上述同源核苷酸序列的引导RNA时,可以预先确认计划引入DNA的CHO细胞的基因组的核苷酸序列。通过不仅考虑参考序列,而且考虑计划实际引入的特定CHO细胞的基因组核苷酸序列,更特定的核苷酸

序列设计成为可能。

[0119] 在本公开的某个实施方式中,供体载体除了要引入的外源DNA之外还可以包括任何元件,例如选择标记。选择标记包括抗生素抗性基因和代谢选择标记。通过将基因组编辑的CHO细胞置于适合选择标记的培养条件下,可以选择性地维持和增殖已将加载在供体载体上的外源DNA以可表达状态引入基因组的细胞。通过上述步骤选择性维持的细胞群构成了在CHO细胞基因组的相同位置引入了共同的外源DNA的细胞群。或者,如果比较所得细胞群中外源DNA的表达水平,并筛选和克隆超过所需表达水平的转化细胞,也可以将已将外源DNA整合到本公开中确认的热点中的转化细胞建立为细胞系。本公开提供的引入外源DNA的方法可用于生产CHO细胞或CHO细胞系。

[0120] 换言之,本公开提供了一种用于产生CHO细胞或CHO细胞系的方法,其中该方法包括将编码目标多肽的外源DNA选择性地引入到由NCBI登录号NW_003614838.1确认的CHO细胞基因组中的区域中。本公开的方法还可另外包括确定引入的外源DNA的表达水平并比较确定的表达水平。比较表达水平后,通过选择和克隆具有高表达水平的细胞,可以获得更理想的转化细胞。可以对所有转化细胞中外源DNA的表达水平进行排序,可以选择包括在例如前20%、或10%、优选8%或更优选5%中的转化细胞作为理想的转化细胞。

[0121] 当编码产生信号的多肽的DNA用作外源DNA时,可以通过以信号强度为指标比较表达水平来筛选转化细胞。产生信号的多肽包括绿色荧光蛋白(GFP)及其衍生物。或者,选择标记可用作外源DNA。使用选择标记时,可以在适合该标记的培养条件下培养CHO细胞,也可以选择在本发明确认的热点中引入了外源DNA的CHO细胞。也可以连接整合到来供体载体的基因组中的编码选择标记、产生信号的多肽等的核酸/多核苷酸以形成DNA盒。

[0122] 在本公开中,“着陆架”是包含上述“DNA盒”的DNA,并且与“DNA盒”同义,因为它将外源DNA引入到基因组中。

[0123] 根据本公开在将供体载体DNA盒引入基因组热点时,还可以向DNA盒中额外加入重组酶的识别序列。Cre重组酶和FLP重组酶被称为重组酶。这些重组酶识别它们各自的识别序列,loxP和FRT。因此,通过将 these 识别序列添加到DNA盒的两端,由DNA盒引入的外源核酸/多核苷酸可以通过重组反应容易且选择性地替换为另一种DNA。用不同的DNA盒重组(置换)一旦引入基因组的外源DNA称为交换反应。参与交换反应的重组酶选择性识别的核苷酸序列可称为重组靶向序列。

[0124] 一旦建立,通过用编码任意外源多肽的DNA置换掺入热点的外源DNA,根据本公开的转化细胞可以表达任意多肽。此外,在已将DNA盒引入热点并且可以高水平表达外源DNA的转化细胞中,即使在将DNA盒中的外源DNA置换为另一种外源DNA后,也可以预期相当于置换之前的外源DNA的高表达水平。因此,根据本公开建立的转化细胞可用作亲本细胞(主细胞),因为它们可用于任意多肽的生产。即,本公开提供了一种用于生产CHO细胞或CHO细胞系的方法,其中该方法包括插入用于通过交换反应将外源DNA引入由CHO细胞的NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域的DNA盒。

[0125] 本公开还涉及分离的CHO细胞,其包含由引入基因组的NCBI登录号NW_003614838.1指定的区域的外源DNA。在一个优选的实施方式中,本公开的CHO细胞可以包括用于使用外源DNA引入任意DNA的重组靶向位点。即,本公开涉及分离的CHO细胞,其包含用于通过交换反应将外源DNA引入由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域的DNA盒。

外源DNA掺入CHO细胞保留的基因组中的特定区域可以验证,例如,通过使用包含对构成该区域的核苷酸序列具有特异性的核苷酸序列的引物扩增作为模板的基因组DNA。如果扩增的结果可以确认具有所需的核苷酸序列长度的产物,则可以知道CHO细胞具有整合到靶区域中的外源DNA。

[0126] 在本公开中,“分离的”是指从其自然环境的至少一些组分中分离的细胞或细胞群,例如基本上均质的细胞群。“基本上均质”是指细胞群中具有本公开特征的细胞数量的频率为1/20或更高,优选为1/10或更高,更优选为1/5或更高,再更优选为1/3或更高,甚至更优选1/2或更高,最优选1/1。此处,具有本公开特征的细胞通常定义为包含引入由基因组的NCBI登录号NW_003614838.1确认的区域的外源DNA。

[0127] 然后将作为DNA盒掺入热点的外源DNA 替换为编码任意多肽的DNA,以产生任意多肽。在本公开中,用于生产的多肽是任选的。例如,通过培养CHO细胞常规产生的各种多肽可以应用于本公开。因此,本公开在某个实施方式中提供了使用CHO细胞产生多肽的方法,在该CHO细胞中编码目标多肽的外源DNA已被引入由NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域。在本公开中,多肽的生产方法可以优选包括以下步骤:

[0128] (1) 将编码目标多肽的外源DNA引入CHO细胞,其中外源DNA位点特异性地引入由CHO细胞基因组的NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域;

[0129] (2) 培养在(1)中引入了外源DNA的CHO细胞;和

[0130] (3) 回收目标多肽。

[0131] 在本公开中,位点特异性引入CHO细胞基因组的NCBI登录号NW_003614838.1指定的基因组区域的步骤是基于基因组的核苷酸序列特异性重组反应。在一个优选的实施方式中,核苷酸序列特异性重组反应是指将外源目标DNA位点特异性引入选自基因组核苷酸序列的靶位点。在本公开中,将外源DNA位点特异性引入基因组包括将外源DNA插入基因组。或者,可以通过用外源DNA置换构成基因组的核苷酸序列的一部分,将目标DNA引入靶位置。

[0132] 在本公开中,一旦位点特异性引入的外源DNA可以进一步被另一种DNA置换。在热点中引入了用于置换的重组酶识别序列的细胞作为本公开的亲本细胞(主细胞)是有用的。

[0133] 外源DNA的整合位点和定向可以通过分析亲本细胞(主细胞)或基因组中外源DNA被编码用于生产多肽的外源DNA取代的转化细胞的基因组核苷酸序列,并根据需要与原始基因组序列进行核对来确认。例如,当使用对构成被选为靶(整合位点)的基因组区域的核苷酸序列具有特异性的引物通过PCR扩增基因组DNA时,可以选择性地扩增外源核酸/多核苷酸并检测其存在。或者,可以确定扩增产物的核苷酸序列以确认外源目标核酸/多核苷酸的引入。

[0134] 亲本细胞(主细胞)或基因组中的外源DNA已被编码用于生产的多肽的外源DNA取代的转化细胞,可以在扩增培养后分成小部分并冷冻保存。此外,还可以评估冻存后解冻的转化细胞的外源DNA的表达水平及其稳定性,以进一步筛选出有利于生产的转化细胞。或者,根据本公开获得的转化细胞可以适应生产多肽的条件以获得有利于生产的细胞。

[0135] 可应用于本公开的生产方法的多肽的示例包括细胞因子、肽激素、生长因子、它们的受体、以抗体为代表的抗原结合分子、酶等。根据需要,可以通过将编码全长或片段的多核苷酸引入基因组来表达这些多肽。或者,它们可以与任意多肽融合。它们也可以表示为部分修饰的分子,或多个片段被人工连接的分子。

[0136] 引入了编码目标多肽的外源DNA的CHO细胞可以在适合CHO细胞的条件下培养。例如,在市售的基础培养基(用于培养动物细胞的基础培养基)中培养的条件是众所周知的。例如,已知DMEM、MEM、RPMI 1640、IMDM、F10培养基、F12培养基等作为动物细胞的培养液。也可以在培养基中加入动物血清,或在可能的情况下也可以采用无血清培养。关于特定的CHO细胞培养条件,培养通常在气相中CO₂浓度为0-40%,优选2-10%,在30-39°C,优选37°C左右的大气下进行1-14天。或者,如果目标多肽的生产继续,则培养可以持续更长时间。在培养期间,根据需要,可以将部分或全部培养基更换为新培养基以恢复培养基。

[0137] 可以使用作为用于培养动物细胞的各种培养装置,例如发酵罐式罐培养装置、气升式培养装置、培养瓶式培养装置、转瓶式培养装置、微载体型培养装置、流化床型培养装置、中空纤维型培养装置、滚瓶型培养装置、填充槽型培养装置等进行培养。

[0138] 如果目标多肽分泌到培养物中,则可以通过回收培养物上清液来回收多肽。多肽可以被纯化成基本上纯的和均质的状态。多肽的分离和纯化可以通过应用在常规纯化步骤中使用的分离/纯化方法来完成。例如,柱色谱、过滤、超滤、盐析、溶剂沉淀、溶剂萃取、蒸馏、免疫沉淀、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、透析、重结晶等适当地选择和组合以适当地分离和纯化抗体。色谱包括亲和色谱、离子交换色谱、疏水色谱、凝胶过滤色谱、反相色谱、吸附色谱等。这些色谱使用液相色谱进行,例如HPLC和FPLC。含有Fc结构域的多肽,例如抗体,也可以通过亲和色谱,例如蛋白A柱或蛋白G柱来纯化。蛋白A柱的示例包括Hyper D、POROS、Sepharose F.F. (Pharmacia制造)等。

