



(10) 授权公告号 CN 113966395 B

(45) 授权公告日 2025.07.04

(21) 申请号 202080028310.8

(22) 申请日 2020.04.09

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113966395 A

(43) 申请公布日 2022.01.21

(30) 优先权数据  
62/833,548 2019.04.12 US  
62/839,207 2019.04.26 US  
62/979,483 2020.02.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.10.12

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2020/027489 2020.04.09

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/210507 EN 2020.10.15

(73) 专利权人 阿尔特拉吉尼克斯制药公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 奥布里·R·蒂尔南  
尼古拉斯·里查兹

(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 高丽娜 张启程

(51) Int.Cl.  
C12N 7/02 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2023077078 A1, 2023.05.04  
Richards N等.HeLa 3.0: CRISPR  
knockout of genes modulating titer in  
established rAAV producing cell lines.  
《Molecular Therapy》.2020,第28卷(第4S1期),  
第239页.

审查员 叶繁

权利要求书4页 说明书34页  
序列表63页 附图15页

(54) 发明名称

工程化的生产细胞系及其制备和使用方法

(57) 摘要

本申请涉及重组腺相关病毒(rAAV)包装细胞系和/或生产细胞系,其已经被工程化以降低一种或多种基因和/或蛋白的表达和/或活性以增加rAAV滴度。本文还描述了产生工程化的细胞系的方法。

1. 一种重组腺相关病毒(rAAV)包装细胞系和/或生产细胞系,与相应未修饰的亲本细胞相比,其包含具有KCNN2的表达降低的细胞,或者具有KCNN2的表达降低和RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP或NALCN-AS1的表达降低的细胞。

2. 根据权利要求1所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中使用核酸酶、双链RNA(dsRNA)、小干扰RNA(siRNA)、小发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)或反义RNA寡核苷酸(ASO)使所述表达降低。

3. 根据权利要求1所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中采用包含选自序列SEQ ID NO:1-11中任一个的核苷酸序列的siRNA使所述表达降低。

4. 根据权利要求3所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中采用在有义链中包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:38的核苷酸序列的siRNA使KCNN2的表达降低。

5. 根据权利要求3所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中RGMA的表达降低,并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列。

6. 根据权利要求3所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中ATP5EP2的表达降低,并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:32的核苷酸序列。

7. 根据权利要求3所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中LINC00319的表达降低,并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:33的核苷酸序列。

8. 根据权利要求3所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中CYP3A7的表达降低,并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:34的核苷酸序列。

9. 根据权利要求3所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中NOG的表达降低,并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:4的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:35的核苷酸序列。

10. 根据权利要求3所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中SPANXN3的表达降低,并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。

11. 根据权利要求3所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中MYRIP的表达降低,并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列。

12. 根据权利要求3所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中NALCN-AS1的表达降低,并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:39的核苷酸序列。

13. 根据权利要求3所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中PGA5的表达降低,并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:10的序列和在反义链中包含SEQ ID NO:41的序列。

14. 根据权利要求3所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中ABCA10的表达降低,

并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:11的序列和在反义链中包含SEQ ID NO:42的序列。

15. 根据权利要求2所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述核酸酶选自自由锌指核酸酶(ZFN)、大范围核酸酶、转录激活物样效应物核酸酶(TALEN)和成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白组成的组。

16. 根据权利要求1所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中用CRISPR基因组编辑使所述表达降低。

17. 根据权利要求16所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述CRISPR基因组编辑使用指导RNA(gRNA)对,其中每个gRNA:

- (a) 包含选自SEQ ID NO:12-15的核苷酸序列的序列,和/或
- (b) 靶向选自SEQ ID NO:16-31的任一核苷酸序列的靶DNA序列。

18. 根据权利要求17所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述gRNA对用于靶向KCNN2并且包含含有SEQ ID NO:12的序列的第一gRNA分子和含有SEQ ID NO:13的序列的第二gRNA分子。

19. 根据权利要求17所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述gRNA对用于靶向KCNN2并且包含含有SEQ ID NO:14的序列的第一gRNA分子和含有SEQ ID NO:15的序列的第二gRNA分子。

20. 根据权利要求18或19所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中每个gRNA分子是2'-O-甲基类似物,在其5'和3'端的任一者或两者上的末端三个核苷酸中包含3'硫代磷酸酯核苷酸间键。

21. 根据权利要求1所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中与相应未修饰的亲本细胞相比,所述基因表达消除。

22. 根据权利要求1所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述细胞系是人细胞系。

23. 根据权利要求22所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述人细胞系是HeLa细胞系或人胚肾(HEK)293细胞系。

24. 根据权利要求23所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述细胞系是rAAV包装细胞系。

25. 根据权利要求23所述的包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述细胞系是rAAV生产细胞系。

26. 一种产生rAAV生产细胞系的方法,所述方法包括将rAAV载体递送至根据权利要求24所述的rAAV包装细胞系的细胞。

27. 一种产生rAAV的方法,所述方法包括用辅助病毒感染由根据权利要求26所述的方法产生的rAAV生产细胞系的细胞。

28. 一种产生rAAV的方法,所述方法包括用辅助病毒感染根据权利要求25所述的rAAV生产细胞系的细胞。

29. 根据权利要求27所述的方法,其中所述rAAV从所述rAAV生产细胞系收获。

30. 根据权利要求28所述的方法,其中所述rAAV从所述rAAV生产细胞系收获。

31. 根据权利要求27至30中任一项所述的方法,其中与相应未修饰的亲本细胞系相比,

rAAV的产生得到增强。

32. 一种重组腺相关病毒 (rAAV) 包装细胞系和/或生产细胞系, 与相应未修饰的亲本细胞相比, 其包含经工程化以具有KCNN2的表达降低的细胞, 或者具有KCNN2的表达降低和RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP或NALCN-AS1的表达降低的细胞。

33. 根据权利要求32所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系, 其中KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP或NALCN-AS1的表达被无限期或永久性地降低。

34. 根据权利要求33所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系, 其包含经工程化以在KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP或NALCN-AS1中的至少一种中包含基因破坏的细胞。

35. 根据权利要求33所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系, 其包含经工程化以在选自KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP和NALCN-AS1中的至少两种基因中包含基因破坏的细胞。

36. 根据权利要求33所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系, 其包含经工程化以在KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP或NALCN-AS1中的至少一种中包含部分或完全基因缺失的细胞。

37. 根据权利要求33所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系, 其包含经工程化以在选自KCNN2、RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP和NALCN-AS1中的至少两种基因中包含部分或完全基因缺失的细胞。

38. 根据权利要求34-37中任一项所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系, 其中用成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 基因组编辑使所述表达降低。

39. 根据权利要求38所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系, 其中所述CRISPR基因组编辑使用指导RNA (gRNA) 对, 其中每个gRNA:

- (a) 包含选自SEQ ID NO: 12-15的核苷酸序列的序列, 和/或
- (b) 靶向选自SEQ ID NO: 16-31的任一核苷酸序列的靶DNA序列。

40. 根据权利要求39所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系, 其中所述gRNA对用于靶向KCNN2并且包含含有SEQ ID NO: 12的序列的第一gRNA分子和含有SEQ ID NO: 13的序列的第二gRNA分子, 或者其中所述gRNA对用于靶向KCNN2并且包含含有SEQ ID NO: 14的序列的第一gRNA分子和含有SEQ ID NO: 15的序列的第二gRNA分子。

41. 根据权利要求40所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系, 其中每个gRNA分子是2' O-甲基类似物, 在其5'和3'端的任一者或两者上的末端三个核苷酸中包含3'硫代磷酸酯核苷酸间键。

42. 一种重组腺相关病毒 (rAAV) 包装细胞系和/或生产细胞系, 与相应未修饰的亲本细胞系相比, 所述细胞系包含表现出由KCNN2表达的多肽或多核糖核苷酸的表达降低的细胞, 或者表现出由KCNN2表达的多肽或多核糖核苷酸的表达降低的细胞和RGMA、ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、SPANXN3、PGA5、MYRIP或NALCN-AS1表达的多肽或多核糖核苷酸的表达降低的细胞。

43. 根据权利要求32-42中任一项所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系, 其中所述

细胞系是人细胞系。

44. 根据权利要求43所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述人细胞系是HeLa细胞系或人胚肾(HEK)293细胞系。

## 工程化的生产细胞系及其制备和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年4月12日提交的美国临时专利申请号62/833,548;于2019年4月26日提交的美国临时专利申请号62/839,207;以及于2020年2月21日提交的美国临时专利申请号62/979,483的权益和优先权,出于所有目的,其公开内容通过引用以其全文并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已以ASCII格式电子提交,并通过引用以其全文特此并入。所述ASCII副本创建于2020年4月9日,名为ULP-005W0\_SL.txt,大小为113kb字节。

### 技术领域

[0005] 本申请总体上涉及工程化的生产细胞系和/或包装细胞系以及产生用于增加重组腺相关病毒(rAAV)滴度的工程化的生产细胞系和/或包装细胞系的方法。

### 背景技术

[0006] 基于rAAV的载体是用于人基因治疗的最有希望的载体之一。rAAV载体被考虑用于广泛多种基因治疗应用。具体地讲,rAAV载体可将治疗性基因递送至分裂和非分裂细胞,并且这些基因可持续较长时间而不整合到靶细胞的基因组中。尽管用于产生rAAV的系统在过去二十年中已经发展,但仍有几个问题有待解决。rAAV生产系统的一个限制是rAAV颗粒的低滴度产量。基于rAAV的基因产物在临床前阶段的药物开发需要大量rAAV载体用于在较大物种中的研究,以实现有助于预测人类剂量的完全毒理学和生物分布研究。此外,因为目前的rAAV生产系统导致低滴度产量,所以制造用于人体试验和商业应用的足够水平的rAAV是有挑战性的。研究人员已经探索了许多方法来产生足够高滴度的rAAV颗粒,但是仍然非常需要解决这个问题。特别地,需要能够以高滴度产率产生高质量rAAV的有效细胞系。通过本文所述的工程化细胞系产生高滴度rAAV加速了这种载体系统用于体内基因治疗用途的应用。

### 发明内容

[0007] 本公开通过提供包含其中一种或多种基因和/或蛋白已被修饰的细胞的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系解决了获得用于基因治疗应用的改善的rAAV滴度的需要。本文还描述了鉴定与rAAV的产生相关的一种或多种基因和/或蛋白的方法,以及产生工程化的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系的方法。

[0008] 本文描述了产生rAAV包装细胞系和/或生产细胞系的组合物和方法,所述rAAV包装细胞系和/或生产细胞系包含与对照亲本细胞相比可产生更高滴度的rAAV的细胞。更具体地,本文提供了rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其包含其中一种或多种基因和/或蛋白的表达被调节,导致与对照亲本细胞相比更高的rAAV滴度的细胞。在一个方面,本公开提供了rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其包含与对照亲本细胞相比一种或多种基因和/或

蛋白的表达降低的细胞。例如,与对照亲本细胞相比,ATP5EP2(ATP合酶F1亚基ε假基因2)、LINC00319(长基因间非蛋白编码RNA319)、CYP3A7(细胞色素P450家族3亚家族A成员7)、ABCA10(ATP结合盒亚家族A成员10)、NOG(Noggin)、RGMA(排斥性引导分子BMP共受体A)、SPANX3(SPANX家族成员N3)、PGA5(胃蛋白酶原A5)、MYRIP(肌球蛋白VIIA和Rab相互作用蛋白)、KCNN2(钾钙激活通道亚家族N成员2)和/或NALCN-AS1(NALCN反义RNA1)的表达降低。

[0009] 在一些实施方案中,本公开提供了包含其中与对照亲本细胞相比,KCNN2、LINC00319、RGMA和SPANX3的表达降低的细胞的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系。

[0010] 在某些实施方案中,本公开提供了rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其包含经工程化以与相应未修饰的亲本细胞相比降低由ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANX3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1表达的基因产物的表达和/或活性的细胞。在某些实施方案中,本公开提供了rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其与相应的亲本细胞系相比,表现出由ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANX3、PGA5、MYRIP、KCNN2和NALCN-AS1中的至少一种表达的多肽或多核糖核苷酸的表达和/或活性降低。

[0011] 在一个方面,本公开提供了rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中使用核酸酶、双链RNA(dsRNA)、小干扰RNA(siRNA)、小发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)或反义RNA寡核苷酸(ASO)降低一种或多种基因的表达。

[0012] 在某些实施方案中,用包含选自序列SEQ ID NO:1-11中任一个的核苷酸序列的siRNA降低一种或多种基因的表达。例如,在一些实施方案中,ATP5EP2的表达降低,并且siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:32的核苷酸序列。在一些实施方案中,LINC00319的表达降低,并且siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:33的核苷酸序列。在一些实施方案中,CYP3A7的表达降低,并且siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:34的核苷酸序列。在一些实施方案中,NOG的表达降低,并且siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:4的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:35的核苷酸序列。在一些实施方案中,SPANX3的表达降低,并且siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。在一些实施方案中,MYRIP的表达降低,并且siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列。在一些实施方案中,KCNN2的表达降低,并且siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:38的核苷酸序列。在一些实施方案中,NALCN-AS1的表达降低,并且siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:39的核苷酸序列。在一些实施方案中,RGMA的表达降低,并且siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列。在一些实施方案中,PGA5的表达降低,并且siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:10的序列和在反义链中包含SEQ ID NO:41的序列。在一些实施方案中,ABCA10的表达降低,并且siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:11的序列和在反义链中包含SEQ ID NO:42的序列。

[0013] 在某些实施方案中,用于降低一种或多种基因表达的核酸酶选自由锌指核酸酶(ZFN)、大范围核酸酶、转录激活物样效应物核酸酶(TALEN)或成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白组成的组。

[0014] 在某些实施方案中,使用CRISPR基因组编辑降低一种或多种基因的表达。在一些实施方案中,指导RNA对用于靶向基因以减少和/或消除该基因的表达。在某些实施方案中,使用指导RNA对降低一种或多种基因的表达,其中每个指导RNA:(a)包含选自SEQ ID NO:12-15的核苷酸序列的序列,和/或(b)靶向选自SEQ ID NO:16-31的任一核苷酸序列的靶DNA序列。例如,在一些实施方案中,gRNA对用于靶向KCNN2并且包含含有SEQ ID NO:12的序列的第一gRNA分子和含有SEQ ID NO:13的序列的第二gRNA分子。在一些实施方案中,gRNA对用于靶向KCNN2并且包含含有SEQ ID NO:14的序列的第一gRNA分子和含有SEQ ID NO:15的序列的第二gRNA分子。在一些实施方案中,每个gRNA分子是2'-O-甲基类似物,在其5'和3'末端的任一者或两者上的末端三个核苷酸中包含3'硫代磷酸酯核苷酸间键。

[0015] 在某些实施方案中,一对指导RNA用于降低一种基因的表达。在某些其他实施方案中,使用多对指导RNA来降低一种或多种基因的表达。在某些实施方案中,与对照亲本细胞系相比,rAAV包装细胞系和/或生产细胞系中一种或多种基因的基因表达和/或一种或多种基因和/或蛋白的活性降低和/或消除。在某些实施方案中,与对照亲本细胞相比,rAAV包装和/或生产细胞中的基因表达和/或活性消除。

[0016] 在本文所述的一些实施方案中,rAAV包装细胞系和/或生产细胞系是真核细胞系。在某些实施方案中,rAAV包装细胞系和/或生产细胞系是人细胞系。在某些实施方案中,rAAV包装细胞系和/或生产细胞系是昆虫细胞系。在某些实施方案中,rAAV包装细胞系和/或生产细胞系是HeLa细胞系。在某些其他实施方案中,rAAV包装细胞系和/或生产细胞系是人胚肾(HEK)293细胞系。