[0139] 实施例

[0140] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。应当理解,鉴于上面提供的一般描述,可以实践各种其他实施方式。

[0141] 尽管为了清楚理解的目的已经通过说明和示例的方式对上述发明进行了一些详细的描述,但是这些描述和示例不应被解释为限制本发明的范围。在此引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用明确地整体并入。

[0142] [实施例1]着陆架(Landing Pad)质粒的制备

[0143] 创建了一个含有DNA盒的“着陆架”,该DNA盒在盒交换反应期间用作引入目标基因的靶位置,并将其整合到质粒中(图1)。该着陆架质粒携带绿色荧光蛋白(GFP)基因作为标记基因,用于鉴定CHO细胞基因组上的基因高表达区域。在引入着陆架质粒后,它还具有二氢叶酸还原酶(DHFR)基因作为选择标记。被重组酶Cre识别的DNA序列(1oxP1和1oxP2)插入DHFR基因和GFP基因这两个基因的两端。存在于这两个1oxP之间的DHFR基因和GFP基因在盒交换反应过程中被去除,并替换为编码负载在重组质粒上的待生产多肽的基因。在以下实施例中,通过用抗体基因置换来尝试产生抗体。

[0144] [实施例2]重组质粒的制备

[0145] 制备了一个“重组质粒”,用于与插入到CHO细胞基因组上的着陆架的DNA盒进行盒交换反应(图2)。重组质粒携带DHFR基因和由重链和轻链组成的抗体基因,在这些基因的两端插入1oxP。作为评价抗体,使用一种类型的IgG1抗体(mAb-A)和两种类型的IgG2抗体(mAb-B、C)。每种抗体识别不同的抗原如下:

[0146] mAb-A:GYM329/抗-潜在肌肉生长抑制素(myostatin)抗体/IgG1;

[0147] mAb-B:CIM331/抗-IL-31受体抗体/IgG2(WO 2010/064697);

[0148] mAb-C:SA237/抗-IL-6受体抗体/IgG2(WO 2016/027859)。

[0149] 虽然图2使用了携带由一组重链/轻链组成的抗体基因的重组质粒,但重组质粒的构型可以根据待表达抗体的类型进行适当修改,例如在双特异性抗体的情况下负载由两组重链/轻链组成的抗体基因。

[0150] [实施例3]用于定点整合(TI)的宿主细胞的制备

[0151] 使用LONZA的Nucleofector 2b(Nucleofector是Lonza Cologne GmbH的注册商标)将着陆架质粒转染到宿主细胞(CHO-DXB11)中。用于转染的着陆架质粒用限制酶EcoRV和SalI线性化。转染后四小时,将培养基更换为不含次黄嘌呤/胸苷的培养基,并开始细胞的振荡培养。大约两周后,使用索尼的细胞分选仪SH800进行单细胞分选。在分选时,对具有高GFP荧光强度的前2%内的细胞群进行分选。488nm半导体激光器用于激发GFP。对单细胞分选的细胞进行扩增和培养,从每个细胞克隆中提取基因组DNA。使用回收的基因组DNA,利用Bio-Rad的QX200 Droplet Digital PCR系统(Droplet Digital是Bio-Rad Laboratories, Inc.的注册商标)测量引入每个细胞克隆的GFP基因的拷贝数。以GFP基因的拷贝数作为细胞所拥有的着陆架的拷贝数,选择其中引入了1或2个拷贝的着陆架的细胞克隆。每个获得的细胞克隆都用作后续实验中的TI宿主细胞候选者。

[0152] [实施例4]通过盒交换反应将抗体基因引入TI宿主细胞并进行评价

[0153] 使用实施例3中建立的TI宿主细胞候选者引入抗体基因并进行评价。使用Nucleofector 2b将携带mAb-A抗体基因的重组质粒(H链和L链各一个拷贝)和Cre表达质粒共同引入到每个TI宿主细胞,并进行盒交换反应。盒交换反应用包含mAb-A抗体基因的DNA盒取代引入TI宿主细胞基因组的DNA盒。转染后4小时更换培养基,约两周后,将没有GFP荧光的细胞分级分离以建立源自每个TI宿主的表达抗体的细胞。此时,在盒交换反应后,无法从一些TI宿主细胞中获得活细胞。将建立的抗体表达的细胞克隆用于两周的生产培养,并评价抗体生产能力。结果,源自三个TI宿主(TI-J、L和M)的抗体表达的细胞克隆在生产培养的第14天显示出1000mg/L或更多的抗体生产量(图3)。

[0154] [实施例5]源自TI宿主的抗体表达细胞的生产能力的长期稳定性评价

[0155] 新制备携带mAb-A抗体基因的重组质粒(H链和L链各2个拷贝),对两个TI宿主细胞(TI-J和L)进行与实施例4类似的盒交换反应。将获得的抗体表达细胞克隆冷冻保存并在解冻后进行长期传代培养约140天。在此期间,每隔约30天进行生产培养以评价细胞解冻后抗体产生能力的变化。结果,源自TI-J和TI-L细胞的每个抗体表达克隆在140天的长时间内保持高抗体产生能力,140天的平均值分别为约2400和4200mg/L(图4)。

[0156] [实施例6]使用不同抗体基因评价TI宿主细胞的生产能力

[0157] 新制备携带三种抗体基因mAb-A、B和C(H链和L链各2个拷贝)中的每一个的重组质粒,在TI-L细胞上与实施例4类似地进行盒交换反应,TI-L细胞是生产培养中抗体产生能力最高的细胞克隆的亲本细胞。然后,分级分离没有GFP荧光的细胞,并建立三个源自TI宿主的表达抗体的细胞。作为生产培养两周的结果,源自TI-L细胞的抗体表达细胞对于三种不同的抗体mAb-A、B和C也具有高抗体产生能力(图5)。

[0158] [实施例7]着陆架整合位点的鉴定

[0159] 从TI-L细胞中提取基因组DNA,TI-L细胞是生产培养中抗体产生能力最高的细胞克隆的亲本细胞。TI宿主细胞的全基因组测序使用两种下一代测序仪进行,即Pacific

Biosciences的PacBio Sequel系统和Illumina的HiSeq测序系统。首先,从PacBio Sequel系统获得的所有读取(read)数据中提取了8个具有着陆架DNA序列的长读数,然后将其在公共的核苷酸数据库上对CHO细胞基因组序列(CHO-K1[ATCC]_RefSeq_2014)进行Blast搜索。从搜索结果中,将同源性最高的基因组区域确认为着陆架质粒的整合位点,并设计了含有着陆架的整合位点的理论基因组结构。作为将从HiSeq测序系统获得的所有读取数据定位到设计的理论基因组结构的结果,证实它与理论一样定位到设计的基因组结构。作为鉴定结果,着陆架插入CHOK1 RefSeq支架中注册的NW_003614838.1上的CCDC91(含卷曲螺旋结构域蛋白91)基因(基因符号:LOC103164262)的第一内含子(SEQ ID NO:3)(截至2019年1月)(图6)。CCDC91基因定位在NW_003614838.1的反义序列上。因此,SEQ ID NO:3的核苷酸序列也定位在NW_003614838.1的反义序列上。此外,在CCDC91基因上游约32kbp处,存在与小鼠基因组序列(GRCm38.p6)中CCDC91基因启动子高度同源的区域。位于以确认的整合位点为中心的基因组序列5'侧和3'侧的5kb核苷酸序列分别如SEQ ID NO:1和2所示。因此,每个核苷酸序列与着陆架的位置关系如下:

[0160] 5'-(SEQ ID NO:1)-[着陆架]-(SEQ ID NO:2)-3'

[0161] 工业实用性

[0162] 本公开提供的热点可用于TI生产转化细胞,以使动物细胞产生外源DNA。例如,当将编码抗体的DNA引入本公开的热点时,可以高概率获得对抗体生产有用的转化细胞。

序列表

<110> 中外制药株式会社
 <120> 引入靶特异性外源基因的方法
 <130> C1-A1903P
 <150> JP 2019-070329
 <151> 2019-04-02
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 5040
 <212> DNA
 <213> 中国仓鼠