[0017] 在本文所述的一些实施方案中,本公开的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系产生比对照亲本细胞系更高的rAAV滴度。在某些实施方案中,与从包含对照亲本细胞的细胞系产生的rAAV的滴度相比,由本公开的rAAV生产细胞系的细胞产生的rAAV的滴度增加约1.5至约7倍。本文还描述了工程化细胞系的裂解物。在某些实施方案中,从裂解物中收获较高滴度的rAAV。本文还描述了来自工程化细胞系的细胞培养物上清液。在某些实施方案中,从细胞培养物上清液中收获较高滴度的rAAV。

[0018] 本文还描述了产生生产细胞系的方法,其中所述方法包括将rAAV载体递送至包装细胞系的细胞,其中与对照亲本细胞相比,ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1的表达降低。在某些实施方案中,本公开提供了产生生产细胞系的方法,其中所述方法包括将rAAV载体递送至包装细胞系的细胞,其中与对照亲本细胞相比,KCNN2、LINC00319、RGMA和SPANXN3的表达降低。

[0019] 本文还描述了通过用辅助病毒感染由包装细胞系产生的生产细胞系的细胞来产生rAAV的方法,其中与对照亲本细胞相比,包装细胞系中ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1的表达降低。在某些实施方案中,与对照亲本细胞相比,包装细胞系中KCNN2、LINC00319、RGMA和SPANXN3的表达降低。

[0020] 在一个方面,本公开提供了通过用辅助病毒感染生产细胞系的细胞来产生rAAV的方法,其中与对照亲本细胞相比,生产细胞系中ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1的表达降低。在某些实施方案中,本公开提供了通过用辅助病毒感染生产细胞系的细胞来产生rAAV的方法,其中与对照亲本细胞相比,生产细胞系中KCNN2、LINC00319、RGMA和SPANXN3的表达降低。

[0021] 本文还描述了从生产细胞系收获rAAV的方法,其中与对照亲本细胞系相比,ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1的表达降低。还描述了从生产细胞系收获rAAV的方法,其中与对照亲本细胞系相比,KCNN2、LINC00319、RGMA和SPANXN3的表达降低。在某些实施方案中,与对照亲本细胞系相比,从本公开的生产细胞系的rAAV产生得到增强。

[0022] 本文还描述了鉴定与rAAV产生相关的一种或多种基因的方法,其中所述方法包括i.)添加一种或多种增加细胞系中rAAV滴度的补充剂;ii.)在经补充和未经补充的细胞系中测量跨转录组的全局基因表达;iii.)获得在经补充和未经补充的细胞系之间差异表达的基因列表;以及iv.)鉴定与rAAV的产生相关的一种或多种基因。在一些实施方案中,一种或多种鉴定的基因负责减少rAAV的产生。

[0023] 本文还描述了产生rAAV包装细胞系和/或生产细胞系以促进rAAV的产生增加的方法。在一些实施方案中,通过调节从在经补充和未经补充的rAAV生产细胞系之间差异表达的基因列表中鉴定的一种或多种基因和/或蛋白质的表达来增加rAAV产生。在某些实施方案中,通过调节从在经补充和未经补充的rAAV生产细胞系之间差异表达的基因列表中鉴定的一种或多种基因和/或蛋白质的表达来增加rAAV滴度。在一些实施方案中,与未调节的细胞系的rAAV滴度相比,一种或多种基因和/或蛋白的调节增加rAAV滴度至少1.5倍。在某些实施方案中,调节表达是降低一种或多种基因的表达。在某些实施方案中,调节表达包括降低一种或多种蛋白质的表达。在某些实施方案中,调节表达是消除一种或多种基因的表达。在某些实施方案中,调节表达包括消除一种或多种蛋白质的表达。

[0024] 在一些实施方案中,rAAV包装细胞系和/或生产细胞系是真核细胞系。在某些实施方案中,细胞系是人细胞系。在某些实施方案中,细胞系是昆虫细胞系。在某些实施方案中,细胞系是HeLa细胞系。在某些实施方案中,细胞系是人胚肾(HEK)293细胞系。

[0025] 本文还描述了重组腺相关病毒(rAAV)包装细胞系和/或生产细胞系,其包含经工程化以与相应未修饰的亲本细胞相比降低由ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1表达的基因产物的表达和/或活性的细胞。

[0026] 在一些实施方案中,由ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1表达的基因产物的表达和/或活性被无限期或永久性地降低。

[0027] 在一些实施方案中,细胞系已被工程化以在ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1中的至少一种中包含基因破坏或部分或完全基因缺失。

[0028] 在一些实施方案中,细胞系已被工程化以在ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1中的至少一种中包含基因破坏。

[0029] 在一些实施方案中,细胞系已被工程化以在选自ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1的至少两种基因中包含基因破坏。

[0030] 在一些实施方案中,细胞系已被工程化以在ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1中的至少一种中包含部分或完全基

因缺失。

[0031] 在一些实施方案中,细胞系已被工程化以在选自ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1的至少两种基因中包含部分或完全基因缺失。

[0032] 还提供了包装细胞系和/或生产细胞系,其中与相应的亲本细胞系相比,所述细胞系表现出由ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和NALCN-AS1中的至少一种表达的多肽或多核糖核苷酸的表达和/或活性降低。

[0033] 从以下具体实施方式和权利要求中,本公开的其他特征和优点将是显而易见的。

[0034] 除非有相反的说明,否则本文引用的所有出版物、参考文献、专利和/或专利申请均出于所有目的通过引用整体并入本文。

## 附图说明

[0035] 参考以下附图可以更全面地理解本公开。

[0036] 图1是产生本文所述的rAAV包装细胞和生产细胞的方法的示意图。

[0037] 图2A-2D显示从HPRT1 siRNA敲除实验的优化和开发产生的实验数据。图2A-2B显示了在24孔中进行的HPRT1 siRNA敲低实验产生的敲低百分比(图2A)和蛋白质表达(图2B)数据。图2C-2D显示了在6孔中进行的HPRT1 siRNA敲低实验产生的敲低百分比(图2C)和蛋白质表达(图2D)数据。

[0038] 图3A-3B显示从PGA5(图3A)和SPANXN3(图3B)的RNA-Seq数据的生物信息学分析获得的基因表达的对数倍数变化值,表示为在未经补充的细胞培养基中培养的细胞相对于未感染的细胞(未用辅助病毒感染的细胞)的基因表达的对数倍数变化,和在经补充的细胞培养基中培养的细胞相对于在未经补充的细胞培养基中培养的细胞的基因表达的对数倍数变化。图3C-3D显示相对于未感染的细胞,在未经补充和经补充的细胞培养基中培养的细胞中PGA5(图3C)和SPANXN3(图3D)的表达的RT-qPCR倍数变化值。

[0039] 图4A-4B显示了相对于未感染细胞(未用辅助病毒感染的细胞),在未经补充的细胞培养基和经补充的细胞培养基中培养的生产细胞系克隆中PGA5(图4A)和SPANXN3(图4B)表达的倍数变化值,如RT-qPCR确定。21C5、3C6、2B6代表HeLa生产细胞系的不同克隆。图4C-4D显示与在未经补充的细胞培养基中培养的克隆相比,在经补充的细胞培养基中培养的生产细胞系克隆21C5、3C6、2B6中PGA5(图4C)和SPANXN3(图4D)表达的相对倍数增加。

[0040] 图5A-5F显示降低不同生产细胞系中单个基因的表达对rAAV滴度的影响。这些图显示了生产细胞系#1(图5A)、生产细胞系#2(图5B)和生产细胞系#3(图5C)以基因组拷贝(GC)/毫升(mL)产生的rAAV基因组的滴度。图5D-5F显示由生产细胞系#1(图5D)、生产细胞系#2(图5E)和生产细胞系#3(图5F)产生的rAAV的滴度的倍数变化。图5A-5B显示3个生物重复的平均值。图5C-5F显示4个生物重复的平均值。

[0041] 图6是示出示例性基因过滤方法的说明性流程图。

[0042] 图7A显示了前19个2H5敲除克隆的24深孔滴度。滴度报告为基因组拷贝数/mL。对样品是未修饰的2H5。图7B显示了与2H5对照相比滴度的倍数变化。2H5滴度设为1,其他滴度显示为高于2H5对照的倍数增加。图7C显示了前19个7B12敲除克隆的24深孔滴度。滴度报告为基因组拷贝数/mL。对样品是未修饰的7B12。图7D显示了与7B12对照相比滴度的倍数

变化。7B12滴度设为1,其他滴度显示为高于7B12对照的倍数增加。

[0043] 图8A显示了前五个2H5敲除克隆的 **ambr**<sup>®</sup> 15滴度。滴度报告为基因组拷贝数/mL。对照样品是未修饰的2H5。图8B显示了与2H5对照相比滴度的倍数变化。2H5滴度设为1,其他滴度显示为高于2H5对照的倍数增加。图8C显示了前四个7B12敲除克隆的 **ambr**<sup>®</sup> 15滴度。滴度报告为基因组拷贝数/mL。对照样品是未修饰的7B12。图8D显示了与7B12对照相比滴度的倍数变化。7B12滴度设为1,其他滴度显示为高于7B12对照的倍数增加。

[0044] 图9A-9B显示了通过降低两种生产细胞系中各种基因组组合的表达而产生的对rAAV滴度的影响。该图显示与用错义siRNA处理的对照相比,rAAV滴度的倍数变化。图9A显示了与2H5错义对照相比,滴度的倍数变化。2H5错义滴度设为1,其他滴度显示为高于2H5错义对照的倍数增加。图9B显示了与7B12错义对照相比,滴度的倍数变化。7B12错义滴度设定为1,其他滴度显示为高于7B12错义对照的倍数增加。

### 具体实施方式

[0045] 本公开描述了重组腺相关病毒(rAAV)包装细胞系和/或生产细胞系,其包含其中一种或多种基因和/或蛋白的表达被调节的细胞。与其中一种或多种基因和/或蛋白质的表达未被调节的细胞系相比,基因表达的调节导致增加的滴度产率。

[0046] 除非另有说明,技术术语均按惯例使用。分子生物学中常用术语的定义可以在以下中找到:Benjamin Lewin,Genes V[基因V],由Oxford University Press[牛津大学出版社]出版,1994(ISBN 0-19-854287-9);Kendrew等人(编辑.),The Encyclopedia of Molecular Biology[分子生物学百科全书],由Blackwell Science Ltd.[布莱克威尔科学公司]出版,1994(ISBN 0-632-02182-9);和Robert A.Meyers(编辑),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference[分子生物学和生物技术:综合案头参考],由VCH Publishers[VCH出版公司]出版,1995(ISBN 1-56081-569-8)。

[0047] 包括以下定义是为了理解本主题和构建所附专利权利要求。本文所用的缩写具有其在化学和生物领域内的常规含义。

[0048] 定义

[0049] 如本文所用,“调节(modulation或modulate)”是指基因和/或蛋白质的调控、表达或活性的改变。调节可以是增加、减少(降低)或消除一种或多种基因和/或蛋白质的表达和/或活性。在调节多个基因和/或蛋白的情况下,基因和/或蛋白的所有表达和/或活性可以增加,或基因和/或蛋白的所有表达和/或活性可以降低,或一种或多种基因和/或蛋白可以增加而其他基因和/或蛋白可以降低。

[0050] 本文所用的术语“细胞”是指能够产生重组腺相关病毒(rAAV)的任一种或多种细胞。在一些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞,例如HeLa细胞、COS细胞、HEK293细胞、A549细胞、BHK细胞或Vero细胞。在其他实施方案中,细胞是昆虫细胞,例如Sf9细胞、Sf-21细胞、Tn-368细胞或BTI-Tn-5B1-4(High-Five)细胞。术语“细胞系”是指能够继续分裂而不经历衰老的克隆细胞群。除非另有说明,术语“细胞”或“细胞系”应理解为包括所示细胞或细胞系的经修饰或工程化变体。

[0051] 如本文所用,术语“工程化的细胞系”是指已通过一种或多种方式修饰以降低一种

或多种内源表达基因和/或蛋白质(例如ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1)的表达或其他特性(例如生物活性)从而增加rAAV产生的细胞系。

[0052] 如本文所用,术语“对照亲本细胞”是指未通过一种或多种方式修饰以降低一种或多种内源表达基因和/或蛋白质(例如ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1)的表达或其他特性(例如生物活性)从而增加rAAV产生的细胞。

[0053] 如本文所用,术语“对照亲本细胞系”是指能够继续分裂并且不经历衰老的对照亲本细胞的克隆群体。

[0054] “裂解”是指细胞的分解,通常通过损害其完整性的病毒、酶或渗透机制。“裂解的细胞”是已经经历实质裂解的细胞。如本文所用,术语“裂解物”是指含有裂解的细胞的内容物的流体。

[0055] 如本文所用,术语“较高滴度”表示与未修饰的对照亲本细胞系和/或对照亲本细胞产生的滴度相比增加的滴度。

[0056] 如本文所用,术语“细胞培养上清液”是指其中悬浮和/或培养细胞的细胞培养基。

[0057] 如本文所用,术语“基因”是指转录单元和与所述转录单元相邻(例如,位于上游和下游)且可操作地连接的调控区。转录单元是一系列转录成RNA分子的核苷酸。转录单元可以包括编码区。“编码区”是编码未加工的前体RNA(即,包括外显子和内含子的RNA分子)的核苷酸序列,前体RNA随后被加工成mRNA。转录单元可以编码非编码RNA。非编码RNA是不翻译成蛋白质的RNA分子。非编码RNA的实例包括微RNA。转录单元的边界通常由其5'端的起始位点和其3'端的转录终止子决定。“调控区”是调节与其可操作连接的转录单元的表达的核苷酸序列。调节序列的非限制性实例包括启动子、增强子、转录起始位点、翻译起始位点、翻译终止位点、转录终止子和聚(A)信号。位于转录单元上游的调控区可称为5'UTR,位于转录单元下游的调控区可称为3'UTR。调控区可以被转录并且是未加工的前体RNA的一部分。

[0058] 在本文的上下文中,术语“靶”或“靶基因”是指任何基因,包括编码蛋白质的基因和编码非编码RNA(例如miRNA)的基因,其在被调节时改变病毒产生的某些方面。靶基因包括内源基因、病毒基因和转基因。

[0059] 关于基因名称,单个基因通常用多个符号表示。在本文的上下文中,基因符号,无论是人类的还是非人类的,都可以用大写或小写字母来表示。在这些公开的上下文中,使用一个特定符号或采用小写或大写符号都不旨在限制基因的范围。除非另有说明,本文中鉴定的所有基因标识号(GeneID)均来自国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)“Entrez Gene”或KEGG网站。

[0060] 本文所用的术语“约”是指大约、在区域内、大致或周围。当术语“约”与数值范围结合使用时,其通过在允许的数值范围内扩展高于和/或低于所述数值的边界来修饰该范围。

[0061] 如本公开中所使用的,无论是在过渡性短语中还是在权利要求的主体中,术语“包含(comprise(s)和comprising)”应被解释为具有开放式含义。即,该术语应被解释为与短语“至少具有”或“至少包括”同义。当在方法的上下文中使用时,术语“包含”是指该方法至少包括所述的步骤,但可以包括另外的步骤。当在组合物的上下文中使用时,术语“包含”是指组合物至少包括所述的特征或组分,但也可包括另外的特征或组分。

[0062] 为了促进对文中描述的实施方案的理解,使用对优选实施方案和特定语言的引用来描述它们。本文中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并且不旨在限制本公开的范围。如整个本公开使用的,单数形式“一(a, an)”和“所述”包括复数引用,除非上下文另外清楚地指明。除非另外指明,否则本文所用的所有百分比和比率均按重量计。

[0063] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术术语和科学术语具有与本披露内容所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的意义。虽然与本文描述的那些方法和材料类似或等同的方法和材料可以用于本披露的实践或测试,但是以下描述合适的方法和材料。此外材料、方法和实施例仅为说明性的并且不旨在是限制性的。所有的公开物、专利申请、专利、以及本文提及的其他参考文献通过引用并入。

[0064] 腺相关病毒(AAV):

[0065] AAV是一种小的、复制缺陷的、无包膜的病毒,其感染人类和一些其他灵长类物种。AAV已知不会引起疾病并引发非常温和的免疫应答。利用AAV的基因疗法载体可以感染分裂细胞和休眠细胞,并且能以染色体外状态持续存在而不整合到宿主细胞的基因组中。这些特征使AAV成为一种有吸引力的基因疗法病毒载体。AAV包括许多血清学上可区分的类型,包括血清型AAV-1至AAV-12,以及来自非人灵长类的超过100种血清型(参见,例如, Srivastava, J. Cell Biochem. [细胞生物化学杂志], 105(1):17-24(2008), 以及Gao等人, J. Virol. [病毒学杂志], 78(12), 6381-6388(2004))。AAV是非自主复制的,并且具有包含潜伏期和感染期的生命周期。在潜伏期,细胞被AAV感染后,AAV作为前病毒位点特异性地整合到宿主基因组中。除非细胞也被允许AAV复制的辅助病毒(例如,腺病毒(AV)或单纯疱疹病毒)感染,否则不会发生感染阶段。

[0066] 野生型AAV基因组含有两个具有145个核苷酸的反向末端重复序列(ITR),其含有指导AAV复制、基因组衣壳化和整合的信号序列。除ITR外,三种AAV启动子p5、p19和p40驱动编码rep和cap基因的两个开放阅读框的表达。与单个AAV内含子的差异剪接偶联的两个rep启动子导致从rep基因产生四种rep蛋白(Rep 78、Rep 68、Rep 52和Rep 40)。Rep蛋白负责基因组复制。cap基因由p40启动子表达,并编码三个衣壳蛋白(VP1、VP2和VP3),它们是cap基因的剪接变体。这些蛋白质形成AAV颗粒的衣壳。

[0067] 因为用于复制、衣壳化和整合的顺式作用信号包含在ITR内,所以4.3kb内部基因组的一些或全部可以被外源DNA,例如用于感兴趣的外源蛋白质的表达盒代替。在这种情况下,rep和cap蛋白反式提供在例如质粒上。为了产生AAV载体,允许AAV复制的细胞系必须表达rep和cap基因、ITR侧翼表达盒和由辅助病毒提供的辅助功能,例如AV基因E1a、E1b55K、E2a、E4orf6和VA(Weitzman等人, Adeno-associated virus biology [腺相关病毒生物学]. Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols [腺相关病毒:方法和方案], 第1-23页, 2011)。AAV载体的产生也可导致辅助病毒颗粒的产生,辅助病毒颗粒必须在使用AAV载体之前除去或灭活。许多细胞类型适于产生AAV载体,包括HEK293细胞、COS细胞、HeLa细胞、BHK细胞、Vero细胞以及昆虫细胞(参见例如美国专利号6,156,303、5,387,484、5,741,683、5,691,176、5,688,676、8,163,543、美国公开号20020081721、PCT公开号W0 00/47757、W000/24916和W0 96/17947)。AAV载体通常在这些细胞类型中由一种含有ITR侧翼表达盒的质粒和一种或多种提供另外AAV和辅助病毒基因的另外质粒产生。

[0068] 任何血清型的AAV可用于本发明。类似地,预期可以使用任何AV类型,并且本领域

技术人员将能够鉴定适于产生其期望的重组AAV载体 (rAAV) 的AAV和AV类型。AAV和AV颗粒可以例如通过亲和层析、碘克沙醇梯度或CsCl梯度纯化。

[0069] 野生型AAV的基因组是单链DNA,为4.7kb。AAV载体可具有大小为4.7kb或大于或小于4.7kb的单链基因组,包括大至5.2kb或小至3.0kb的超大基因组。此外,载体基因组可以基本上是自身互补的,使得在病毒内基因组基本上是双链的。含有所有类型基因组的AAV载体适用于本公开的方法。

[0070] 如上所述,AAV需要用辅助病毒共感染以进入其生命周期的感染阶段。辅助病毒包括腺病毒 (AV) 和单纯疱疹病毒 (HSV),并且存在使用杆状病毒在昆虫细胞中产生AAV的系统。也已经提出乳头状瘤病毒也可以为AAV提供辅助功能(参见,例如,Hermonat等人, *Molecular Therapy* [分子疗法] 9, S289-S290 (2004))。辅助病毒包括能够产生和允许AAV复制的任何病毒。AV是一种无包膜的核DNA病毒,其双链DNA基因组为约36kb。AV能够通过提供E1a、E1b55K、E2a、E4orf6和VA基因并允许AAV复制和衣壳化来拯救细胞中潜伏的AAV前病毒。HSV是具有包裹在二十面体衣壳中的相对大的双链线性DNA基因组的病毒家族,所述二十面体衣壳包裹在脂双层包膜中。HSV具有感染性和高传染性。以下HSV-1复制蛋白被鉴定为AAV复制所必需的:解旋酶/引发酶复合物 (UL5、UL8和UL52) 和由UL29基因编码的DNA结合蛋白ICP8,以及增强辅助功能的其他蛋白。AAV包装系统具有两个目的:它避免了转染方法的问题,并提供了基于使用一种或几种辅助功能的生产技术。

[0071] rAAV的产生

[0072] rAAV的一般原理可以在别处综述(参见,例如,Carter,1992, *Current Opinions in Biotechnology* [生物技术的最新观点], 3:533-539;以及Muzyczka,1992, *Curr. Topics in Microbiol. and Immunol.* [微生物学和免疫学的当前主题], 158:97-129)。一般而言,为了允许产生rAAV,必须给细胞提供AAVITR(其可以例如侧接感兴趣的异源核苷酸序列)、AAV rep和cap基因功能、以及另外的辅助功能。这些可以使用任何数量的合适质粒或载体提供给细胞。另外的辅助功能可以由例如腺病毒 (AV) 感染、携带所有所需AV辅助功能基因的质粒或其他病毒如HSV或杆状病毒提供。细胞产生rAAV所必需的任何基因、基因功能或遗传物质可瞬时存在于细胞内,或稳定插入细胞基因组中。适用于本公开方法使用的rAAV生产方法包括以下中披露的那些:Clark等人, *Human Gene Therapy* [人基因疗法] 6:1329-1341 (1995), Martin等人, *Human Gene Therapy Methods* [人基因疗法方法] 24:253-269 (2013), Thorne等人, *Human Gene Therapy* [人基因疗法] 20:707-714 (2009), Fraser Wright, *Human Gene Therapy* [人基因疗法] 20:698-706 (2009), 和Virag等人, *Human Gene Therapy* [人基因疗法] 20:807-817 (2009)。AAV产生系统的两种主要方法是重组腺相关病毒 (rAAV) 包装细胞系和腺相关病毒 (rAAV) 生产细胞系。

[0073] 重组腺相关病毒 (rAAV) 包装细胞系和/或生产细胞系

[0074] rAAV包装细胞系可通过允许本文所述AAV遗传元件的细胞表达来产生。用编码AAV rep和cap基因的质粒稳定转染细胞系(例如HEK293、HeLa)可产生包装细胞系。该rAAV包装细胞系可以用两种不同的腺病毒(辅助病毒和含有AAV基因治疗元件的杂合病毒)共感染以产生rAAV颗粒。可替代地,用含有rAAV载体的质粒稳定转染包装细胞或用rAAV载体感染它们产生rAAV生产细胞系。用辅助病毒感染产生细胞导致rAAV的产生。图1说明包装细胞系和生产细胞系。

[0075] 在本公开的某些实施方案中,将包含AAV rep和cap基因功能的rAAV包装细胞系工程化以增加rAAV滴度。

[0076] 在一个方面,本公开提供了rAAV包装细胞系,其包含其中与对照亲本细胞相比,一种或多种基因和/或蛋白的表达降低的细胞。例如,与对照亲本细胞相比,ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1的表达降低。

[0077] 在一些实施方案中,本公开提供了rAAV包装细胞系,其包含其中与对照亲本细胞相比,KCNN2、LINC00319、RGMA和SPANXN3的表达降低的细胞。

[0078] 在其他实施方案中,本公开提供了rAAV生产细胞系,其包含其中与对照亲本细胞相比,一种或多种基因和/或蛋白的表达降低的细胞。例如,与对照亲本细胞相比,ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1的表达降低。在一些实施方案中,本公开的rAAV生产细胞系已被工程化以减少KCNN2、LINC00319、RGMA和SPANXN3的基因表达。

[0079] 在某些实施方案中,本公开的细胞系可以是粘附或悬浮形式。

[0080] 在某些实施方案中,本公开的细胞系(例如rAAV包装细胞系和/或生产细胞系)是哺乳动物细胞系(例如HeLa、人胚肾(HEK) 293、COS、A549或Vero细胞系)。在某些实施方案中,细胞系是昆虫细胞系(例如Sf9、Sf-21、Tn-368、或BTI-Tn-5B1-4)。

[0081] 产生rAAV生产细胞系的方法

[0082] 在一些实施方案中,本公开提供了通过将rAAV载体递送至包含其中与对照细胞相比,ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1的表达降低的细胞的工程化rAAV包装细胞系来产生生产细胞系的方法。

[0083] 在某些实施方案中,本公开提供了通过将rAAV载体递送至包含其中与对照亲本细胞相比,KCNN2、LINC00319、RGMA和SPANXN3的表达降低的细胞的工程化rAAV包装细胞系来产生生产细胞系的方法。

[0084] 补充剂

[0085] 如本文所用,术语“补充剂”是指任何化学或生物来源的化合物或其他材料,其可用于细胞培养的培养基中以增加rAAV滴度或测定rAAV滴度的增加。补充剂的非限制性实例包括氨基酸、盐、金属、糖、脂质、核酸、激素、维生素、脂肪酸、蛋白质、酶、核苷、代谢物、表面活性剂、乳化剂、无机盐和聚合物。在某些实施方案中,添加到本公开的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系中的一种或多种补充剂是糖皮质激素类似物。在某些实施方案中,加入rAAV包装细胞系和/或生产细胞系的一种或多种补充剂包括地塞米松、氢化可的松、泼尼松龙、甲泼尼龙、倍他米松、可的松、泼尼松、布地奈德和/或曲安西龙。

[0086] 在某些实施方案中,用于增加rAAV滴度的溶液中糖皮质激素类似物的浓度可以大于或等于 $1\mu\text{M}$ 、大于或等于 $0.1\mu\text{M}$ 、大于或等于 $0.01\mu\text{M}$ 、在0和 $1\mu\text{M}$ 之间、在0和 $0.1\mu\text{M}$ 之间、在0和 $0.01\mu\text{M}$ 之间、在 $0.01$ 和 $1\mu\text{M}$ 之间、或在 $0.01$ 和 $0.1\mu\text{M}$ 之间。

[0087] 如本文所用,“经补充的细胞系”是指其中已添加一种或多种补充剂(例如糖皮质激素类似物)以增加rAAV滴度的细胞系(例如rAAV包装细胞系和/或生产细胞系)。如本文所用,“未经补充的细胞系”是指未暴露于用于增加rAAV滴度的一种或多种补充剂的细胞系(例如rAAV包装细胞系和/或生产细胞系)。如本文所用,术语“未经补充的”和“非经补充的”

可互换使用,是指其中细胞系(例如rAAV包装细胞系和/或生产细胞系)不暴露于用于增加rAAV滴度的一种或多种补充剂的培养条件。

[0088] 鉴定与rAAV产生相联的一种或多种基因的方法

[0089] 本公开部分地涉及通过比较经补充和未经补充的细胞系中的全局基因表达模式来鉴定与rAAV产生相关的一种或多种基因的方法。

[0090] 术语“全局基因表达”是本领域熟知的(参见Wang Z等人,Nature Reviews Genetics[遗传学自然评论],10(1),57-63(2009))。术语“全局基因表达”是指包含关于基因表达的不同方面的信息的一组或多组数据。数据集任选地包括关于以下的信息:细胞或细胞来源样品中靶转录物的存在;靶转录物的相对和绝对丰度水平;各种处理(例如添加补充剂)调节特定基因表达的能力;以及各种处理(例如添加补充剂)将特定基因的表达改变至不同水平的能力。

[0091] 术语“差异表达”是本领域公知的(参见Wang Z.等人,Nature Reviews Genetics[遗传学自然评论],10(1),57-63(2009)、Ozsolak,F.等人Nature Reviews Genetics[遗传学自然评论],12(2),87-98(2011)、Han,Y.等人Bioinformatics andBiology Insights[生物信息学和生物学见解],9,29-46(2015))。

[0092] 在某些实施方案中,本公开的细胞系(例如rAAV包装细胞系和/或生产细胞系)补充有一种或多种增加rAAV产生的补充剂。在一些实施方案中,使用任何公知的程序从一种或多种细胞系(经补充的和未经补充的)中提取RNA样品。例如,可以使用基于二氧化硅的分离以自动化兼容的96孔格式从细胞中纯化总RNA,例如 **Rneasy®** 纯化平台(凯杰公司(Qiagen,Inc.);瓦伦西亚(Valencia),加利福尼亚州)。

[0093] 表达的RNA样品中的基因表达模式可以通过定性和定量测量中的任一种(或两种)来评价。在一些实施方案中,相对于其他表达产物和/或相对于对照序列定量基因的表达水平是有用的。确定相对表达的一种方便且广泛适用的方法是将一种或多种感兴趣的基因的表达与对照基因(例如管家基因(例如HPRT1、HSP70或 $\beta$ -肌动蛋白))的表达进行比较。

[0094] 为了确定观察到的表达数据,例如,响应于生物样品(例如,经补充的和未经补充的细胞系)的一种或多种处理(例如,添加补充剂)的基因表达谱的变化是否显著,例如,不仅仅是实验噪声或群体异质性的产物,还可以为每个生物样品中的每个遗传和表型终点构建概率分布的估计值。估计的群体分布的构建包括对每种处理进行多个独立实验,例如,所有实验以一式两份、一式三份、一式四份等进行。可以使用多变量统计将来自多个生物样品(例如,经补充的和未经补充的细胞系)的表达数据分组或聚类。对数据的分析可以产生一系列例如在经补充的和未经补充的细胞系之间响应于处理而差异表达的基因。可使用各种基因过滤方法过滤差异表达基因的列表,以鉴定可用于增加rAAV产生的一种或多种基因。

[0095] 在一些实施方案中,本公开涉及从经补充和未经补充的细胞系之间差异表达的基因列表中鉴定与rAAV产生相关的一种或多种基因的方法。在某些实施方案中,细胞系是真核细胞系。在某些实施方案中,细胞系是人细胞系。在某些实施方案中,细胞系是HeLa细胞系或HEK293细胞系。在某些实施方案中,在不同细胞系中(例如,在未经补充的HeLa和经补充的HeLa细胞系之间、在未经补充的HEK293和经补充的HEK293细胞系之间、在未经补充的HeLa和经补充的HEK 293细胞系之间、在未经补充的HeLa和未经补充的HEK 293细胞系之间、在经补充的HeLa和经补充的HEK 293细胞系之间)测量全局基因表达以鉴定与rAAV产生

相关的一种或多种基因。在某些实施方案中,可以将来自经补充的HEK 293和经补充的HeLa的全局基因表达数据合并,并与来自未经补充的HEK293和未经补充的HeLa细胞系的合并的全局基因表达数据进行比较,以鉴定与rAAV产生相关的一种或多种基因。