 <220>
 <221> 杂项_特征
 <222> (537)..(614)
 <223> 外显子 3

 <220>
 <221> 杂项_特征
 [0001] <222> (3147)..(3189)
 <223> 外显子 2

 <400> 1
 tgagcatcca aacaaacct ctgaggtaca gcgtcttacg acacctttac atggggacat 60
 gacgtctctc ccttgctctt gtgagaagat gagcactgga tgtggatgcc tgggectctg 120
 cagggagaca ccaagccctt aaggcgtatg cccgggaatg gtggagctgg gcaattatga 180
 cagtggctcc ttgttcacct ttctgagaaa cattcacact gacctcagga gtatcaggag 240
 tataagccaa ggtagatgtg aacgacatat gttgtactta aggctcattc agagtccctt 300
 atacaaccag cctccagctg gcacagaatg ggaaaaaagg aaatttggat tcagactggt 360
 ctaggtctct acatthttca gatcaaaaaa ccaacaaact taaacaaaaa aaaaatgaga 420
 actgggthtt acaaacaaac aaacaaaatc actthtagata caggaaagaa agaatcctgt 480
 aaccaggacg caatacctgt aggaaagggt gccccagggga cagcagggga cattgcttgg 540
 thttcactgt gttcaccatc aaaggtctct gcggcctgta agacaaggca agaccatttg 600
 aaaagaccta aagagctgta ggtthtatca gtagtcatgc gcctagcccc acaggcatgc 660
 thttgcgatg agccactcac tcacattctc tctgaacacc cacccactg ccatctacag 720
 tgccagatcc cagthccag gtaaatgact tctthctta tccaacaac ctcagtcaa 780

	tgaaatgttt atttcgtgtg tctttcattg taatttaact catcatatth gtccatcgg	840
	gtaaaaattc ccttaacaat agacttgagc aaatctttta ttgaaaagg tcatttagat	900
	tagcatgaga tttagggact aatctgaaag agcaggtgag cctgtcttct tgaacaatct	960
	ggtctctctg gtaccaaact gtagagaatt acaaaagcca gcattttcag tgaatgggct	1020
	ctcctgtttg gtggcagcta cttaggacaa ggcttacaga gagcacaag tttcagtct	1080
	ctcaggtagc tgttaaagtg agattagtat tatgattagt attagagagt taaagtgaga	1140
	tcagagatat aatgtcataa ttctaattcc tcttctgcac tgagttgcca gacaactcag	1200
	aagccagagg acatgggctg cagaggacag aagatgaggc tgcactgtcc acgcgctgtg	1260
	aaagtgagta tattggactg aacacaggac gaagacctc tgctcctcca tagcagaact	1320
	gaagagcaag aagcctgct gaacacagtc aaaccacatc aggaaatgag tgctagccct	1380
	cctgttgaga ggactgacac actgaagtga cactgaattc agttgtcact tgtgaaagca	1440
	gctgcggctt ttctatggct ctgccatgg ttagctgcca gaagatgctt gtgtgggacc	1500
	cttaaataac agcttccagg caccaaggca acatctggtc ctcaatatcc atggaatctt	1560
[0002]	aaacaaagttt tgaatgctcc atttaacacg aatgagactc caaacataaa ctattagata	1620
	aaagcatgga aactcaaat gagttttta aaaagcagtt tgggatgaaa catggaatgc	1680
	atgcacatct aactgacag cctgcacaca gaaaaccac atgtctacac tggctgcca	1740
	cacacagaaa acctatatgt ctatactgga tgtctgcaca tggagaacat gtgtctatag	1800
	catttccctg cacatgaaga acatgtctac acagcatgtg tgtctatagt agttgctgc	1860
	acatggagaa catgtgtgtc tatagtagtt gcctgcacat ggagaacatg tgtgtctata	1920
	gtagttgctt gcacatggac aacatgtgtg tctataatac ttaactgcac atggacagca	1980
	tgtgtgtcta tagtggttgc ccgcacatgg agaacatgtg tgtctacagc agttgctgcc	2040
	tgtacctgaa gaacacacgt gtgtgcaccg actgcccga cactggcagc tatgataaca	2100
	aatgacctgc tgetgaaaac ggccactggt ctgccttgaa aatgccccca cttctccatc	2160
	gacagtaatt gcaccctaa cttttacagc tctcttttta ccaaatccaa actaggtgaa	2220
	caactaaaa acaagaagaa gaaagtctg agctcacaca gtgggtggtt ccaagtcttg	2280
	agccctggca tttgactctt aatccagaga ttttctgca agactatact ggctccgcaa	2340
	aaataactgg ttataaaat attccaataa aacgagcaca cattgaaaag ctcaaatgc	2400
	ctgcttaca atgtcccacc aaacctgag agagecgtgt ggaactgcag caatgatcat	2460

	tgccaccagc tggacgtctg cgtgtgtcac acacaaaaac cacggggggg gggggggggg	2520
	gggggggggg ggaggggggg gggggggcgc ctgacacgtt ctaacagatg tgtceccatc	2580
	ctctagtgac agtctgagct cttctgatg cctcaccage cacattaatt acctgattt	2640
	aaatcettcc tatggcaaga gcaaagcgtc aataacaacc catccctgag tctctccatt	2700
	tcccttgact tcgatctctg tttcagaatt acatcaaagc gactaagaat agaacatgag	2760
	ggtaggagca accactcagt cagtaaactg tctgccttgc aagcacagaa ccagagtttc	2820
	ttccccaaga cgcactctta acagatctgg gcacggtggc gtgcatttgt aatcccagtg	2880
	ctaggaaaga tgatccctga ggcttgctag ccagactgca cagtctactt gacaagctcc	2940
	aggccagtga aagaccctgt ccaaaagaaa aatgaacggg accaagtaag agacctaatg	3000
	ggttgctctc tgggatctag acgetcatgc acacggagca gcagcagaca cacactcgg	3060
	gaataacaga tcaaggaaac agtgaagta aacacatfff tgtaatagtt tattgttacc	3120
	caaagttaaa aacagatgac acttacctcg aagccaccaa agtcgtcatc gtccatctc	3180
	aagcagcacc tgaaacacag aacaactgag atgagacaag ccacctgcat ccaagcacgc	3240
	ctgtgactta aaggaatata cactctgagc tgtaaattaa agctgtttca tttgggttat	3300
[0003]	gaagggttt cttaaactgt attgtgcatt ttttatcact taaaaaaaa cagctagtaa	3360
	ttggttattt ttttactttc tggcaaaatt agcaatttct ggaacttttt cagtaacct	3420
	gtatfffgcc atfffctgtt gagaactcag gagtggaaaa aatattcttt tacatfffaa	3480
	tttcttttc ccaagtggc gctagccccc atcagtaatg cttctgctt tccgaatcta	3540
	ctcctcagct gcctggcagc atcagcacia actccagtta agaacaggac tgtgggtgag	3600
	tttttgaaa tctgtccccc accacaaagg ttcttccctc ggtttcatgg ccgggctgag	3660
	ttagattctc aaagttgatc agcatttttg aacggtggcc acgacttctg gagcatttga	3720
	tatgtgtatt tttagccgaa actgctttgc acttctggaa aatgtggag caagtactg	3780
	agccgatcaa ggtaaataca gtcgtgtgtt cacgagatga ggcagaaaac atgagaggac	3840
	ccaggatcct tcacacctca ctctcaaggt gggagagaga gcaccgtacc acacgggctg	3900
	tgcctctccc taaacacgtt acgggagggt caagggtcaa tcaagcctta gcgccgagc	3960
	ttcagaacta aagcagcggc tttggctcac agcagaaagg aaggaaaatg cccgaaaaaa	4020
	ggctggggag taatcgtcac ctatgctccc taagagtgag aacaggaaaa cagaagtgaa	4080
	gcccagcagg cctcgtctca gggagccaga agccatgctc aggtccctga ggaacacct	4140
	ccaacaactc catcaaaaga attccacact ccagaactca acagcaaaaca aataactaa	4200

tcacagacag ctttcatgag gccaaccaga ctcattttca caaaaagtat aaagaatgcg	4260
tgtggacaga agcatgataa ttttataagt ggcgctgagt tgctagaatt gtaacacag	4320
aaaggacaga ggcggcactg ccacggttg gtcacagcct cacagtctga tgacatttct	4380
ccaaaaacgt atttcttttt ataaatttag aaattaaagc tcagctagcc atcggtagga	4440
agcacctaga aaatatgaac cagactgcta agaacaacgc tcggtggcgg gtagtctgaa	4500
atgtcatcac gttattcgcg tctcaactga ggacaactct cctctgatga catccgtcag	4560
gaagaaacta tgggagaaga agatgtgcac cctaaggatt accagggaaa ctgtagacac	4620
caccgctgtc ctttcacgtg gatgccaca acctccaggg tcaaatgccg tgtattttta	4680
gcatctatga acaccactgc actcggggac tcaacttctaa agactggagt ttccagagtt	4740
aatgctcccc tgttttcaca aggettatcc tgacacggga cgggaaggat gccacggagc	4800
cgacaacaca agcacacaac atgttcgct gtggtaagga agcagattcc taagtctga	4860
tggagctgtg caaacagca gagtggtagc cgctgacgct ctaggttcca gcaactccta	4920
cgcaccgagg gagacaagac agagttcctc ttctagatgg gcaaaaaagc agtcacgtat	4980
tttatttaaa agtaaataaa tgtgcctgt atatcttaag atatgatgcc tcagaaatgc	5040

[0004]