[0096] 在某些实施方案中,本公开提供了产生rAAV包装细胞系和/或生产细胞系以促进增加rAAV产生的方法。在一些实施方案中,通过调节从在经补充和未经补充的rAAV生产细胞系之间差异表达的基因列表中鉴定的一种或多种基因和/或蛋白质的表达来增加rAAV产生。在某些实施方案中,通过对从经补充和未经补充rAAV生产细胞系之间差异表达的基因列表中鉴定的一种或多种基因和/或蛋白质的表达进行调节来增加rAAV滴度。在一些实施方案中,与由不调节相应一种或多种基因和/或一种或多种蛋白质的表达的细胞系产生的rAAV滴度相比,rAAV滴度增加至少1.5倍(例如2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍或30倍)。

[0097] 受调节的基齿和/或蛋白质

[0098] 在某些实施方案中,本公开提供了当在rAAV包装细胞系和/或生产细胞系中被调节(单独或组合)时增强rAAV产生的基因列表。

[0099] ATP合酶F1亚基 $\epsilon$ 假基因2(也称为ATP5EP2)编码线粒体ATP合酶亚基 $\epsilon$ 样蛋白。ATP5EP2是线粒体膜ATP合酶,其在跨膜质子梯度的存在下从ADP产生ATP,所述跨膜质子梯度由呼吸链的电子传递复合物产生。人ATP5EP2序列的实例可在NCBI核苷酸数据库(核苷酸序列)中以参考序列NM\_006886.4(SEQ ID NO:43)或NG\_053163.1(SEQ ID NO:44)获得。

[0100] 长基因间非蛋白编码RNA 319(也称为LINC00319)是RNA基因,并与非编码RNA类相关。长非编码RNA(lncRNA)已显示在多种癌症的发病机理和进展中起重要的调节作用。LINC00319序列的实例可在NCBI核苷酸数据库(核苷酸序列)中以参考序列NM\_194309(SEQ ID NO:45)或NR\_026960.1(SEQ ID NO:46)获得。

[0101] 细胞色素P450家族3亚家族A成员7(也称为CYP3A7)是编码参与药物代谢和胆固醇、类固醇和其他脂质合成的酶的细胞色素P450超家族成员的基因。该酶羟基化睾酮和脱氢表雄酮3-硫酸盐,其涉及妊娠期间雌三醇的形成。该基因是染色体7q21.1上相关基因的簇的一部分。CYP3A7序列的实例可在NCBI核苷酸数据库(核苷酸序列)中以参考序列NM\_000765(SEQ ID NO:47)获得。

[0102] ATP结合盒亚家族A成员10(也称为ABCA10)编码属于ATP结合盒(ABC)转运蛋白超家族成员的膜相关蛋白。ABC蛋白转运各种分子穿过胞外膜和胞内膜。ABC基因分为7个不同的亚家族(ABC1、MDR/TAP、MRP、ALD、OABP、GCN20和White)。ABCA10是ABC1亚家族成员。ABC1亚家族成员包括唯一在多细胞真核生物中发现的仅有主要ABC亚家族。该基因聚簇在17q24上的其他四个ABC1家族成员中。ABCA10序列的实例可在NCBI核苷酸数据库(核苷酸序列)中以参考序列NM\_080282.3(SEQ ID NO:48)获得。

[0103] Noggin(也称为NOG)编码分泌性多肽,其结合并灭活转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )超家族信号传导蛋白的成员,例如骨形态发生蛋白-4(BMP4)。不受理论的束缚,据信通过比TGF- $\beta$ 超家族的成员更有效地扩散通过细胞外基质,该蛋白质可在产生形态发生梯度中具有主要作用。NOG似乎在发育早期和后期都具有多效性作用。NOG序列的实例可在NCBI核苷酸数据库(核苷酸序列)中以参考序列NM\_005450.4(SEQ ID NO:49)获得。

[0104] 排斥性引导分子BMP共受体A(也称为RGMA)是编码排斥性引导分子家族成员的基

因。编码的蛋白质是糖基磷脂酰肌醇锚定的糖蛋白,其在发育和成人中枢神经系统中起轴突引导蛋白的作用。该蛋白还可以在一些癌症中起肿瘤抑制剂的作用。RGMA序列的实例可在NCBI核苷酸数据库(核苷酸序列)中以参考序列NM\_020211.2(SEQ ID NO:50)或NM\_001166283.1(SEQ ID NO:51)获得。

[0105] SPANX(与X染色体上的细胞核相关的精子蛋白)家族成员N3(也称为SPANXN3)是蛋白质编码基因。SPANXN3序列的实例可在NCBI核苷酸数据库(核苷酸序列)中以参考序列NM\_001009609(SEQ ID NO:52)获得。

[0106] 胃蛋白酶原-5,组I(也称为PGA5或胃蛋白酶原A)编码消化酶胃蛋白酶的蛋白质前体,胃蛋白酶是内肽酶的肽酶A1家族的成员。编码的前体由胃主细胞分泌并在酸性条件下经历自催化切割以形成活性酶,其在饮食蛋白质的消化中起作用。该基因存在于染色体11上的相关基因簇中,每个基因编码多个胃蛋白酶原中的一个。PGA5序列的实例可在NCBI核苷酸数据库(核苷酸序列)中以参考序列NM\_014224.4(SEQ ID NO:53)获得。

[0107] 肌球蛋白VIIA和Rab相互作用蛋白(也称为MYRIP)编码参与黑素体转运的Rab效应蛋白,其用作黑素体结合的RAB27A与运动蛋白MYO5A和MYO7A之间的连接。该Rab效应蛋白起蛋白激酶A锚定蛋白(AKAP)的作用,并且可以作为支架蛋白,该支架蛋白将PKA连接到胞吐机制的组分,从而促进胞吐,包括胰岛素释放。MYRIP序列的实例可在NCBI核苷酸数据库(核苷酸序列)中以参考序列NM\_015460(SEQ ID NO:54)或NM\_001284423.1(SEQ ID NO:55)获得。

[0108] 钾钙激活通道亚家族N成员2(也称为KCNN2)基因是钾通道基因的KCNN家族成员。所编码的蛋白质是与三个其他钙调素结合亚基形成电压非依赖性钙激活通道的整合膜蛋白。该基因的交替剪接产生多个转录变体。KCNN2序列的实例可在NCBI核苷酸数据库(核苷酸序列)中以参考序列NM\_170775.2(SEQ ID NO:56)或NM\_001278204.1(SEQ ID NO:57)获得。

[0109] NALCN反义RNA 1(也称为NALCN-AS1)是RNA基因,并且与非编码RNA类相关。NALCN-AS1序列的实例可在NCBI核苷酸数据库(核苷酸序列)中以参考序列NW\_011332700.1(SEQ ID NO:58)或NR\_047687.1(SEQ ID NO:59)获得。

[0110] 在某些实施方案中,本公开提供了rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其包含其中与对照亲本细胞相比,ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS 1的表达降低的细胞。

[0111] 在某些实施方案中,本公开提供了rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其包含其中与对照亲本细胞相比,KCNN2、LINC00319、RGMA和SPANXN3的表达降低的细胞。

[0112] 在某些实施方案中,本公开提供了当在rAAV包装细胞系和/或生产细胞系中被单独调节时与对照亲本细胞系相比提高rAAV产生的基因列表。在一些方面,rAAV包装细胞系和/或生产细胞系中不同基因组合的调节增加rAAV产生。在一些方面,调节rAAV包装细胞系和/或生产细胞系中至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种或至少11种基因的表达导致与对照亲本细胞系相比增加rAAV产生。

[0113] 调节一种或多种基因和/或蛋白质的方法

[0114] 调节(例如,降低)基因(例如,ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2或NALCN-AS1)的表达或活性可以通过不同的机制实现,包括但

不限于改变以下的一种或多种:1) 基因拷贝数,2) 基因的转录或翻译,3) 转录物稳定性或寿命,4) mRNA或miRNA的拷贝数,5) 非编码RNA或非编码RNA靶位点的可用性,6) 蛋白质上翻译后修饰的位置或程度,或7) 蛋白质的活性。可用于调节基因表达的工具包括但不限于核酸酶、双链RNA(dsRNA)、小干扰RNA(siRNA)、小发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)、反义RNA寡核苷酸(ASO)、基因破坏或部分或完全基因缺失。

#### [0115] 核酸酶

[0116] 在某些实施方案中,使用锌指核酸酶(ZFN)实现基因调节。合成的ZFN由与例如FokI DNA切割结构域融合的锌指结合结构域构成。可以设计/工程化ZFN用于编辑细胞的基因组,包括但不限于在多种生物体中敲除或敲入基因表达。大范围核酸酶、转录激活物样效应物核酸酶(TALEN)、或成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白(例如Cas核酸酶)和三链体也可用于多种细胞类型的基因组工程化。所述试剂可用于靶向启动子、蛋白编码区(外显子)、内含子、5'和3'UTR等。

#### [0117] 用于调节的双链RNA(dsRNA)分子

[0118] 在某些实施方案中,双链RNA(dsRNA)分子可用于调节本文所述细胞系(例如rAAV包装细胞系和/或生产细胞系)中一种或多种基因的表达。可以设计dsRNA分子以通过相应RNA序列的基于序列同源性的靶向来拮抗一种或多种基因。这种dsRNA可以是小干扰RNA(siRNA)、小发夹RNA(shRNA)或微RNA(miRNA)。这种dsRNA的序列将包含编码一种或多种待调节基因的mRNA的互补部分。该部分可与mRNA内的靶部分100%互补,但也可使用较低水平的互补性(例如,90%或更高或95%或更高)。典型地,互补百分比在一段连续核酸残基上确定。本公开的dsRNA分子可例如与mRNA内的靶部分具有至少80%互补性,这在至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个或更多个核酸残基上测量。在一些情况下,dsRNA分子在dsRNA分子的整个长度上与mRNA的靶部分具有至少80%互补性。

[0119] 使用RNA干扰(RNAi)途径的另一种基因靶向试剂是小发夹RNA,也称为shRNA。通过例如表达构建体(例如质粒、慢病毒)递送至细胞的shRNA具有以组成型或调节型方式提供基因表达的长期降低的能力,这取决于所用启动子的类型。在一个实施方案中,慢病毒颗粒的基因组被修饰成包括一种或多种靶向一种或多种感兴趣基因的shRNA表达盒。这种慢病毒可以感染细胞,将其病毒基因组稳定地整合到宿主基因组中,并以组成型、调节型或(在表达多个shRNA的情况下)组成型和调节型方式表达shRNA。因此,在一些实施方案中,可以设计shRNA以靶向单个基因或多个密切相关的基因家族成员的个体变体。个体shRNA可以调节具有相似或冗余功能或序列基序的靶集合。本领域技术人员将认识到慢病毒构建体也可掺入克隆的DNA或ORF表达构建体。

[0120] 在本文所述的实施方案中,包括小干扰RNA(siRNA)以及微RNA(miRNA)的基因靶向试剂可用于调节基因功能。siRNA和miRNA可掺入宽范围的化学修饰,与感兴趣的靶转录物的互补水平和设计(参见美国专利号8,188,060)以增强稳定性、细胞递送、特异性和功能性。另外,此类试剂可以被设计成靶向基因的不同区域(包括mRNA的5'UTR、开放阅读框、3'UTR)或(在一些情况下)编码感兴趣的基因的基因组DNA的启动子/增强子区域。基因调节(例如,降低基因表达、敲除)可以通过将靶向相同mRNA转录物的不同区域的单个siRNA或miRNA或多个siRNA或miRNA库引入(至细胞中)来实现。合成的siRNA/miRNA递送可通过许多

方法实现,包括但不限于1)自我递送、2)脂质介导的递送、3)电穿孔、或4)基于载体/质粒的表达系统。导入的RNA分子可称为外源核苷酸序列或多核苷酸。在一些实施方案中,siRNA可以被设计成靶向单个基因或多个密切相关的基因家族成员的个体变体。

[0121] siRNA可用于降低一种或多种基因(例如ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1)的表达。在一些实施方案中,包含选自SEQ ID NO:1至11的核苷酸序列或其变体的siRNA用于降低靶基因的表达。

[0122] 表1:用于降低基因表达的siRNA序列。

SEQ ID NO:	靶基因	siRNA 序列*
[0123] SEQ ID NO 1 和 32	ATP5SEP2	有义: GCAACAGCGUAAAAAUUGUtt (SEQ ID NO: 1) 反义: ACAAUUUUUACGCUGUUGCca (SEQ ID NO: 32)

[0124]

SEQ ID NO:	靶基因	siRNA 序列*
SEQ ID NO 2 和 33	LINC00319	有义: CGGUGUCCACAGUCCUUGAtt (SEQ ID NO: 2) 反义: UCAAGGACUGUGGACACCGgt (SEQ ID NO: 33)
SEQ ID NO 3 和 34	CYP3A7	有义: CAAGAAAAGUUAUAAGUUUtt (SEQ ID NO: 3) 反义: AAACUUAUAACUUUUCUUGga (SEQ ID NO: 34)
SEQ ID NO 4 和 35	NOG	有义: CGGAGGAAGUUACAGAUGUtt (SEQ ID NO: 4) 反义: ACAUCUGUAACUCCUCCGca (SEQ ID NO: 35)
SEQ ID NO 5 和 36	SPANXN3	有义: AGAUGCAAGAGGUACCAAAtt (SEQ ID NO: 5) 反义: UUUGGUACCUCUUGCAUCUca (SEQ ID NO: 36)
SEQ ID NO 6 和 37	MYRIP	有义: GGUGUCGGAUGAUUUUAUCAtt (SEQ ID NO: 6) 反义: UGAUAAAUCAUCCGACACctg (SEQ ID NO: 37)

SEQ ID NO:	靶基因	siRNA 序列*
SEQ ID NO 7 和 38	KCNN2	有义: GAAGCUAGAACUUACCAAAtt (SEQ ID NO: 7) 反义: UUUGGUAAGUUCUAGCUUCct (SEQ ID NO: 38)
SEQ ID NO 8 和 39	NALCN- AS1	有义: GGAUGUCUUUCCUAGGAGAtt (SEQ ID NO: 8) 反义: UCUCCUAGGAAAGACAUCcAa (SEQ ID NO: 39)
[0125] SEQ ID NO 9 和 40	RGMA	有义: CGCUCAUCGACAAUAAUUAtt (SEQ ID NO: 9) 反义: UAAUUAUUGUCGAUGAGCGgc (SEQ ID NO: 40)
SEQ ID NO 10 和 41	PGA5	有义: CACUUUAGAUGUAUCUAAUtt (SEQ ID NO: 10) 反义: AUUAGAUACAUCUAAAGUGgg (SEQ ID NO: 41)
SEQ ID NO 11 和 42	ABCA10	有义: GGAGCAUAAAGUAGACCGAtt (SEQ ID NO: 11) 反义: UCGGUCUACUUUAUGCUCctt (SEQ ID NO: 42)

[0126] \*用于降低基因表达的siRNA序列(有义和反义)。序列中小写核苷酸代表3'突出端。

[0127] 在一些实施方案中,用于降低ATP5EP2表达的siRNA包含SEQ ID NO:1的核苷酸序

列或其变体。例如,在一些实施方案中,siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:32的核苷酸序列。

[0128] 在一些实施方案中,用于降低LINC00319表达的siRNA包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列或其变体。例如,在一些实施方案中,siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:33的核苷酸序列。

[0129] 在一些实施方案中,用于降低CYP3A7表达的siRNA包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列或其变体。例如,在一些实施方案中,siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:34的核苷酸序列。

[0130] 在一些实施方案中,用于降低NOG表达的siRNA包含SEQ ID NO:4的核苷酸序列或其变体。例如,在一些实施方案中,siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:4的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:35的核苷酸序列。