<210> 2
 <211> 6651
 <212> DNA
 <213> 中国仓鼠

<220>
 <221> 杂项 特征
 <222> (6455)..(6651)
 <223> 外显子 1

<400> 2	
tgtgttaaag acatagcctt tctgaaaata atttagattc aaaccctatg acagtttctt	60
tttgaaaatt aagagaagaa agaaaacgga tgtttttttt ttgtctgctg attgtgtgtg	120
tgtattttta gaaacaggat ttcgctatgt agccctgact ggcttgaac ttctatttag	180
accaggetgc cttcaaaatt cagagagacc tgectgecte tgectctga gtaactggaat	240
taaaggtgtg agccaccgtg cttgacctca acagcactgg tttttttaa actcagtttt	300
acaggggcca gagaaacagc tcagtcaata aagcatttga cacacaagta tatgaagcac	360
tgtttagatc cccagaattc acataaaaag caggtatata taaaaatcct gtaataccag	420
cacttgggag gcagagagag ggaatcctgg gtcaaatgg ccagctagac tagtctgcac	480

	tgtccagctc	tggettccagc	aggaaagcct	gcctcaaaaa	tcagtgatca	aaaatcatgc	540
	ccaacattta	cgttgggact	caaacccta	tacacacatg	agcatgcaaa	catgcagccc	600
	acaatacac	aaacatacaa	aaagtcatt	gatttacaac	acacaaaagt	taaaaagcaa	660
	tttttaagaa	ggaaacatca	gaggttcttc	atggactctg	tcacttgaat	acactcaacc	720
	cttggttctt	tetaagccat	aatgtgttaa	gtcgtctgta	aacgtgtctg	cagtttgtgt	780
	tacagccatt	agaactgcag	ggattcccac	catgtgtcaa	gtaacaccta	agcagagaat	840
	gatgagctc	taactcagag	ctatatccca	ctaacttggg	accaaggcta	aaggttttca	900
	tagtatctaa	gctcaacaat	ctcaggacce	cttgcattga	aattaaccta	tcctgttgc	960
	ttattatggt	aattccctat	tctgccatcc	tcagtattta	aaacactgac	agtactttta	1020
	aagtccggtt	tgagaaaaac	agaccagaga	gtaaaacatg	cacagggaca	gcattgcaca	1080
	ccctctgcca	ccagccactc	cacagatgtc	agccaaggtc	cttgagaggc	tgagtgggtga	1140
	ggaagaaagc	tcagatccag	ggaaaaagca	cacaggtata	aacaacagtg	aaaactctta	1200
	gggagaaaac	tgccatagtg	gggaaaataa	ttgagggggg	atctatgggt	gggaatatca	1260
[0005]	ggggacttct	gagacagact	gaaggaaatg	aacagaaatt	ctaaatagaa	cttttaaaaa	1320
	aaaaaagtac	attttatcca	agtttccact	gaaaggtctt	ctttaaaatg	accactccc	1380
	cccacaaaa	aaagatgtta	cattaaaatg	cttgtgtgtg	ctcctaaata	caaacaaggt	1440
	ttaaagaaca	aacaaggtaa	aggagaaaag	tgtgaagcat	ggcaggggag	aacagagggt	1500
	gctcagcccc	atttccctca	ggtaccac	agaaggctca	agaatgagca	actagcagtt	1560
	ggttaaagat	gaggetcaaa	ttccaacca	tcagggtctg	acctcaatcg	ccaacaaaa	1620
	tcataaagcc	agtcagttgc	agttcttccc	ccagcagaac	acaggaagca	tgaagacaga	1680
	gtttttgcac	catctcagtc	ttcatgattg	aaagcaaac	catgccagtg	tgtcctggaa	1740
	aatagcagca	ctgtgtcaca	gagaggcaca	tgaagcatc	agtgtcaag	gcctcctgct	1800
	gtgtctacca	cgettccct	ttccttcttg	gatgagccgg	tgctgtctct	gtatctacta	1860
	ccaatcagag	cgagcacggc	ttgatttcag	ctacccttta	ttacacacgt	ttgtgtacat	1920
	gtatgtcaga	ggacagcctg	taggacttgt	gagtagacgc	ctttatccat	tgagccatgt	1980
	cgctgggtcca	atctgtcaac	tctctgtagt	gtaagcatcc	tctaaattgg	aagctagtgt	2040
	ttacttttt	taaggagct	ttggatggaa	aataattcta	ttttttaata	ataaattttg	2100
	gtctttttaa	atcttttgg	ttttagatat	atacctgcac	ttgtacaaa	gaaagetaat	2160

	aatTTtagaa attTaaatgt tcaagcaagc tacagcttaa tatttacatg tagtaaaacc	2220
	aaagatctag ttTcctTTta aaaaaatag gaagtTctcc acgccccatt TcctTTatta	2280
	TaaagTaaT tTTTcctTca cTaaCctgat actTTctTat catataaacac attcgTtTget	2340
	gcagaataaa cTTTgtacac TgTaaatag tataaaCtat TctcattTgt taataaaagag	2400
	ctgactTgcc tagagctagg Tgggagaggc agactaggag aattctTgga agaaggTgg	2460
	agTcagaagt gTccccagcc agacagagag ggaacaagac aCactcgaga ggTaaatacc	2520
	acaagcctca gggcagcaca tagattaata gaaatgggtt cattTaaGtt ataagagcta	2580
	gTtaataata agcctgagct atcaactgag cattTaaaat taataagact ctctgactgg	2640
	TtactTgga gcggtTgca ggacaaaaac Ttccaccaac cattTattTc ggaacacaca	2700
	gacctagga tatgtTgcc tattTctagc Tgcagaatta TTTgatTgc actgacaccc	2760
	atacgggacc aagcagTacc atcctaagcc Tggtgcattg tagcttatca gtgaagtTgt	2820
	cattTtctt agTgaactTT Ttctgcate TTTgtcaag Tttacacctg atgctctacg	2880
	agTctagtgt ctctTTTtac attactTaaC tatgtctTac gcccatctTt cTTTggTaaG	2940
	ctctcattgg taattgTTTT acctgtacat TcctTcatgt taattTTata Tgcaaatgat	3000
[0006]	cattTtTgtct ccagacagca agTtTctTt cctccattac aatcccacta cccaggtTc	3060
	TgtTcctTTt gTcactTgca taggccaTgc TctTcactgc TgccctggTg cctggTgcca	3120
	Tgcgatgggc TgcactTgct gaagataaTt Tcaaagccat ctTctaacce atgtTtccct	3180
	ctTaaagtgg acgccagcac Tgtctctct cctgacacta ggcgatTgt acctccctaa	3240
	caaaatggaa gatagccaag cgcCCgcat gtgtgggaat gcagTgtcct ctagegcctg	3300
	ccccatatct ctTgcctTgg gaatacagat gccagatgca gaaagaccac agcggccac	3360
	acagagacca ctTggagaaa TtgtgtTtag gTtTcccaac Tgattgcca ccactgacat	3420
	cagatctcaa gacacaggaa Tgaacacaat Ttcagatgac Tccaggccac ctcccTgat	3480
	agaatcacca cagctgagga agTaaaagg agagagagac cgaacaccat Ttctacagc	3540
	caactccctg acctcagaat ccttagTcat gagTgcgtTt ataagcatac aaaagaggag	3600
	Tacagacgac agTcggtTgg TtctaaCag gataaaagg gtctctctc cctgTaatTt	3660
	gTaaacatc atcatcagga attcacatgg cctatcgagt gagactgtca cacagtTctc	3720
	gTaatctTgt gTcactcggg agTcagggt catgggatgg tagccgtcct gTcgcagctg	3780
	ggatggTage cgTcctgtcg cagctgggat gaaccacctg gTaatgggGc TgctTtctct	3840
	catctgctaa tatcctgtct gagatggcta gactacactg aaccaggaat cacctctgga	3900

	accctctct cacagtatct tcacttgact tagatatcag gatggagctg ggctctcaga	3960
	actggctgga aatagttcct tttcttctgt aattaaaaga gatttcatca gaatgaaaaa	4020
	atctatttct tacaacttgg tagaaaaaaa tcataacttg cttagcaaat catctaggac	4080
	tgttgcttgc tctgtgggaa gattcagttt cttctaatta tgggacaatt cggactttta	4140
	atTTTTccag aagcttctgt aaataatatt tttttctaga aaacctatTT ttaaatggtt	4200
	ggcatacagt tattaacatt catttcaaat ttaatttTgga aacaagcttTg ttttacctgt	4260
	caateccagt tccctctccc taccctaaca ttcttcttTgt tactactatt ttaatgtctg	4320
	atTTtatctgc cattcttttTc atTTtatatg tactgagcga tTgtTtattt aaatcttcta	4380
	catcctatgg gtctctactt Tgtttcactt tttatctaTt tcaactcagg Tgagttgaaa	4440
	ccTTTgcccac agtagcagca gagccaacag catctgggTt ctagcaggTt agggaaaggga	4500
	Taaattctag ttttctactg gaaaacaaac gactggaagt gattgtaagg tcagatgtgt	4560
	gtgcgTcagg gTttagTtca gtggTttTgg ttctctaaca cactcattca gtctatttTa	4620
	gaaacaccag tcacttgTcg taagaaaagg tatgcccattt catgacataa atcatctcaa	4680
[0007]	gctTTtaaaaa atagtaatgg gagggTgga ggatggTctg atggTtagcg cactggctgc	4740
	tctTgcagag gtccagattc gTttcctagc acccacacgg ggGctcaca ctgcctgtac	4800
	ctccagTtcc taatgatcta caccctctTc Tggcttccac aagcactgca caaactTggt	4860
	gcacaaacat gcacacagat aaaactcaca cacaccaca taaacagtaa aaagtaaata	4920
	aaataataac aggcataaat tacaagacca acaacaaca agaaaaaat gttcaaaatt	4980
	acagtgacaa ggcagaacca gcaagtggat actataagga cttagTTTTT agatTTTTT	5040
	TTTTcgtgtg Tgtgtgtgtg Tgtgtgtgtg Tgtgtgtgtg Tgtgtgtgtg Tgtgtgtgcg	5100
	cgcgcgcaca Tgttcatgtc acaacaagaa Tgtgtaggtc cgtggaaacg ttacaggagc	5160
	Tggttctctc cttccactat gcaggttcca gggatcaaac ttagcagcaa gcaccaacc	5220
	ccaaaacttt tcaatgtaac caatttaaaa atacaatgga ggcacatgga agcacatgca	5280
	cacctgcaga tacacactta tgaacacaca agcacatagt atttgaaaag aaaaaagaaa	5340
	agcatccact Tgtggactaa Tgagcatgat cagaaaaatc acctatgctg tagttaaagt	5400
	cccaaagga gaaggcattg agattgcaat gaagtaaata ttgaaaagaa gatggccaaa	5460
	aacatctcag gattgattag caacaaacga caagccaagc aaagagagac aaccagcaa	5520
	aataaacact ggatgctctc atcaccceca tatgacatca ataaaacaca atccaaagaa	5580

	cccaaacggc acagcgcgtg ggacctcccc aaacggcaca gcgcgtgggc ctctacttcc	5640
	tccacctcca acctceccaa actgggacct ccccaaacag gacccgaggt tcccctctac	5700
	ttectccacc tccaggaaca tctgttatte agtccttgca catttcaaga gtaaaaatgt	5760
	taaccatcga atgagggaaat aatggcaca gccagactac cttgggattg actggtttgt	5820
	cccaacacct ggacttaaga agtgcactat tagagcaacc aaccagaga actagacctg	5880
	aatacaaata taacactgt acacaaacct cagacataat tacagaactg tcttaccaca	5940
	catcccctaa aaaattcaga tggcgcagta gcagaccac atataacagt tttctaaatt	6000
	ttgctttcaa atgttgccaa cattttgtcc aattttattg tcaaattaat gtagaaatat	6060
	ttcgcaataa tctactttt tctttgcatt tcaccatggt tccttctggc agaaagaaat	6120
	acatccagac tgcacatgcc atctttaaat tgattttaca tccactgtac taaaaatta	6180
	agtataaagc ttctaatgac cttacaatgg cactttgaat ggctccatta ctaaccaa	6240
	actccatcaa tatacaaatt tggttttgtg ccaattatta aatatctaag acgtcttcat	6300
	gcattggcct tgttttcttc ttttaggtta taaattta	6360
	aaattaacca aaaaaaatt tatatatata tatatttta tatatatata tatatatatg	6420
[0008]	tgaacaaggt tccaaaggag ctaaactcca ttacettaca acttgtaa	6480
	cgttgatgct cccttgact ttagcagagc tatgagctgg gaacaggaga ggtggggact	6540
	cccaaccaa gagcacagt gteccccagt gacaaacagt cagcacgaaa aacatacaga	6600
	caagtaataa tacagagact aagtagctta tattaaggg tgtgtgtgtg t	6651
	<210> 3	
	<211> 8305	
	<212> DNA	
	<213> 中国仓鼠	
	<400> 3	
	ctgaaacaca gaacaactga gatgagacaa gccacctgca tccaagcacg cctgtgactt	60
	aaaggaatat aactctgag ctgtaaatta aagctgtttc atttgggtta tgaaggcctt	120
	tcttaactg tattgtgcat tttttatcac ttaaaaaaaaa acagctagta attggttatt	180
	tttttacttt ctggcaaaat tagcaatttc tggaactttt tcagtaacca tgtattttgc	240
	cattttctgt tgagactcca ggagtggaaa aatatttctt ttacatttta atttgccttt	300
	cccaaagtgg cgctaggccc catcagtaat gcttctgct ttccgaatct actctcagc	360
	tgcttgccag catcagcaca aactccagtt aagaacagga ctgtggttga gtttttggaa	420

	atctgtcccc caccacaaag gttcttcctt cggtttcatg gccgggctga gttagattct	480
	caaagttgat cagcattttt gaacgggtggc cacgacttct ggagcatttg atatgtgat	540
	ttttagccga aactgctttg cacttctgga aaaatgtgga gcaagttact gagccgatca	600
	aggtaaataca agtcgtgtgt tcacgagatg aggcagaaaa catgagagga cccaggatcc	660
	ttcacacctc actctcaagg tgggagagag agcaccgtac cacacgggct gtgcctctcc	720
	ctaaacacgt tacgggaggg tcaagggtca atcaagcctt agcggccgagg cttcagaact	780
	aaagcagcgg ctttggctca cagcagaaaag gaaggaaaat gcccgaaaaa aggctgggga	840
	gtaatcgtca cctatgctcc ctaagagtga gaacaggaaa acagaagtga agcccagcag	900
	gcctcgtctc agggagccag aagccatgct caggteccctg aggaacacct accaacaact	960
	ccatcaaaaag aattccacac tccagaactc aacagcaaac aaatacacta atcacagaca	1020
	gctttcatga ggccaaccag actcattttc acaaaaagta taaagaatgc gtgtggacag	1080
	aagcatgata attttataag tggcgtgag ttgctagaat tgctaacaca gaaaggacag	1140
	aggcggcact gccacggttt ggtcacagcc tcacagtctg atgacatttc tccaaaaacg	1200
	tattttcttt tataaattta gaaattaaag ctcagctage catcggtagg aagcacctag	1260
[0009]	aaaatatgaa ccagactgct aagaacaacg ctcggtggcg gtagtctga aatgtcatca	1320
	cgttattcgc gtctcaactg aggacaacte tcctctgatg acatccgtca ggaagaaact	1380
	atgggagaag aagatgtgca ccctaaggat taccagggaa actgtagaca ccaccgtgt	1440
	cctttcacgt ggatgccaca aacctccagg gtcaaatgcc gtgtattttt agcatctatg	1500
	aacaccactg cactcgggga ctcaattcta aagactggag tttccagagt taatgtctcc	1560
	gtgttttcac aaggcttata ctgacacggg acgggaagga tgccacggag ccgacaacac	1620
	aagcacacaa catgttcgcc tgtgtaagg aagcagatte ctaagttctg atggagetgt	1680
	gcaaaacagc agagtggatga ccgctgacgc tctaggttcc agcaactcct acgcaccgag	1740
	ggagacaaga cagagttcct cttctagatg ggcaaaaaag cagtcacgta tttatttaa	1800
	aagtaataa atgtgccctg tatatcttaa gatatgatgc ctcagaaatg ctgtgttaaa	1860
	gacatagcct ttctgaaaat aatttagatt caaacctat gacagtttcc tttgaaaat	1920
	taagagaaga aagaaaacgg atgtttttt ttttctgct gattgtgtgt gtgtattttt	1980
	agaaacagga tttcgctatg tagccctgac tggcctggaa cttctattta gaccagctg	2040
	cettcaaaat tcagagagac ctgectgect ctgectctg agtactggaa ttaaagggtg	2100
	gagccaccgt gcttgacctc aacagcactg gtttttttaa aactcagttt tacaggggcc	2160

	agagaaacag ctcagtcaat aaagcatttg acacacaagt atatgaagca ctgtttagat	2220
	ccccagaatt cacataaaaa gcaggtatat ataaaaatcc tgtaatacca gcaactggga	2280
	ggcagagaga gggaaatcctg ggtcaaaatg gccagctaga ctagtctgca ctgtccagct	2340
	ctggcttcag caggaaagcc tgcctcaaaa atcagtgatc aaaaatcatg cccaacattt	2400
	acgttgggac tcaaaccctt atacacacat gagcatgcaa acatgcagcc cacaataca	2460
	caaacataca aaaaggatcat tgatttaca cacacaaaag ttaaaaagca atttttaaga	2520
	aggaaacatc agaggttctt catggactct gtcacttgaa tacactcaac ccttggttct	2580
	ttctaagcca taatgtgtta agtcgctgtg aaacgtgtct gcagtttgtg ttacagccat	2640
	tagaactgca gggattccca ccatgtgtca agtaaacctt aagcagagaa tgatgaggct	2700
	ctaactcaga gctatatccc actaacttgg gaccaagget aaaggttttc atagtatcta	2760
	agctcaacaa tctcaggacc cettgcatgt aaattaacct atcctgttgc tttattatgt	2820
	taattcccta ttctgccatc ctcagtattt aaaacactga cagtactttt aaagtccggt	2880
	ttgagaaaaa cagaccagag agtaaaacat gcacagggac agcattgcac accctctgcc	2940
[0010]	accagccact ccacagatgt cagccaaggt ccttgagagg ctgagtgggtg aggaagaaag	3000
	ctcagatcca gggaaaaagc acacaggtat aaacaacagt gaaaactctt agggagaaaa	3060
	ctgcctagtg tgggaaaata attgaggggg gatctatggt tgggaatata aggggacttc	3120
	tgagacagac tgaaggaaat gaacagaaat tctaaataga acttttaaaa aaaaaaagta	3180
	cattttatcc aagtttccac tgaaaggctt tctttaaaat gaccactcc cccacccaaa	3240
	aaaagatggt acattaaaat gcttgtgtgt gctcctaaat acaaacaaagg tttaaagaac	3300
	aaacaaggta aaggagaaaa gtgtgaagca tggcaggga gaacagaggt ggctcagccc	3360
	catttccctc aggtaccca cagaaggctc aagaatgagc aactagcagt tggttaaaga	3420
	tgaggctcaa attccaacca atcagggctg cacctcaatc gccaaccaaa atcataaagc	3480
	cagtcagttg cagttcttcc cccagcagaa cacaggaagc atgaagacag agtttttgea	3540
	ccatctcagt cttcatgatt gaaagcaaaa ccatgccagt gtgtcctgga aatagcagc	3600
	actgtgtcac agcgaggcac atgaaagcat cagtgtctca ggctcctgc tgtgtctacc	3660
	acgctttccc tttccttctt ggatgagccg gtgcctgctc tgtatctact accaatcaga	3720
	gcgagcacgg cttgatttca gctacccttt attacacagc tttgtgtaca tgtatgtcag	3780
	aggacagcct gtaggacttg tgagtagacg cctttatcca ttgagccatg tcgctggtcc	3840