[0131] 在一些实施方案中,用于降低SPANXN3表达的siRNA包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列或其变体。例如,在一些实施方案中,siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。

[0132] 在一些实施方案中,用于降低MYRIP表达的siRNA包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列或其变体。例如,在一些实施方案中,siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列。

[0133] 在一些实施方案中,用于降低KCNN2表达的siRNA包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列或其变体。例如,在一些实施方案中,siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:38的核苷酸序列。

[0134] 在一些实施方案中,用于降低NALCN-AS1表达的siRNA包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列或其变体。例如,在一些实施方案中,siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:39的核苷酸序列。

[0135] 在一些实施方案中,用于降低RGMA表达的siRNA包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列或其变体。例如,在一些实施方案中,siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列。

[0136] 在一些实施方案中,用于降低PGA5表达的siRNA包含SEQ ID NO:10的核苷酸序列或其变体。例如,在一些实施方案中,siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:10的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列。

[0137] 在一些实施方案中,用于降低ABCA10表达的siRNA包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列或其变体。例如,在一些实施方案中,siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:11的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:42的核苷酸序列。

[0138] 反义RNA寡核苷酸 (ASO)

[0139] 反义RNA寡核苷酸 (ASO) 可用于调节rAAV包装细胞系和/或生产细胞系中一种或多种基因的表达。通常,ASO用于降低一种或多种基因的表达。使用已知技术并基于待调节的一种或多种基因的序列的了解,可以设计ASO分子以通过相应RNA的基于序列同源性的靶向来拮抗一种或多种基因。ASO序列可包含与由一种或多种基因产生的mRNA或lncRNA的靶部分互补的核苷酸序列。该部分可与mRNA或lncRNA内的靶部分100%互补,但也可使用较低水平的互补性(例如,90%或更高或95%或更高)。

[0140] 在一些实施方案中,ASO可以是反义RNA寡核苷酸,其中序列的至少一个核苷键是硫代磷酸酯键,二硫代磷酸酯键,磷酸三酯键,烷基磷酸酯键,氨基烷基磷酸三酯键,亚烷基磷酸酯键,亚磷酸酯键,氨基磷酸酯键和氨基烷基氨基磷酸酯键,硫代氨基磷酸酯键,硫代烷基磷酸酯键,硫代烷基磷酸三酯键,硫代磷酸酯键,硒代磷酸酯键或硼磷酸酯键。在特定的实施方案中,反义RNA寡核苷酸序列的至少一个核苷间键是硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,反义RNA寡核苷酸序列的所有核苷间键都是硫代磷酸酯键。

[0141] CRISPR基因组编辑

[0142] 在一些实施方案中,使用CRISPR基因组编辑来调节rAAV包装细胞系和/或生产细胞系中的基因表达。CRISPR基因组编辑通常包含两种不同的组分:(1) 指导RNA和(2) 内切核酸酶,特别是CRISPR相关(Cas)核酸酶(例如Cas9)。指导RNA是内源细菌crRNA和tracrRNA组合成单个嵌合指导RNA(gRNA)转录物。不受理论束缚,据信当gRNA和Cas在细胞中表达时,基因组靶序列可被修饰或永久破坏。

[0143] 通过gRNA序列与待降低基因(例如,ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2或NALCN-AS1)中靶DNA序列的互补序列之间的碱基配对将gRNA/Cas复合物募集到靶序列。为了成功结合Cas,基因组靶序列还必须包含紧随靶序列的正确原型间隔区相邻基序(PAM)序列。gRNA/Cas复合物的结合将Cas定位于本公开的一种或多种基因中的基因组靶序列,使得野生型Cas可切割DNA的两条链,引起双链断裂。这可以通过以下两种一般修复途径中的一种进行修复:(1) 非同源末端连接DNA修复途径或(2) 同源定向修复途径。非同源修复途径可导致双链断裂处的插入/缺失,其可导致移码和/或过早终止密码子,有效地破坏靶基因的开放阅读框。同源定向修复途径需要存在修复模板,其用于修复双链断裂。

[0144] 任何适当的gRNA对可以用于CRISPR基因组编辑。通常,gRNA对用于降低一种或多种基因(例如ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和NALCN-AS1)的表达。在本文描述的一些实施方案中,gRNA对用于调节(例如,降低或消除/敲除)ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1的表达。

[0145] gRNA对可使用已知技术并基于待调节的一种或多种基因的序列的了解来设计,通常使用任何公众可获得的适当计算机程序。敲除包装细胞和/或生产细胞可以使用任何合适的技术产生,其中标准技术是本领域已知的并且合适的试剂盒是可商购的。

[0146] 可以通过任何合适的方式将gRNA对递送到本公开的生产细胞系。合适的技术是本领域已知的,包括使用质粒、病毒和细菌载体以将gRNA对递送至生产细胞系。通常,使用质粒DNA递送gRNA对。

[0147] gRNA对可用于降低一种或多种基因(例如ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和NALCN-AS1)的表达。多个gRNA对可用于调节基因的表达。在本文描述的一些实施方案中,gRNA对用于降低ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2或NALCN-AS1中的至少一种的表达。多个gRNA对可用于调节KCNN2、LINC00319、RGMA和SPANXN3的表达。在一些实施方案中,可以修饰gRNA以通过增加与靶位点的结合和抑制核酸酶降解来增强编辑效率。在某些实施方案中,这些修饰可以是gRNA的5'和3'端上的末端三个核苷酸中的2'-O-甲基类似物和3'硫代磷酸

酯核苷酸间键。用于调节一种或多种基因的基因表达的gRNA对所靶向的示例性靶DNA序列可包含选自表2中所列的SEQ ID NO:16-31中的任一个核苷酸序列或其变体。

[0148] 表2:gRNA对的示例性靶区域序列 (SEQ ID NO:12-15) 和靶DNA序列 (SEQ ID NO:16-31)

SEQ ID NO:	序列
KCNN2	
SEQ ID NO: 12	UUGCCACUACAGCUACCACC
SEQ ID NO: 13	CCAAUGUACUCAGGGAAACA
SEQ ID NO: 14	AGUCCACCAAAGUGUUUGCU
SEQ ID NO: 15	AAAGGAGUCUGCUUACUAC
KCNN2	
[0149] SEQ ID NO: 16	TTGCCACTACAGCTACCACC
SEQ ID NO: 17	CCAATGTACTCAGGGAAACA
SEQ ID NO: 18	AGTCCACCAAAGTGTTTGCT
SEQ ID NO: 19	AAAGGAGTCTGCTTACTTAC
RGMA	
SEQ ID NO: 20	CTTCTCGTAATGGCAGATCT
SEQ ID NO: 21	GCACTTGAGGATCTTGCACG
SEQ ID NO: 22	GAGGTCCTCTATGCCATGGA
SEQ ID NO: 23	CCATACCCATCCATCCAGCT
SPANXN3	
SEQ ID NO: 24	CCCATGTGAAGGACCTTCAA
SEQ ID NO: 25	GTTCTTCAAACCTCTGTTCGG
SEQ ID NO: 26	GAAGGCGTAGACTTATCTGA
[0150] SEQ ID NO: 27	AGCCAACTTCCAGCACCAAT
LINC00319	
SEQ ID NO: 28	GGGCAATGGACCTTCTGCCT
SEQ ID NO: 29	GGCTGCGGGGCAGAGGGCAA
SEQ ID NO: 30	CGGGCAGGCTGCGGGGCAGA
SEQ ID NO: 31	ACGGGCAGGCTGCGGGGCAG

[0151] 例如,用于靶向KCNN2的gRNA对可包含选自SEQ ID NO:12-15的核苷酸序列的序列(示于表2中)。在一些实施方案中,用于靶向KCNN2的gRNA对包含含有SEQ ID NO:12的序列的第一gRNA分子和含有SEQ ID NO:13的序列的第二gRNA分子。在一些实施方案中,用于靶向KCNN2的gRNA对包含含有或具有SEQ ID NO:14的序列的第一gRNA分子和含有或具有SEQ ID NO:15的序列的第二gRNA分子。

[0152] 在一些实施方案中,用于靶向KCNN2的gRNA分子是2'-O-甲基类似物,其在其5'和3'

端的任一者或两者上的末端三个核苷酸中包含3'硫代磷酸酯核苷酸间键并且包含SEQ ID NO:12、13、14或15的序列。

[0153] 变体gRNA序列可以与本公开的序列具有至少80%序列一致性,这是在任何适当长度的序列上测量。典型地,序列同一性百分比是在一段连续核酸上确定的。本公开的变体gRNA序列可例如与本公开的序列具有至少80%序列同一性,这在至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个或更多个核酸残基上测量。在一些实施方案中,变体gRNA分子在变体gRNA分子的整个长度上与本公开的gRNA分子具有至少80%序列同一性。在一些实施方案中,本公开的变体gRNA分子可以是其靶区域与SEQ ID NO:16至30中的一个的靶序列互补的一种或多种gRNA分子的变体。本公开的gRNA对可以包含靶向基因(例如,选自ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和NALCN-AS1的基因)的对中的两种gRNA序列中的一种或两种的变体。例如,包含含有SEQ ID NO:12的序列的第一gRNA分子和含有SEQ ID NO:13的序列的第二gRNA分子的gRNA对的变体可以包含1)含有SEQ ID NO:12的序列的变体的第一gRNA分子,2)含有SEQ ID NO:13的序列的变体的第二gRNA分子,或3)两者。

[0154] 在蛋白质水平的调节

[0155] 在另一个实施方案中,基因的表达和/或活性的调节在蛋白质(例如,多肽)水平发生。例如,可以通过包括但不限于用小分子、肽、适体、去稳定结构域靶向蛋白质的方法或可以例如下调基因产物活性或提高基因产物降解速率的其他方法来实现蛋白质水平上的基因功能降低。可替代地,可以通过定点诱变和/或引入错义或无义突变来修饰表达的蛋白质以降低或消除生物活性。在一些实施方案中,可以将结合例如活性位点并抑制靶蛋白功能的小分子加入例如细胞培养基中,并由此引入包装细胞和/或生产细胞中。可替代地,可通过向细胞(例如包装细胞和/或生产细胞)中引入例如肽来调节靶蛋白功能,所述肽例如防止蛋白-蛋白相互作用(参见Shangary等人,(2009) Annual Review of Pharmacology and Toxicology [药理学与毒理学年度评论] 49:223)。可通过例如转染或电穿孔或经由表达构建体将此类肽引入细胞(例如包装和/或生产细胞)中。可替代地,可通过添加(例如,通过缀合)一种或多种促进细胞递送的部分或增压分子以增强自身递送来将肽引入细胞(例如,包装细胞和/或生产细胞)。用于表达肽的技术包括但不限于肽与支架的融合、或信号序列的附着,以分别将肽稳定或引导至感兴趣的位置或区室。在某些实施方案中,rAAV包装细胞系和/或生产细胞系包含已使用前述方法中的任一种工程化以降低由ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1表达的基因产物的表达和/或活性的细胞。

[0156] 调节对一种或多种基因和/或蛋白质的表达的影响

[0157] 在某些实施方案中,本公开中描述的调节方法可用于生成产生高滴度rAAV的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系。在某些实施方案中,本公开中描述的调节方法可导致一种或多种基因(例如ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1)的表达的显著降低和/或由一种或多种基因表达的蛋白质的活性的显著降低(例如降低至少5%、至少10%、至少20%或更大)。在某些实施方案中,靶基因的表达降低约40%至约100%(例如,约40%至约95%、约40%至约90%、约40%至约85%、约

40%至约80%、约40%至约75%、约40%至约70%、约40%至约65%、约40%至约60%、约40%至约55%、约40%至约50%、约40%至约45%、约45%至约100%、约50%至约100%、约55%至约100%、约60%至约100%、约65%至约100%、约70%至约100%、约75%至约100%、约80%至约100%、约85%至约100%、约90%至约100%、约95%至约100%；或约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%）。

[0158] 在某些实施方案中，本公开中描述的调节方法可导致由靶基因（例如，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1）表达的蛋白质或RNA的活性显著降低。例如，本文所述的方法可导致由靶基因表达的蛋白质或RNA的活性降低至少5%、至少10%、至少20%或更多。在某些实施方案中，靶基因蛋白或RNA活性降低约40%至约100%（例如，约40%至约95%、约40%至约90%、约40%至约85%、约40%至约80%、约40%至约75%、约40%至约70%、约40%至约65%、约40%至约60%、约40%至约55%、约40%至约50%、约40%至约45%、约45%至约100%、约50%至约100%、约55%至约100%、约60%至约100%、约65%至约100%、约70%至约100%、约75%至约100%、约80%至约100%、约85%至约100%、约90%至约100%、约95%至约100%；或约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%）。此外，一种或多种基因的调节可导致多种基因的调节（例如，通过miRNA）。

[0159] 在某些实施方案中，本公开中描述的调节方法可导致基因产物（例如，ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1的基因产物）的表达显著降低（例如降低至少5%、至少10%、至少20%或更多）。在某些实施方案中，基因产物的表达降低约40%至约100%（例如，约40%至约95%、约40%至约90%、约40%至约85%、约40%至约80%、约40%至约75%、约40%至约70%、约40%至约65%、约40%至约60%、约40%至约55%、约40%至约50%、约40%至约45%、约45%至约100%、约50%至约100%、约55%至约100%、约60%至约100%、约65%至约100%、约70%至约100%、约75%至约100%、约80%至约100%、约85%至约100%、约90%至约100%、约95%至约100%；或约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%）。

[0160] 在某些实施方案中，本公开中描述的调节方法可导致由ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1中的至少一种表达的多肽或多核糖核苷酸的表达显著降低（例如，降低至少5%、至少10%、至少20%或更多）。在某些实施方案中，多肽或多核糖核苷酸的表达降低约40%至约100%（例如，约40%至约95%、约40%至约90%、约40%至约85%、约40%至约80%、约40%至约75%、约40%至约70%、约40%至约65%、约40%至约60%、约40%至约55%、约40%至约50%、约40%至约45%、约45%至约100%、约50%至约100%、约55%至约100%、约60%至约100%、约65%至约100%、约70%至约100%、约75%至约100%、约80%至约100%、约85%至约100%、约90%至约100%、约95%至约100%；或约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%）。

[0161] 在某些实施方案中，本公开中描述的调节方法可导致由ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1中的至少一种表达的多肽或多核糖核苷酸的活性显著降低（例如，降低至少5%、至少10%、至少20%或更多）。在某些实施方案中，表达的多肽或多核糖核苷酸的活性降低约40%至约100%（例如，约

40%至约95%、约40%至约90%、约40%至约85%、约40%至约80%、约40%至约75%、约40%至约70%、约40%至约65%、约40%至约60%、约40%至约55%、约40%至约50%、约40%至约45%、约45%至约100%、约50%至约100%、约55%至约100%、约60%至约100%、约65%至约100%、约70%至约100%、约75%至约100%、约80%至约100%、约85%至约100%、约90%至约100%、约95%至约100%；或约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%）。

[0162] 在某些实施方案中，rAAV包装细胞系和/或生产细胞系中一种或多种基因、蛋白质或RNA的表达和/或活性的降低维持约5天（例如，约6小时、约12小时、约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天或更长时间）。

[0163] 在某些实施方案中，rAAV包装细胞系和/或生产细胞系中一种或多种基因、蛋白质或RNA的表达和/或活性的降低旨在无限期或永久地维持，例如通过使用基因破坏或部分或完全基因缺失。

[0164] 在某些实施方案中，rAAV包装细胞系和/或生产细胞系中一种或多种基因、蛋白质或RNA的表达和/或活性的降低在培养物中维持rAAV包装细胞系和/或生产细胞系的至少一代、至少二代、至少三代、至少四代、至少五代、至少十代、至少二十代、至少三十代、至少四十代或更多代。