	aatctgtcaa ctctctgtag tgtaagcadc ctctaaattg gaagctagtg tttcactttt	3900
	ttaagggagc ttggatgga aaataattct attttttaat aataaatttt ggtcttttta	3960
	aatcttttgg tttttagata tatacctgca cttgctacaa agaaagctaa taattttaga	4020
	aatttaaatg ttcaagcaag ctacagctta atattttacat gtagtaaaac caaagatcta	4080
	gtttcctttt aaaaaaatat ggaagtctc cacgcccacat ttcctttatt ataaagtaac	4140
	tttttccttc actaacctga tactttctta tcatataaca cattcgttgc tgcagaataa	4200
	actttgtaca ctgtaaatat gtataaacta ttctcattgg ttaataaaga gctgactggc	4260
	ctagagctag gtgggagagg cagactagga gaattctggg aagaagggtg gagtcagaag	4320
	tgtccccagc cagacagaga gggaacaaga cacactcgag aggtaaatac cacaagcctc	4380
	agggcagcac atagattaat agaaatgggt tcatttaagt tataagagct agttaataat	4440
	aagcctgagc tatcaactga gcatttaaaa ttaataagac tctctgactg gttacttggg	4500
	agcggcttgc aggacaaaaa ctccacca ccatthattt cggaacacac agacccatgg	4560
	atatgtgtgc ctatttctag ctgcagaatt attttgatgg cactgacacc catacgggac	4620
	caagcagtac catcctaage ctggtgcatt gtagcttate agtgaagttg tcattttcct	4680
[0011]	tagtgaactt ttttctgcat cttttgtcaa gtttacact gatgctctac gagtctagtg	4740
	tctcctttta cattaactaa ctatgtctta cgcccatctt tctttggtaa gctctcattg	4800
	gtaattgttt tacctgtaca ttccttcatg ttaattttat atgcaaatga tcattttgtc	4860
	tccagacagc aagtttctt tctccatta caatcccact accccaggtt ctgttccctt	4920
	tgtcacttgc ataggccatg ctcttactg ctgccctggg gcctgggtgcc atgcatggg	4980
	ctgcacttgc tgaagataat ttcaaagcca tcttctaacc catgtgtccc tcttaaagtg	5040
	gacgccagea ctgtctctc tctgacact aggcgatgt gacctcccta acaaaatgga	5100
	agatagccaa gcgcccgcca tgtgtgggaa tgcagtgtcc tctagcgct gccccatc	5160
	tcttgccctg ggaatacaga tgccagatgc agaaagacca cagcggccca cacagagacc	5220
	acttgagaa attgtgtgta ggtttcccaa ctgattgcca accactgaca tcagatctca	5280
	agacacagga atgaacacaa tttcagatga ctccaggcca cctcccgtga tagaatcacc	5340
	acagctgagg aagtaaaagg gagagagaga ccgaacacca ttttctacag ccaactccct	5400
	gacctcagaa tccttagtca tgagtgcgtt tataagcata caaaagagga gtacagacga	5460
	cagtcggttg gttcctaaca ggataaaagg ggtctctct cctgtaatt tgctaaacat	5520
	catcatcagg aattcacatg gcctatcgag tgagactgtc acacagttct cgtaatcttg	5580

	tgctactcgg gagtcagggg tcatgggatg gtagccgtcc tgctgcagct gggatggtag	5640
	ccgtcctgtc gcagctggga tgaaccacct ggtaatgggg ctgctttctc tcatctgcta	5700
	atatcctgtc tgagatggct agactacact gaaccaggaa tcacctctgg aacctctctc	5760
	tcacagtatc ttcactgtac ttagatatca ggatggagct gggctctcag aactggctgg	5820
	aaatagttcc ttttcttctg taattaaaag agatttcatac agaatgaaaa aatctatttc	5880
	ttacaacttg gtagaaaaaa atcataactt gcttagcaaa tcatctagga ctgttgettg	5940
	ctctgtggga agattcagtt tcttctaatt atgggacaat tcggactttt aattttcca	6000
	gaagcttctg taaataatat tttttctag aaaacctatt tttaaatggg tggcatacag	6060
	ttattaacat tcatttcaaa ttttaattgg aaacaagctt gttttacctg tcaatcccag	6120
	ttccctctcc ctaccctaac attcttcttg ttatcactat tttaatgtct gatttatctg	6180
	ccattctttt cattttatat gtactgagcg atgtgttatt taaatcttct acatcctatg	6240
	ggctcttact ttgtttcact ttttatctaa ttcaactcag gtgagttgaa accttgcca	6300
	cagtagcagc agagccaaca gcactcgggt tctagcaggt tagggaaggg ataaattcta	6360
[0012]	gttttctact ggaaaacaaa cgactggaag tgattgtaag gtcagatgtg tgtgcgtcag	6420
	ggttttagttc agtggttttg gttctctaac aactcattc agtctatttt agaaacacca	6480
	gtcatctggc gtaagaaaag gtatgccatt tcatgacata aatcatctca agctttaaaa	6540
	aatagtaatg ggaggggtgg aggatggctt gatggttage gcactggctg ctcttgcaga	6600
	ggtccagatt cggttcctag cacccacacg ggggctcaca actgcctgta cctccagttc	6660
	ctaatagatc acacctctt ctggcttcca caagcactgc acaaacttgg tgcacaaaca	6720
	tgcacacaga taaaactcac acaccccac ataaacagta aaaagtaaataaaaataataa	6780
	caggcataaa ttacaagacc aacaacaaca aagaaaaaaa tgttcaaaat tacagtgaca	6840
	aggcagaacc agcaagtgga tactataagg acttagtttt tagatttttt ttttctgtg	6900
	gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgc gcgcgcgcac	6960
	atgttcatgt cacaacaaga atgtgtaggt ccgtggaaac gttacaggag ctggttctct	7020
	ccttccaacta tgcaggttcc agggatcaaa cttagcagca agcaccaacc cccaaaactt	7080
	ttcaatgtaa ccaatttaaa aatacaatgg aggcacatgg aagcacatgc acacctgcag	7140
	atacacactt atgaacacac aagcacatag tatttgaaaa gaaaaaagaa aagcatccac	7200
	ttgtggacta atgagcatga tcagaaaaat cacctatgct gtagttaaag tccccaaagg	7260

	agaaggcatt gagattgcaa tgaagtaaatt attgaaaaga agatggccaa aaacatctca	7320
	ggattgatta gcaacaaacg acaagccaag caaagagaga caaccagca aaataaacac	7380
	tggatgctct catcacceca atatgacatc aataaaacac aatccaaaga acccaaacgg	7440
	cacagecgt gggacctccc caaacggcac agcgcgtggg cctctacttc ctccacctcc	7500
	aacctcecca aactgggacc tcccacaaca ggacctgagg ttcccctcta ctccctccac	7560
	ctccaggaac atctgttatt cagtcttgc acatttcaag agtaaaaatg ttaaccatcg	7620
	aatgagggaa taaatggcac agccagacta ccttgggatt gactggtttg tcccaacacc	7680
	tggacttaag aagtgcacta ttagagcaac caaccagag aactagacct gaatacaaat	7740
	ataaacactg tacacaaacc tcagacataa ttacagaact gtcttaccac acatccccta	7800
[0013]	aaaaattcag atggtgcagt agcagacca catataacag ttttctaat tttgettca	7860
	aatgttgcca acattttgct caattttatt gtcaaattaa ttagaaaata tttcgcaata	7920
	atcctacttt ttctttgcat ttccatgt ttcttctgg cagaaagaaa tacatccaga	7980
	ctgcacatgc catctttaa ttgattttac atccactgta ctacaaaatt aagtataaag	8040
	cttctaataga ccttacaatg gcactttgaa tggetccatt actaaccaaa tactccatca	8100
	atatacaaat ttggttttgt gccattatt aaatatctaa gacgtcttca tgcattggct	8160
	ttgttttctt cttttagggt ataaatttaa tgtaaactcc cagatactga gaaattaacc	8220
	aaaaaaaaat ttatatatat atatattttt atatatatat atatatatat gtgaacaagg	8280
	ttccaaagga gctaaactcc attac	8305

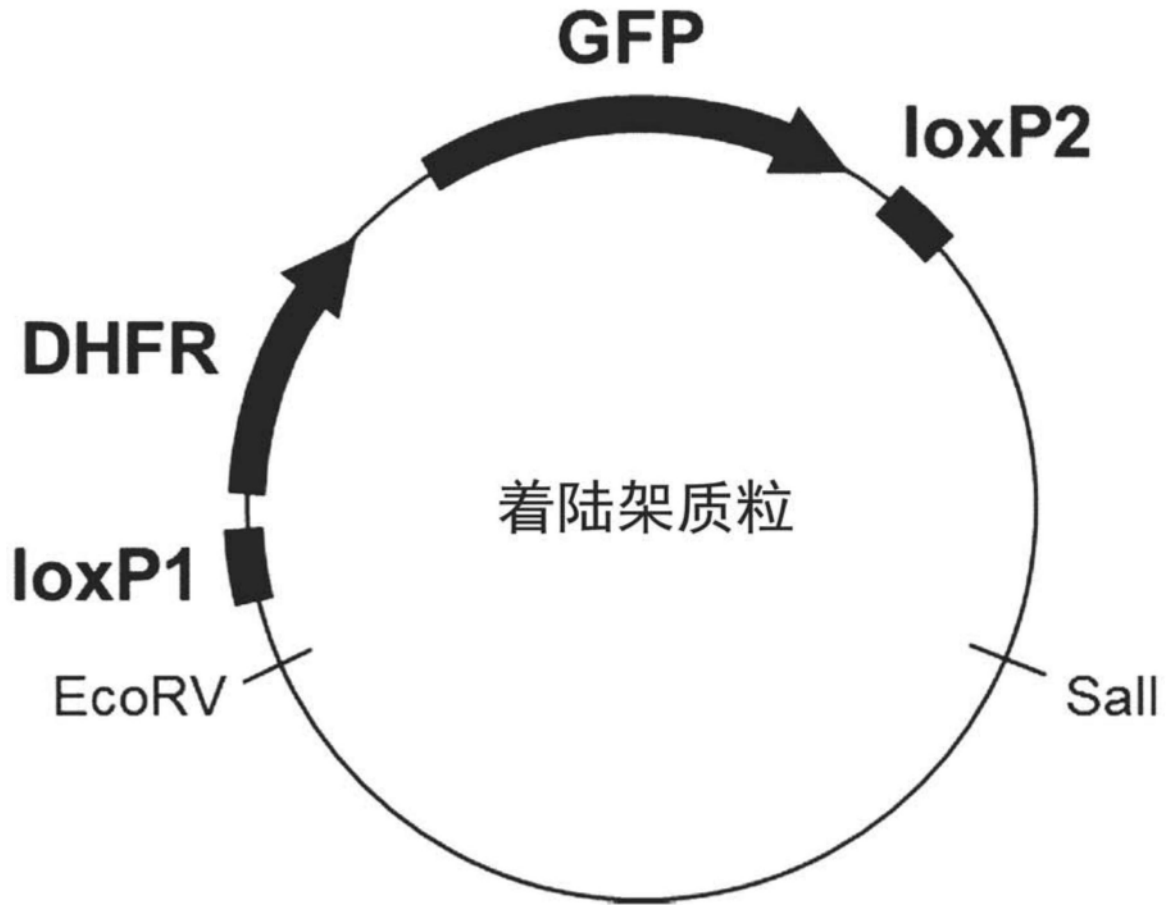


图1

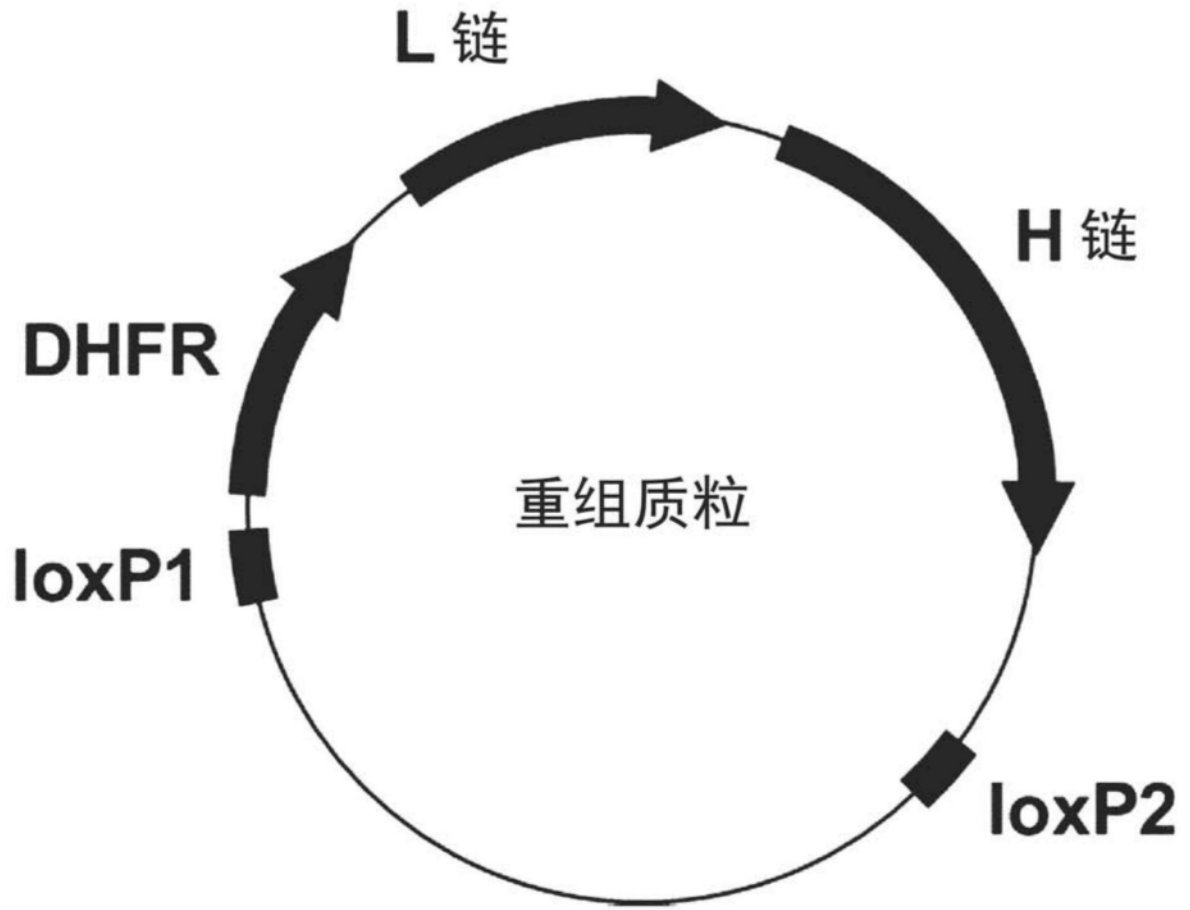


图2

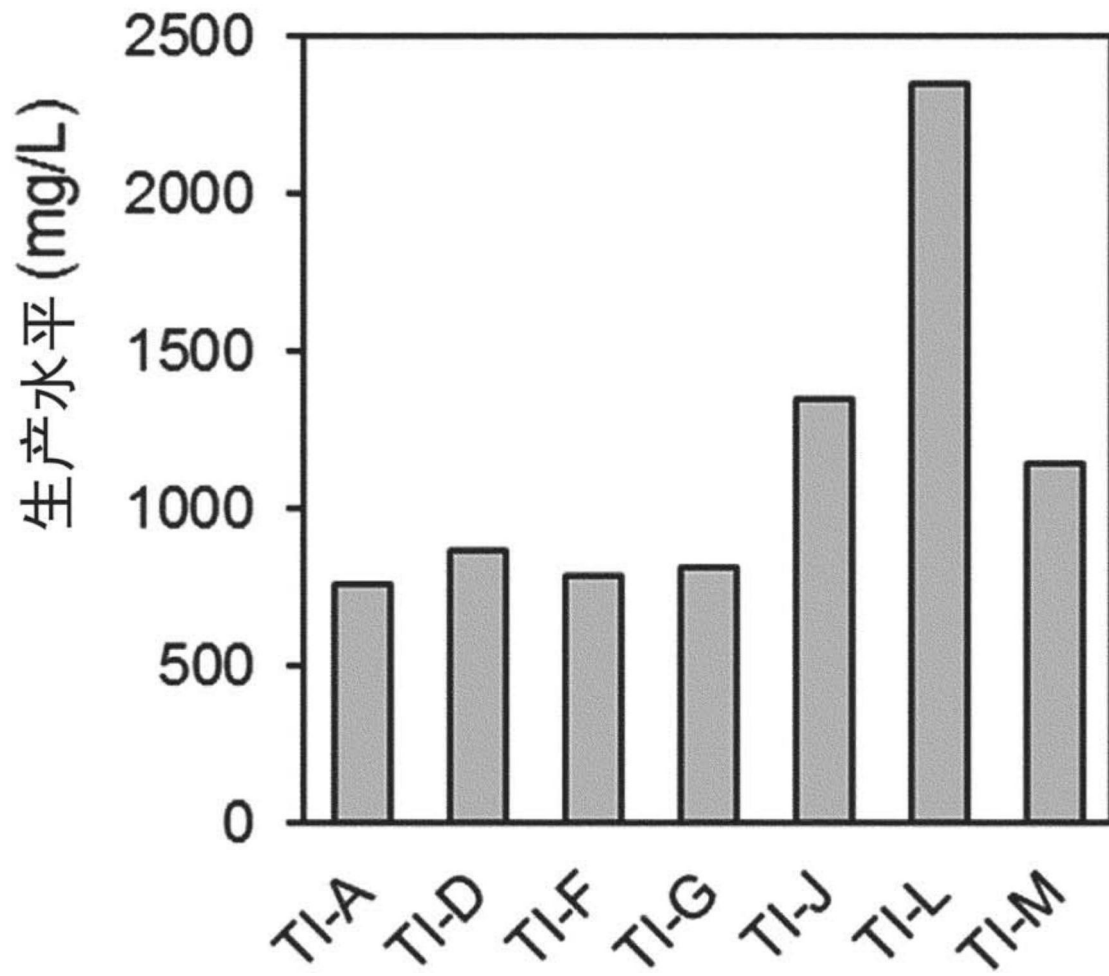


图3