[0165] 调节对rAAV产生的影响

[0166] rAAV包装细胞系和/或生产细胞系中一种或多种基因和/或蛋白的调节可导致rAAV滴度的增加。在一些实施方案中，调节导致由rAAV包装细胞系和/或生产细胞系产生的rAAV的滴度增加至约1.5至约7倍（例如，约1.5至约6.5、约1.5至约6、约1.5至约5.5、约1.5至约5、约1.5至约4.5、约1.5至约4、约1.5至约3.5、约1.5至约3.0、约1.5至约2.5、约1.5至约2.0、约2至约7、约2.5至约7、约3至约7、约3.5至约7、约4至约7、约4.5至约7、约5至约7、约5.5至约7、约6至约7、约6.5至约7、或约1.5、约2.0、约2.5、约3.0、约3.5、约4.0、约4.5、约5.0、约5.5、约6.0、约6.5、或约7.0）。在一些实施方案中，由rAAV包装细胞系和/或生产细胞系产生的rAAV的滴度增加至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍或更多。由一种或多种基因和/或蛋白的调节引起的rAAV滴度的任何增加可以与由对照亲本细胞系产生的rAAV滴度进行比较。

[0167] 在一些实施方案中，rAAV包装细胞系和/或生产细胞系中一种或多种基因和/或蛋白的调节可增加rAAV滴度产生至少2天、至少5天、至少20天、至少30天、至少40天、至少50天、至少60天、至少70天、至少80天、至少90天、至少100天或更长时间。

[0168] 产生rAAV的方法

[0169] 在某些实施方案中，本公开描述了从已被工程化以调节一种或多种基因、蛋白质或非编码RNA的表达的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系产生rAAV的方法。在某些实施方案中，rAAV是通过将rAAV载体递送至工程化的rAAV包装细胞系而产生的rAAV生产细胞系的细胞进行感染而产生的。在某些实施方案中，rAAV通过感染其中一种或多种基因、蛋白质或非编码RNA的表达已被调节的rAAV生产细胞系的细胞而产生。在某些实施方案中，与对照亲本细胞系相比，来自工程化的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系的rAAV的产生得到增强。

[0170] 在某些实施方案中，工程化的包装细胞系的细胞用辅助病毒（例如腺病毒（AV）或

单纯疱疹病毒)感染,其允许rAAV复制。在一些实施方案中,工程化的生产细胞系的细胞用辅助病毒(例如腺病毒(AV)或单纯疱疹病毒)感染。

[0171] 收获rAAV的方法

[0172] 可以通过裂解细胞从工程化的rAAV包装和/或生产细胞获得rAAV颗粒。工程化的rAAV包装和/或生产细胞的裂解可通过化学或酶处理细胞以释放感染性病毒颗粒的方法实现。这些方法包括使用核酸酶(例如全能核酸酶(benzonase)或DNA酶)、蛋白酶(例如胰蛋白酶)或去污剂或表面活性剂。也可以使用物理破坏,例如均质化或研磨,或通过微流化器压力单元施加压力,或冻融循环。在某些实施方案中,来自工程化的rAAV包装和/或生产细胞的裂解物可用于收获rAAV颗粒。

[0173] 在某些实施方案中,可以从工程化的rAAV包装和/或生产细胞中收集细胞培养上清液而不需要细胞裂解。在本公开的某些实施方案中,工程化的rAAV包装和/或生产细胞分泌rAAV颗粒,其可从细胞培养上清液中收集而无需细胞裂解。在某些实施方案中,工程化的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系具有比对照亲本细胞系更高的rAAV滴度,使得与对照亲本细胞系相比,从工程化的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系收获更多的rAAV。

[0174] 收获rAAV颗粒后,可能需要纯化含有rAAV的样品,以除去例如由细胞裂解产生的细胞碎片。AAV颗粒的最小纯化的方法是本领域已知的。两种示例性纯化方法是基于氯化铯(CsCl)和基于碘克沙醇的密度梯度纯化。Strobel等人,Human Gene Therapy Methods[人基因疗法方法],26(4):147-157(2015)中描述了这两种方法。也可以使用亲和色谱法,使用例如AVB琼脂糖凝胶亲和树脂(通用健康医疗集团生物科学部(GE Healthcare Bio-Sciences AB),乌普萨拉(Uppsala),瑞典)实现最小纯化。使用AVB琼脂糖凝胶亲和树脂的AAV纯化方法描述于,例如,Wang等人,Mol Ther Methods Clin Dev.[分子疗法-方法与临床开发],2:15040(2015)。纯化后,可将rAAV颗粒过滤并储存在 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 。

[0175] 在某些实施方案中,本公开提供了一种收获在细胞用两种不同的腺病毒共感染之后从工程化的rAAV包装细胞系产生的rAAV颗粒的方法。

[0176] 在某些实施方案中,本公开提供了一种收获在感染由工程化的rAAV包装细胞系产生的rAAV生产细胞系后产生的rAAV颗粒的方法。

[0177] 在某些实施方案中,本公开提供了一种收获在用辅助病毒感染工程化的rAAV生产细胞系后产生的rAAV颗粒的方法。

[0178] rAAV颗粒的定量

[0179] 由于AAV感染在体外不会导致细胞病变效应,因此不能使用斑块测定来确定感染滴度,因此rAAV颗粒的定量是复杂的。然而,rAAV颗粒可使用多种方法定量,包括定量聚合酶链式反应(qPCR)(Clark等人,Hum.Gene Ther.[人类基因治疗]10,1031-1039(1999))、斑点杂交(Samulski等人,J.Virol.[病毒学杂志卷]63,3822-3828(1989))、以及通过高度纯化的载体制剂的光密度(Sommer等人,Mol.Ther.[分子治疗]7,122-128(2003))。可通过热循环仪(例如,iCycler iQ96孔模块式热循环仪(伯乐公司(Bio-Rad),赫拉克勒斯(Hercules),加利福尼亚州)中的实时定量的基因表达减少的聚合酶链反应(qPCR)(DRP-qPCR)对DNA酶抗性颗粒(DRP)进行定量。在DNA酶I(100U/ml;普洛麦格公司(Promega),麦迪逊,威斯康星州)存在的情况下,可将含有rAAV颗粒的样品在 $37^{\circ}\text{C}$ 下温育60分钟,然后在 $50^{\circ}\text{C}$ 进行蛋白酶K(英杰公司(Invitrogen),卡尔斯巴德(Carlsbad),加利福尼亚州)消化

(10U/ml)60分钟,然后在95°C变性30分钟。所使用的引物-探针组应特异于rAAV载体基因组的非天然部分,例如目的蛋白质的聚(A)序列。基于引物、探针和扩增序列的长度和组成,可以使用任何合适的循环参数组来扩增PCR产物。替代方案披露于例如Lock等人,Human Gene Therapy Methods[人基因疗法方法]25(2):115-125(2014)。

[0180] 也可以使用类似于上述的qPCR技术测量病毒基因组扩增。然而,为了定量生产细胞内的总基因组扩增,仅收集细胞内样品并且样品不经DNA酶I处理以测量包装的和未包装的病毒基因组。病毒基因组扩增可以在每个宿主细胞的基础上通过同时测量宿主细胞管家基因例如RNA酶P来计算。

[0181] 可以使用TCID<sub>50</sub>(50%的组织培养感染剂量)测定来确定rAAV颗粒的感染性,例如在Zhen等人,Human Gene Therapy[人基因疗法]15:709-715(2004)中描述。在该测定中,rAAV载体颗粒被连续稀释并用于在96孔板中与AV颗粒一起共感染表达Rep/Cap的细胞系。感染后48小时,从感染孔和对照孔中提取总细胞DNA。然后使用qPCR,用转基因特异性探针和引物测量rAAV载体复制。TCID<sub>50</sub>感染性/毫升(TCID<sub>50</sub>/ml)使用Kärber方程计算,使用10倍连续稀释的AAV阳性孔的比率。

#### [0182] 治疗应用

[0183] 由本文所述的工程化的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系产生的rAAV可用于例如哺乳动物的基因治疗。由本文所述的工程化的细胞产生的rAAV可用于离体和/或体内基因治疗应用。由本文所述的工程化的细胞产生的rAAV可用于例如递送小分子(例如siRNA或sgRNA)、肽和/或蛋白质。

[0184] 在一些实施方案中,由本文所述的工程化的细胞系产生的rAAV可用于治疗有需要的人类受试者的疾病或障碍。在某些实施方案中,由本文所述的工程化的细胞系产生的rAAV可与药学上可接受的载剂联合施用。

[0185] 任何合适的方法或途径可用于施用由本文所述的工程化的包装细胞系和/或生产细胞系产生的rAAV或含有rAAV的组合物。施用途径包括例如全身、口服、吸入、鼻内、气管内、动脉内、眼内、静脉内、肌内、皮下、皮内和其他肠胃外施用途径。在一些实施方案中,静脉内施用由工程化的包装细胞系和/或生产细胞系产生的rAAV或包含rAAV的组合物。

[0186] 从前述实例将更充分地理解本公开的实践,所述实例在本文中仅出于说明性目的而给出,并且不应解释为以任何方式限制本公开。

#### [0187] 实施例

##### [0188] 实施例1:敲低方案的开发

[0189] 通过敲低管家基因HPRT1,针对6孔和24孔形式优化并开发siRNA敲低实验。基于多种因素评估在24孔中进行的实验,所述因素例如接种密度、细胞培养条件(例如,二氧化碳百分比(CO<sub>2</sub>))、胎牛血清(FBS)百分比)、转染试剂(Lipofectamine® RNAiMax)和siRNA之间的比率(“比率”)、温育时间和siRNA浓度。为HPRT1基因敲低设计的市售siRNA用于优化实验条件。根据制造商的说明书,使用Lipofectamine® RNAiMax,用不同浓度的siRNA转染HeLa生产细胞。通过实时PCR测定HPRT1表达的减少百分比。与基线对照相比,优化的24孔siRNA敲低方法能够将高表达基因HPRT1敲低80%以上。如图2A-D所示,细胞以1x10<sup>5</sup>个细胞/孔接种、转染试剂和siRNA之间的比率为1:5,8nM siRNA显示出最高的敲低效率。图2A显

示了使用的不同siRNA浓度/比率对HPRT1敲低百分比的影响。图2B显示不同siRNA浓度/比率对HPRT1表达百分比的影响。对于6孔方案优化,测试两种不同的siRNA浓度。针对图2A和2B中绘制的数据,测试 $5 \times 10^4$ 、 $8 \times 10^4$ 和 $1 \times 10^5$ 的接种密度。图2C显示了不同siRNA浓度对HPRT1敲低百分比的影响。图2D显示了不同浓度的siRNA对HPRT1表达百分比的影响。所有实验重复三次。

[0190] 实施例2:RNA测序

[0191] 在两种不同的HeLaS3生产细胞系中,在补充和非补充生产条件下运行八个三升生物反应器。在没有腺病毒5(Ad5)的情况下运行两个另外的生物反应器作为未感染对照。表3列出了关于生物反应器条件和产生水平的详细信息。

[0192] 表3:生物反应器条件和产生水平。

[0193]

条件	细胞系	产生水平	接种密度	基础培养基	一种或多种补充剂	Ad5
1	21C5	无产生对照	$0.7 \times 10^6$ 个细胞/mL	90% DMEM/10% Ex-Cell	-	无
2	21C5	低	$0.7 \times 10^6$ 个细胞/mL	90% DMEM/10% Ex-Cell	-	200 MOI
3	21C5	低	$0.7 \times 10^6$ 个细胞/mL	90% DMEM/10% Ex-Cell	-	200 MOI
4	21C5	中等	$0.7 \times 10^6$ 个细胞/mL	90% DMEM/10% Ex-Cell	+	200 MOI
5	21C5	中等	$0.7 \times 10^6$ 个细胞/mL	90% DMEM/10% Ex-Cell	+	200 MOI
6	21C5	高	$0.7 \times 10^6$ 个细胞/mL	90% DMEM/10% Ex-Cell	+	200 MOI
7	2B6	无产生对照	$0.7 \times 10^6$ 个细胞/mL	90% DMEM/10% Ex-Cell	-	无

			/mL				
	8	2B6	低	$0.7 \times 10^6$ 个细胞 /mL	90% DMEM/10 % Ex-Cell	-	200 MOI
[0194]	9	2B6	中等	$0.7 \times 10^6$ 个细胞 /mL	90% DMEM/10 % Ex-Cell	+	200 MOI
	10	2B6	高	$0.7 \times 10^6$ 个细胞 /mL	90% DMEM/10 % Ex-Cell	+	200 MOI

[0195] 表3中使用的缩写:添加一种或多种补充剂用(+)表示;缺少一种或多种补充剂用(-)表示;MOI-感染复数。

[0196] 用Ad5感染后三十小时,取出样品用于RNA-Seq。将样品用PBS洗涤一次并将细胞沉淀储存在-80°C直至准备运输。通过本领域熟知的方法进行RNA提取和提取的RNA的cDNA合成。在测序之前,使用市售RNA-Seq文库制备试剂盒进行文库制备。使用市售Illumina测序平台进行RNA测序。使用本领域熟知的映射方法将产生的读段映射到人基因组、Ad5基因组和AAV2基因组。丢弃映射到Ad5基因组的任何读段。进行另一轮测序以富集映射到人基因组的读段。使用RNA测序产生的数据进行差异分析(参见表4)。

[0197] 表4:差异分析

差异分析#	对照条件	实验条件
1	PCL1;无产生	PCL1*;产生(N.S.)
2	PCL1;无产生	PCL2;无产生
3	PCL1;无产生	PCL1;产生(S)
4	PCL1;产生(N.S.)	PCL1;产生(S)
5	PCL1;产生(N.S.)	PCL1;产生(S)
6	PCL1;产生(N.S.)	PCL2;产生(N.S.)
7	PCL2;无产生	PCL2;产生(N.S.)
8	PCL2;无产生	PCL2;产生(S)
9	PCL2;无产生	PCL2;产生(S)
10	PCL1;产生(S)	PCL2;产生(S)
11	PCL2;产生(S)	PCL2;产生(S)
12	PCL1;产生(S)	PCL1;产生(S)
13	PCL1;产生(S)	PCL1;产生(S)

[0199] \*PCL1-生产细胞系1;PCL2-生产细胞系2;无产生-未感染的对照细胞;产生(N.S.)-在未经补充条件下培养的Ad5感染细胞;产生(S)-在经补充条件下培养的Ad5感染细胞。

[0200] 在该实例中,差异表达分析计算为实验条件与对照条件相比的mRNA水平的对数倍数变化(LogFC)。上调基因表达为正LogFC,下调基因表达为负LogFC。p值 $\leq 0.05$ 的差异表达

基因被认为是统计学上显著的。在每个差异分析中,成百上千个基因被显著上调或下调。建立过滤标准(参见例如图6),并将其用于将数据集减少到可管理的基因数目以进行评估。如实例6所述,将基因集比对并移向过滤标准。

[0201] 实施例3:通过RT-qPCR验证从RNA测序获得的结果

[0202] 选择一小组基因用于验证RNA测序数据。按照本领域熟知的方法,使用RT-qPCR测定证实RNA-Seq结果。使用 $\Delta \Delta Ct$ 方法分析数据。RT-qPCR独立地证实了在RNA-Seq数据中观察到的趋势。图3A-B显示了从PGA5(图3A)和SPANXN3(图3B)的RNA-Seq数据的生物信息学分析获得的基因表达的对数倍数变化值。X轴显示生产细胞系生长的条件(经补充(如表4所述的差异分析#5)相对于未经补充(如表4所述的差异分析#1)),y轴显示基因表达的对数倍数变化(LogFC)。将在未经补充的细胞培养基中培养的细胞中PGA5(图3A)和SPANXN3(图3B)表达的对数倍数变化相对于未感染细胞(未用辅助病毒感染的细胞)中相应的基因表达作图。将在经补充的细胞培养基中培养的细胞中PGA5(图3A)和SPANXN3(图3B)表达的对数倍数变化相对于在未经补充的细胞培养基中培养的细胞中相应的基因表达作图。