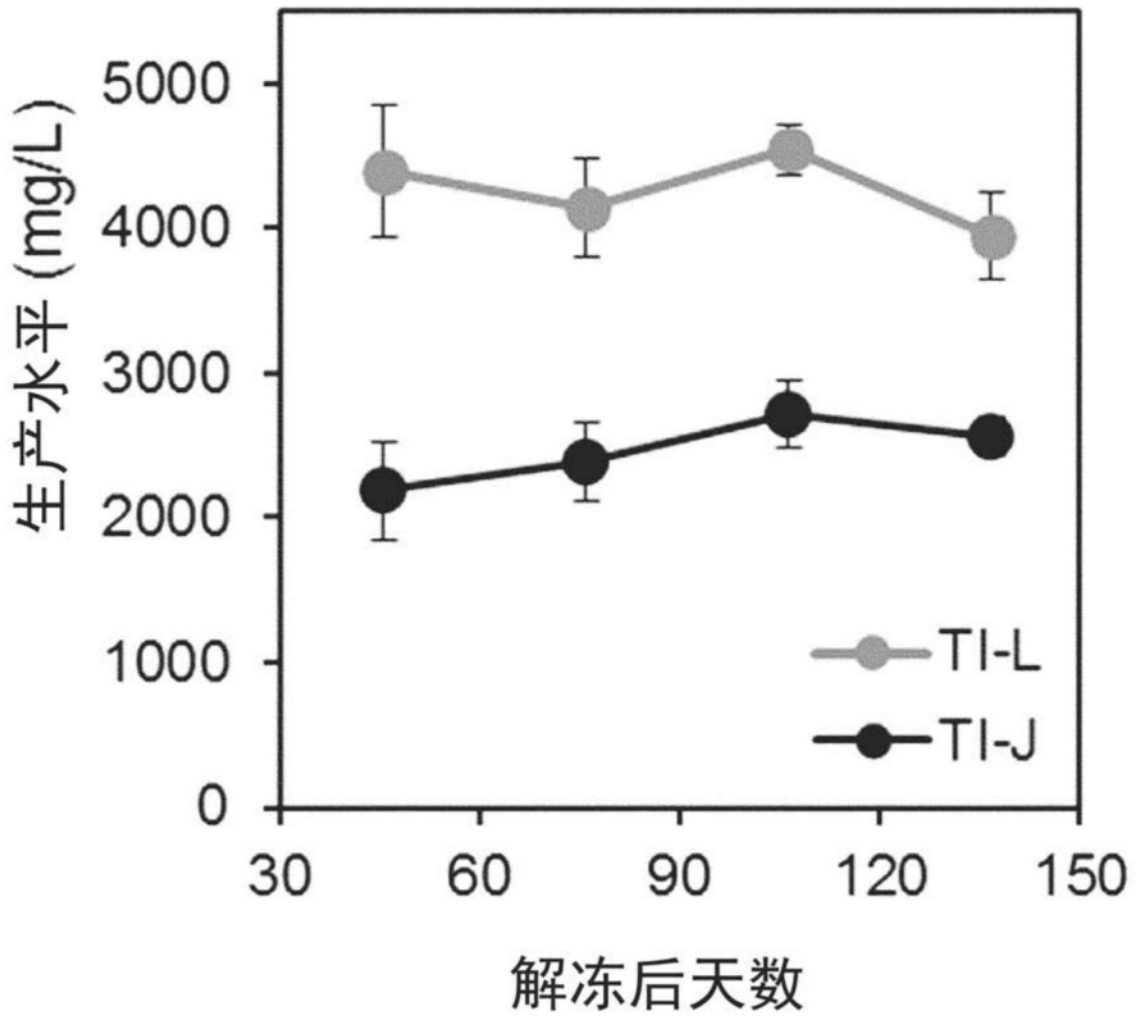


图4

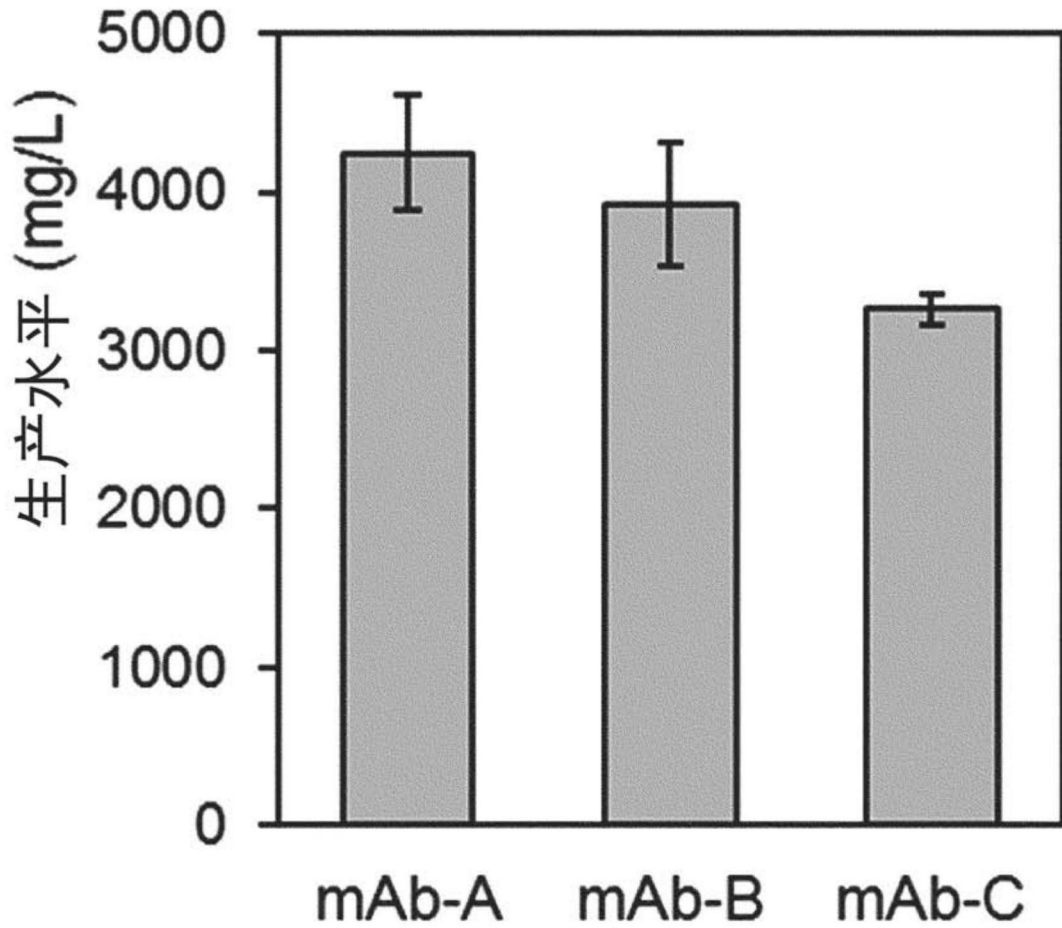


图5

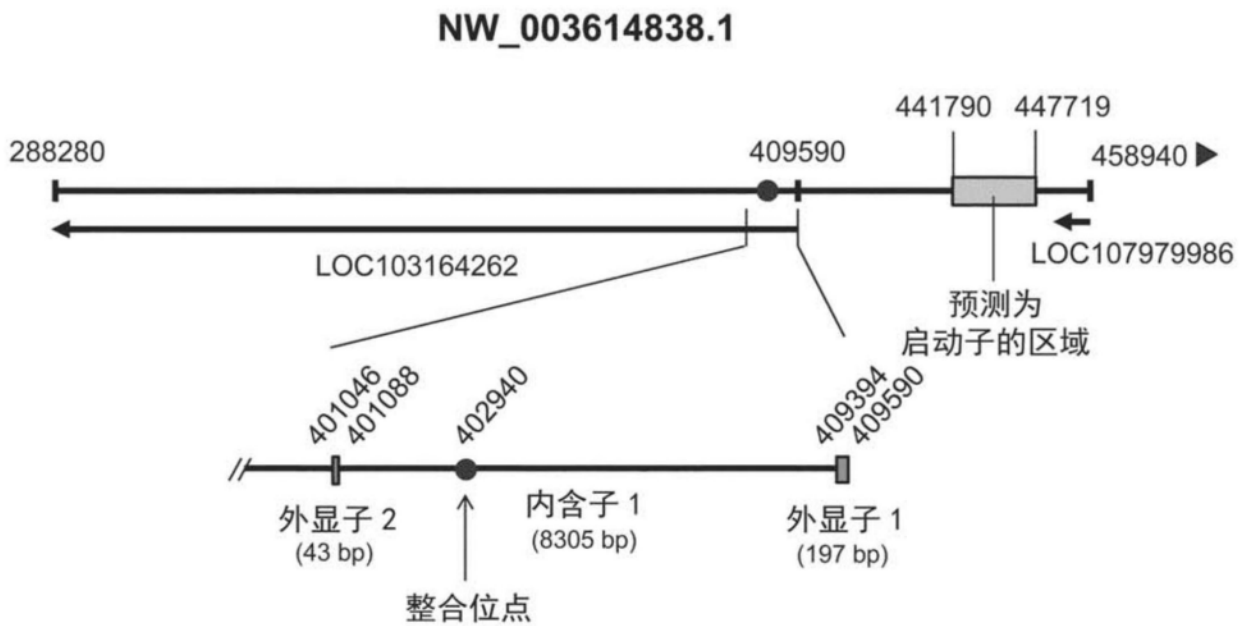


图6