[0203] 在经补充和未经补充条件下生长的生产细胞系中的PGA5和SPANXN3基因表达也通过RT-qPCR使用本领域熟知的方法评估。图3C-D显示相对于未感染的细胞(未用辅助病毒感染的细胞),在未经补充和经补充的细胞培养基中培养的细胞中PGA5(图3C)和SPANXN3(图3D)表达的RT-qPCR倍数变化值。图3A-D显示从qPCR和RNA测序获得的数据遵循相同的趋势。

[0204] 实施例4:在生产细胞系的不同克隆中通过RT-qPCR验证从RNA测序获得的结果

[0205] 通过对从HeLa S3生产细胞系的不同克隆中提取的RNA进行RT-qPCR实验进一步验证RNA测序结果。图4A-B显示了相对于未感染细胞(未用辅助病毒感染的细胞),在未补充的细胞培养基和补充的细胞培养基中培养的生产细胞系克隆中PGA5(图4A)和SPANXN3(图4B)表达的倍数变化值,如RT-qPCR确定。21C5、3C6和2B6代表HeLa生产细胞系的不同克隆。图4C-D显示与在未经补充的细胞培养基中培养的克隆相比,在经补充的细胞培养基中培养的生产细胞系克隆21C5、3C6和2B6中PGA5(图4C)和SPANXN3(图4D)表达的相对倍数增加。这些结果进一步验证了实例3中描述的生物信息学RNA测序和RT-qPCR数据。

[0206] 实施例5:基因敲低对rAAV滴度的影响

[0207] 基于实例1中讨论的优化方案,通过单独敲低HeLa生产细胞系中的基因来进行敲低实验。为每个基因设计siRNA核苷酸序列(见表1)。

[0208] 条件确定为 $1 \times 10^5$ 接种密度,8nM siRNA和siRNA:RNAiMAX比率1:5。基因表达降低后24小时诱导AAV产生,感染后72小时收获rAAV。测定每个样品的滴度并与非靶向错义siRNA对照进行比较。该实验独立进行三次,结果取平均值,并进行统计分析。图5A-5C分别显示生产细胞系1-3中单个基因的siRNA对绝对rAAV滴度的结果(GC/mL;GC=基因组拷贝)。图5D-5F分别显示不同生产细胞系1-3中单个基因的siRNA对rAAV滴度的倍数增加。

[0209] 如图5A-5F所示,生产细胞系中KCNN2、LINC00319、RGMA或SPANXN3表达的降低导致rAAV滴度比错义对照在统计学上明显高2-4倍。在三个生产细胞系中,这四种基因在被敲低时对滴度显示出统计学上相关的积极影响。这些结果表明,这些基因对于更持久的修饰如CRISPR/Cas9敲除是优异的靶标。

[0210] 实施例6:基因过滤方法

[0211] 对于过滤器1,将来自差异分析1和7(如表3所述)的基因进行比对。差异分析1和7

确定在未经补充条件下加入腺病毒5后上调或下调的基因。分析1观察来自21C5生产细胞系(生产细胞系1,PCL1)的细胞。分析7观察来自2B6(生产细胞系2,PCL2)的细胞。此过滤器1后的基因列表鉴定了非细胞系特异性基因,并且这种比对提供了在两种生产细胞系之间共有的总共9149个基因。

[0212] 对于过滤器2,将来自过滤器1的基因与差异分析5中存在的基因进行比对。分析5观察在经补充条件下与未经补充条件相比在来自21C5生产细胞系(PCL1)的细胞中上调和下调的基因。该差异分析的目的在于确定在经补充条件下的产生相对于未经补充条件下的产生的影响。将来自过滤器1的基因集与差异分析5比对的目的是鉴定在改进的生产力条件下的基因,这些基因1)不是改进的生产条件的副产物2)可能与两种不同细胞系相关。比对后,374个基因向前移动。

[0213] 对于过滤器3,只有具有 $>2\text{LogFC}$ 的大 $\text{LogFC}$ 阈值的基因向前移动。这样做是为了确保向前移动的基因的高水平的上调/下调,并给出所选择的基因不是RNA-Seq的人为现象的置信度。过滤后,77个基因向前移动。

[0214] 对于过滤器4,仅保留在差异分析1和差异分析5中都显示上调或在差异分析1和差异分析5中显示下调的基因。例如,77个基因中的一个必须显示差异分析1中的上调和差异分析5中的进一步上调或差异分析1中的下调和差异分析5中的进一步下调。该过滤器的目的是确保对于被评价的基因,与低滴度条件相比,高滴度条件对该特定基因的调节没有拮抗作用。过滤后,留下11个基因进行评价。显示示例性基因过滤方法的说明性流程图在图6中显示(使用缩写: $\text{LogFC}$ =对数倍数变化)。

[0215] 表5提供了在针对生产力过滤重要基因的过程中来自每次比较的 $\text{Log}_2\text{FC}$ 数据。

[0216] 表5: $\text{Log}_2\text{FC}$ 数据

[0217]

基因	差异分析 7	差异分析 1	差异分析 5
ATP5EP2	2.409	-1.1	-7.511
LINC00319	-4.382	-1.432	-6.58
CYP3A7	-8.018	-3.149	-2.814
ABCA10	-4.257	-2.025	-3.131
NOG	-5.585	-1.468	-2.814
SPANXN3	4.99	6.238	2.423
PGA5	8.153	6.019	2.519
MYRIP	2.045	2.771	2.175
KCNN2	3.656	2.807	2.066
NALCN-AS1	4.558	2.639	2.024
RGMA	2.764	2.303	2.03

[0218] 实施例7:KCNN2的基因敲除

[0219] 在该实例中,对两个现有的高度优化的单克隆HeLa生产细胞系(PCL)-2H5和7B12-

进行遗传修饰以敲除KCNN2基因(先前在本文所述的RNA-seq筛选中鉴定的),其编码钙激活的钾通道蛋白SK2。

[0220] 使用eGFP选择标记敲除2H5或7B12 HeLa细胞中的KCNN2。疑似的KCNN2敲除富集eGFP表达并接种在96孔板中。使细胞集落形成,收获基因组DNA,并进行PCR以扩增含有敲除的区域。对PCR产物进行桑格测序,并分析测序文件中是否存在插入/缺失。将具有高敲除可能性的2H5和7B12克隆扩大用于进一步测试。

[0221] 将靠前的克隆转移到无血清的悬浮培养物中。通过24深孔rAAV产生来评估与亲本系相比的克隆生产力。将克隆以 $2 \times 10^5$ 个细胞/mL接种于3mL培养物中,并用Ad5以50的感染复数(MOI)感染。感染后四天,收获rAAV并评估滴度。将滴度倍数增加归一化为亲本对照。与对照样品相比,最佳克隆显示滴度增加1.5-2.7倍。2H5滴度为 $2.46 \times 10^9$ - $4.98 \times 10^{10}$ GC/mL(图7A)。当将滴度归一化为亲本对照时,观察到倍数增加,范围为1.2-2.7倍(图7B)。7B12滴度范围为 $4.33 \times 10^8$ - $1.88 \times 10^{10}$  GC/mL(图7C)。当将滴度归一化为亲本对照时,观察到倍数增加,范围为1.5-2.6倍(图7D)。然后将具有最小1.5倍增加的克隆扩大到摇瓶培养物中,并接种到ambr®15中进行高接种密度的经补充的rAAV产生。将细胞以 $1.5 \times 10^6$ 个细胞/mL接种并用Ad5以50的MOI感染。感染后四天收获rAAV并评估滴度。将滴度倍数增加归一化为亲本对照。与对照样品相比,最佳克隆显示滴度增加1.5-2.3倍。2H5滴度为 $1.5 \times 10^{11}$ - $3.82 \times 10^{11}$ GC/mL(图8A)。当将滴度归一化为亲本对照时,观察到倍数增加,范围为1.3-2.3倍(图8B)。7B12滴度范围为 $2.62 \times 10^{10}$ - $1.35 \times 10^{11}$ GC/mL(图8C)。当将滴度归一化为亲本对照时,观察到倍数增加,范围为1.2-1.5倍(图8D)。

[0222] 这些数据表明,减少或消除AAV生产细胞中本文所述的一种或多种基因的表达(例如,通过基因敲除)可用于增加工程化细胞的rAAV的产生。

[0223] 实施例8:多组合siRNA敲低

[0224] 在该实例中,使用siRNA进行先前在本文所述的RNA-seq筛选中鉴定的基因的多组合敲低以确定同时靶向多个基因是否会对滴度产生累加效应。

[0225] 使用实例5中所述方法的改进进行多组合敲低。简言之,使用8nM的每种siRNA并保持siRNA:RNAiMAX比率为1:5来转染细胞。基因表达降低后24小时诱导AAV产生,感染后72小时收获rAAV。测定每个样品的滴度并与非靶向错义siRNA对照进行比较。

[0226] 在该实施例中,KCNN2与先前描述的一组其他siRNA组合地被敲低。另外,RGMA和SPANXN3彼此组合地被敲低。在2H5中,与错义对照相比,组合敲低显示滴度增加4.6-11.4倍(图9A)。在7B12中,与错义对照相比,组合敲低显示滴度增加3.4-9.7倍(图9B)。每种组合显示滴度增加;然而,并非所有组合都比单独敲低KCNN2有所改进。KCNN2敲低导致2H5中增加5.3倍(图9A)和7B12中增加5.1倍(图9B)。

[0227] 这些数据表明,通过直接靶向已建立的产生高rAAV滴度的单克隆PCL中的多个基因组区域,可以获得rAAV产生的额外增加。

[0228] 编号的实施方案

[0229] 1.一种重组腺相关病毒(rAAV)包装细胞系和/或生产细胞系,其包含其中与对照亲本细胞相比,ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1的表达降低的细胞。

[0230] 2.根据实施方案1所述的包装细胞系和/或生产细胞系,其包含其中与对照亲本细

胞相比, KCNN2、LINC00319、RGMA和SPANXN3的表达降低的细胞。

[0231] 3. 根据实施方案1或2所述的包装细胞系和/或生产细胞系, 其中使用核酸酶、双链RNA (dsRNA)、小干扰RNA (siRNA)、小发夹RNA (shRNA)、微RNA (miRNA) 或反义RNA寡核苷酸 (ASO) 使所述表达降低。

[0232] 4. 根据实施方案1至3中任一项所述的包装细胞系和/或生产细胞系, 其中用包含选自序列SEQ ID NO:1-11中任一个的核苷酸序列的siRNA使所述表达降低。

[0233] 5. 根据实施方案4所述的包装细胞系和/或生产细胞系, 其中ATP5EP2的表达降低, 并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:32的核苷酸序列。

[0234] 6. 根据实施方案4所述的包装细胞系和/或生产细胞系, 其中LINC00319的表达降低, 并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:2的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:33的核苷酸序列。

[0235] 7. 根据实施方案4所述的包装细胞系和/或生产细胞系, 其中CYP3A7的表达降低, 并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:3的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:34的核苷酸序列。

[0236] 8. 根据实施方案4所述的包装细胞系和/或生产细胞系, 其中NOG的表达降低, 并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:4的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:35的核苷酸序列。

[0237] 9. 根据实施方案4所述的包装细胞系和/或生产细胞系, 其中SPANXN3的表达降低, 并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:5的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列。

[0238] 10. 根据实施方案4所述的包装细胞系和/或生产细胞系, 其中MYRIP的表达降低, 并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:6的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:37的核苷酸序列。

[0239] 11. 根据实施方案4所述的包装细胞系和/或生产细胞系, 其中KCNN2的表达降低, 并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:7的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:38的核苷酸序列。

[0240] 12. 根据实施方案4所述的包装细胞系和/或生产细胞系, 其中NALCN-AS1的表达降低, 并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:8的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:39的核苷酸序列。

[0241] 13. 根据实施方案4所述的包装细胞系和/或生产细胞系, 其中RGMA的表达降低, 并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:9的核苷酸序列和在反义链中包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列。

[0242] 14. 根据实施方案4所述的包装细胞系和/或生产细胞系, 其中PGA5的表达降低, 并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:10的序列和在反义链中包含SEQ ID NO:41的序列。

[0243] 15. 根据实施方案4所述的包装细胞系和/或生产细胞系, 其中ABCA10的表达降低, 并且所述siRNA在有义链中包含SEQ ID NO:11的序列和在反义链中包含SEQ ID NO:42的序列。

- [0244] 16. 根据实施方案3所述的包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述核酸酶选自自由锌指核酸酶(ZFN)、大范围核酸酶、转录激活物样效应物核酸酶(TALEN)或成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白组成的组。
- [0245] 17. 根据实施方案1至16中任一项所述的包装细胞系和/或生产细胞系,其中用CRISPR基因组编辑使所述表达降低。
- [0246] 18. 根据实施方案17所述的包装细胞系和/或生产细胞系,其中用指导RNA对使所述表达降低,其中每个指导RNA:
- [0247] (a) 包含选自SEQ ID NO:12-15的核苷酸序列的序列,和/或
- [0248] (b) 靶向选自SEQ ID NO:16-31的任一核苷酸序列的靶DNA序列。
- [0249] 19. 根据实施方案18所述的包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述gRNA对用于靶向KCNN2并且包含含有SEQ ID NO:12的序列的第一gRNA分子和含有SEQ ID NO:13的序列的第二gRNA分子。
- [0250] 20. 根据实施方案18所述的包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述gRNA对用于靶向KCNN2并且包含含有SEQ ID NO:14的序列的第一gRNA分子和含有SEQ ID NO:15的序列的第二gRNA分子。
- [0251] 21. 根据实施方案19或20所述的包装细胞系和/或生产细胞系,其中每个gRNA分子是2'-O-甲基类似物,在其5'和3'端的任一者或两者上的末端三个核苷酸中包含3'硫代磷酸酯核苷酸间键。
- [0252] 22. 根据实施方案1至21中任一项所述的包装细胞系和/或生产细胞系,其中与对照亲本细胞相比,所述基因表达消除。
- [0253] 23. 根据实施方案1至22中任一项所述的包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述细胞系是人细胞系。
- [0254] 24. 根据实施方案23所述的包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述人细胞系是HeLa细胞系或人胚肾(HEK)293细胞系。
- [0255] 25. 根据实施方案1至24中任一项所述的细胞系,其中所述细胞系是rAAV包装细胞系。
- [0256] 26. 根据实施方案1至24中任一项所述的细胞系,其中所述细胞系是rAAV生产细胞系。
- [0257] 27. 根据实施方案26所述的细胞系,其中与从包含所述对照亲本细胞的细胞系产生的rAAV的滴度相比,rAAV的滴度增加约1.5至约7倍。
- [0258] 28. 一种根据实施方案1至27中任一项所述的细胞系的裂解物。
- [0259] 29. 一种来自根据实施方案1至27中任一项所述的细胞系的细胞培养物上清液。
- [0260] 30. 一种产生生产细胞系的方法,所述方法包括将重组腺相关病毒(rAAV)载体递送至根据实施方案25所述的包装细胞系的细胞。
- [0261] 31. 一种产生rAAV的方法,所述方法包括用辅助病毒感染由根据实施方案30所述的方法产生的生产细胞系的细胞。
- [0262] 32. 一种产生rAAV的方法,所述方法包括用辅助病毒感染根据实施方案26所述的生产细胞系的细胞。
- [0263] 33. 根据实施方案31或32所述的方法,其中所述rAAV从所述生产细胞系收获。

- [0264] 34. 根据实施方案31至33中任一项所述的方法,其中与对照亲本细胞系相比,rAAV的产生得到增强。
- [0265] 35. 一种鉴定与rAAV的产生相关的一种或多种基因的方法,所述方法包括:
- [0266] 添加一种或多种增加细胞系中rAAV滴度的补充剂;
- [0267] 在经补充和未经补充的细胞系中测量跨转录组的全局基因表达;
- [0268] 获得在经补充和未经补充的细胞系之间差异表达的基因列表;以及
- [0269] 鉴定与rAAV的产生相关的一种或多种基因。
- [0270] 36. 根据实施方案35所述的方法,其中加入所述细胞系的一种或多种补充剂包括地塞米松、氢化可的松、泼尼松龙、甲泼尼龙、倍他米松、可的松、泼尼松、布地奈德或曲安西龙。
- [0271] 37. 一种产生rAAV包装细胞系和/或生产细胞系以促进增加rAAV产生的方法,所述方法包括调节使用根据实施方案35所述的方法鉴定的一种或多种基因的表达。
- [0272] 38. 根据实施方案35至37中任一项所述的方法,其中所述细胞系是rAAV包装细胞系。
- [0273] 39. 根据实施方案35至37中任一项所述的方法,其中所述细胞系是rAAV生产细胞系。
- [0274] 40. 根据实施方案39所述的方法,其中与由不调节相应的一种或多种基因的表达的rAAV生产细胞系产生的rAAV滴度相比,所述rAAV生产细胞系使rAAV滴度增加至少1.5倍。
- [0275] 41. 根据实施方案37至40中任一项所述的方法,其中调节所述表达包括降低一种或多种基因的表达。
- [0276] 42. 根据实施方案37至40中任一项所述的方法,其中调节所述表达包括消除一种或多种基因的表达。
- [0277] 43. 根据实施方案30至42中任一项所述的方法,其中所述细胞系是人细胞系。
- [0278] 44. 根据实施方案43所述的方法,其中所述人细胞系是HeLa细胞系或人胚肾(HEK)293细胞系。
- [0279] 45. 一种重组腺相关病毒(rAAV)包装细胞系和/或生产细胞系,其包含经工程化以与相应未修饰的亲本细胞相比降低由ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1表达的基因产物的表达和/或活性的细胞。
- [0280] 46. 根据实施方案45所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中由ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1表达的基因产物的表达和/或活性被无限期或永久性地降低。
- [0281] 47. 根据实施方案46所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述细胞系已被工程化以在ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1中的至少一种中包含基因破坏或部分或完全基因缺失。
- [0282] 48. 根据实施方案47所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述细胞系已被工程化以在ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1中的至少一种中包含基因破坏。
- [0283] 49. 根据实施方案47所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述细胞系已被工程化以在选自ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、

KCNN2和NALCN-AS1中的至少两种基因中包含基因破坏。

[0284] 50. 根据实施方案47所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述细胞系已被工程化以在ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和/或NALCN-AS1中的至少一种中包含部分或完全基因缺失。

[0285] 51. 根据实施方案47所述的rAAV包装细胞系和/或生产细胞系,其中所述细胞系已被工程化以在选自ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和NALCN-AS1中的至少两种基因中包含部分或完全基因缺失。

[0286] 52. 一种重组腺相关病毒 (rAAV) 包装细胞系和/或生产细胞系,其中与相应的亲本细胞系相比,所述细胞系表现出由ATP5EP2、LINC00319、CYP3A7、ABCA10、NOG、RGMA、SPANXN3、PGA5、MYRIP、KCNN2和NALCN-AS1中的至少一种表达的多肽或多核糖核苷酸的表达和/或活性降低。

[0287] 通过引用并入

[0288] 本文提及的每个专利文献和科学文章的全部披露内容出于所有目的通过引用并入。

[0289] 等同物

[0290] 在不脱离本披露的精神或基本特征的情况下,本发明可以以其他特定形式实施。因此,前述实施方案在所有方面都被认为是说明性的而不是限制本文描述的发明内容。因此,本发明的范围由所附权利要求而不是由前述说明书来指示,并且在权利要求的等效含义和范围内的所有变化旨在包含在其中。

## 序列表

	<110> 阿尔特拉吉尼克斯制药公司	
	<120> 工程化的生产细胞系及其制备和使用方法	
	<130> XCH/HOLI/GOODW-21529	
	<150> 62/979,483	
	<151> 2020-02-21	
	<150> 62/839,207	
	<151> 2019-04-26	
	<150> 62/833,548	
	<151> 2019-04-12	
	<160> 59	
	<170> PatentIn 3.5版	
	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0001]	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 1	
	gcaacagcgu aaaaauugut t	21
	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 2	
	cgguguccac aguccuugat t	21
	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	

	<400> 3 caagaaaagu uauaaguuut t	21
	<210> 4 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 4 cggaggaagu uacagaugut t	21
	<210> 5 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
[0002]	<400> 5 agaugcaaga gguaccaaat t	21
	<210> 6 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 6 ggugucggau gauuuaucaat t	21
	<210> 7 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 7 gaagcuagaa cuuaccaaat t	21
	<210> 8	

	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 8	
	ggaugucuuu ccuaggagat t	21
	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 9	
	cgcucaucga caauaauuat t	21
[0003]	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 10	
	cacuuuagau guaucuaaut t	21
	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 11	
	ggagcauaaa guagaccgat t	21
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 12	
	uugccacuac agcuaccacc	20
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 13	
	ccaauuguacu cagggaaaca	20
	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
[0004]	<400> 14	
	aguccaccaa aguguuugcu	20
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 15	
	aaaggagucu gcuuacuuac	20
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 16	
	ttgccactac agctaccacc	20
	<210> 17	
	<211> 20	

	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 17		
	ccaatgtact cagggaaaca		20
	<210> 18		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 18		
	agtccaccaa agtgtttgct		20
	<210> 19		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 19		
	aaaggagtct gcttacttac		20
[0005]	<210> 20		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 20		
	cttctcgtaa tggcagatct		20
	<210> 21		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 21		
	gcacttgagg atcttgacg		20
	<210> 22		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 22		
	gaggtcctct atgcatgga		20
	<210> 23		

	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 23		
	ccataccat ccatccagct		20
	<210> 24		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 24		
	cccatgtgaa ggaccttcaa		20
	<210> 25		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 25		
	gttcttcaaa ctctgttcgg		20
[0006]	<210> 26		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 26		
	gaaggcgtag acttatctga		20
	<210> 27		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 27		
	agccaacttc cagcaccaat		20
	<210> 28		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 28		
	gggcaatgga cttctgcct		20

<210>	29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	29	
	ggctgcgggg cagagggcaa	20
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	30	
	cgggcaggct gcggggcaga	20
<210>	31	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	31	
	acgggcaggc tgcggggcag	20
[0007]		
<210>	32	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	32	
	acaauuuuuu cgcuguugcc a	21
<210>	33	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成寡核苷酸	
<400>	33	
	ucaaggacug uggacaccgg t	21
<210>	34	
<211>	21	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 34	
	aaacuuauaa cuuuucuugg a	21
	<210> 35	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 35	
	acaucuguaa cuuccuccgc a	21
	<210> 36	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
[0008]	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 36	
	uuugguaccu cuugcaucuc a	21
	<210> 37	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 37	
	ugauaaaauca uccgacacct g	21
	<210> 38	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	

	<400> 38 uuugguaagu ucuagcuucc t	21
	<210> 39 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 39 ucuccuagga aagacaucca a	21
	<210> 40 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
[0009]	<400> 40 uaauuuuugu cgaugagcgg c	21
	<210> 41 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 41 auuagauaca ucuaaagugg g	21
	<210> 42 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成寡核苷酸	
	<400> 42 ucggucuacu uuaugcucct t	21

	<210>	43	
	<211>	3610	
	<212>	DNA	
	<213>	智人	
	<400>	43	
	cttcctgcgg	ctgaaccgcc	cggctgagcc
			gacattgccg
			gcgtcttggc
			gattcggccc
			60
	gacgagctcc	gctttcgcta	cagcatggtg
			gcctactgga
			gacaggctgg
			actcagctac
			120
	atccgatact	cccagatctg	tgcaaaagca
			gtgagagatg
			caactgaagac
			agaattcaaa
			180
	gcaaatgctg	agaagacttc	tggcagcaac
			gtaaaaattg
			tgaaagtaaa
			gaaggaataa
			240
	tctaccctga	ctaaagcttg	aatgctaca
			ttccaaggt
			gaagatgtgt
			gggcacatgt
			300
	tatggcagat	tgaaaaggat	ctcattccat
			gggaaaaaaaa
			aaaatcctgt
			cttgttcata
			360
	aattgacaat	gtcaataaat	tgaaatatgg
			ttcactgtta
			ctcttgattt
			tagtttgtga
			420
	gactttttca	ttttctttaa	aggaactgtc
			tgcacagctg
			catgattatg
			gccatgtgaa
			480
	ccagggtttc	ttaaaagcag	gggaagccag
			atttaatat
			tagtgaccaa
			agggatacag
			540
	aaagcatttt	gaaaatgtct	caaaatagtt
			gtttcatgac
			attaattggt
			gatcaaaatt
			600
[0010]	atctgctgtc	attgaggctt	cgtagtccct
			tatttttgaa
			ttgttgcatt
			gtcagaataa
			660
	tgacatgggt	atcagtaaca	aatggaaata
			attattaat
			actaaaagt
			tagattagaa
			720
	gaagaaatac	taaattgtac	ttgttttgta
			ttgtgcactt
			aaagcctata
			gataagaacg
			780
	gttacagaat	ttaagcacia	agtgtttttc
			acattgtttt
			gtaaatgaat
			ctttatactc
			840
	tggtagcatt	tctcatagga	aatgaggcaa
			agctattgaa
			taacttgctc
			attgagttga
			900
	tggccaaact	gaaattaa	cctaggagt
			ttgactgcaa
			gtctgggaca
			cggtgaccac
			960
	aacagcagtt	tcgtgggtatt	tccatagtga
			ttcattcatt
			cattatttag
			ggatgaaaa
			1020
	ttgttgcaag	ttatgttttt	atctttcttt
			gaaacttgaa
			agggcttggg
			caagtaaaac
			1080
	accattgcaa	agttaactgc	ctgattttaa
			ctgtttttgg
			agactggaga
			aataaatttg
			1140
	aactggaaat	tttgaaacac	cattctagga
			tcagttctca
			catggtactt
			aagctcacia
			1200
	tgatttatca	gggccactgt	cagcaatgcc
			gaggataagc
			cgaaaagaac
			atctttgttc
			1260
	tcggcttctg	ggaatgactt	attgtcccga
			cacttgacct
			gtaggtttta
			ctgaattctc
			1320
	agcacagagc	gagcagggag	gcagagccaa
			ttgagtggaa
			gagggtgcct
			ctggaaaaca
			1380
	gcaggtttagg	agcccttgga	gtcctccgcc
			tcggagctgt
			catcctgctg
			ttggcaagtt
			1440

	agggcacctc agttcagtgc tgtggccccc aagattaagg tactaggaag taccctccat	1500
	tacagggaac aggaataaat gaatcaaaaa gctatcgggc ctttttgaca tgggacgaat	1560
	aaagtaacta ataggcaaag gggctaaatg atttccagtc aagtaattag agataagtca	1620
	tttattaagg aggcagatgg ggtattattg gtatatagat ggcatagtag attgctagta	1680
	tattggtaga ttattggtat atagatggta tgttaaggag gcagatgggg tattactggt	1740
	atatagatgg tatggtagat tggtagtata ttggcagatt attggtatat ggtatgttga	1800
	ggcagatggg gtattactgg tatatagatg gcatagtaga ttggtagtat attggtagat	1860
	tattgggtata gagatggtat attattaagg aggcagatgg ggtaattaga ggtgagactt	1920
	agggacaggg cttgtgatat ggaaaggagt gaagtcactg agtaaaagac aagtttactg	1980
	tcagcagaga ttcttagagg ctcttttctc cgtgattaaa aaaaaatcct aaaccagtag	2040
	tataataaac ttctgcctc cagcagtgc tggtagctgg caggatgact gtgcccagtg	2100
	atgaggtgac cccagtcaga ccaacttaat gagtatcca ctaattagtt ggatgatggt	2160
[0011]	tgaagctgtc agttaatctc ttagttcaca tcgttcttgt gagcaaagtg aaggaatcgg	2220
	ataagctcta aatttcggtg atgctgctgc tctgagagac caaggctgct ggagcaaccg	2280
	tactgctaaa ggataagctc ttcaaaatca aaaggacag atttcttaag tttctagttt	2340
	gttttgtggt tttacatcta tttctaccat acgaaagagt aggatggtga gatgcatttc	2400
	taaatatfff taactactca gtctggatgg ttaggcttca agaaaaggaa tttatttagt	2460
	ctgaaataaa gcaatfffgc catttaaaat tgaattactt ttagtttaa tgattactat	2520
	tgagcaaaca aatctttaca gtaataaag tcagcaaaag ttttttaaaa ggtttaaatc	2580
	cctccttctt tacatctatt tcattgcttt tttaggtttg ggaagtaaag caccagagga	2640
	agcatgtgta aatccttgta taatcgcagg ctgtaagtct ttagcatctc aggaagttac	2700
	taacttcaaa ctaagtatat aggtagagtt tcttactaaa tctagtctt cttgaaccac	2760
	aagtagaaag catttaaaac atgaatggtg ttttgtgttt tttgaagttt gtaaatagaa	2820
	gacttgttga tgatccgatg gcaaggtatt tttctcttgg tatgtatfff agttatfffcc	2880
	tcgtgatgca taagtgaaaa gagtgaagtt tctcagaatg agcaactgtc atccatctac	2940
	ctgctatfff attattgctg attacaaaag caaatcaaga gatgagaacc cagttgcctg	3000

caagtaaata ttactgcat tgagggtcgg agcattttcc cattaccggt tatccatgga 3060  
 tcaaatagtg tatctcagtg gtaattctag agggccatta aaaccctgat ggtgctggaa 3120  
 gagatggcag tgctgcatgt cagaaatagg taaactgtaa ttaagaagtt acagatgatt 3180  
 tgattacgct cttgtgtatt tggtcctggt ataatgtgag cagattaaaa tcatgtagtg 3240  
 cttaaagcta tgtcattatg caaacattta tggcaacttc tgcaaattaa tttgaactgt 3300  
 aaaagttccc taatgagacg atgtcctcca taactgagaa ggacactgca gccattgctg 3360  
 cttaattcct gcatttgaat ggttgccgag cgcattggtgt gccctttctc aaagagcaga 3420  
 gaggctgcag agcattttgg ggggtgatga ctgaatgaaa gtgaaaagac catttcaaaa 3480  
 tagcctttaa aaggaaagcc aaggatgatt attaatgaat tcctgggatc taacagtagt 3540  
 aagaaattta aactatataa acatatatgt taaaggctag ctcttcagaa ataaagatca 3600  
 gaagactgca 3610

[0012] <210> 44  
 <211> 568  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 44  
 gaacccggga ggtggagggt gcagtgagcc aagatcacat cactgcactt cagcctgggc 60  
 aacaagagta aaactccgtc taaaaaaaaa gaaaaaaaaag gacattgcca gagtcttggc 120  
 gatttggccc gacgcgctcc gctttcgcta cagcatgggt gcctactgga gacaggctgg 180  
 actcagctac atccgatact cccagatctg tgcaaaagta gtgagagatg cactgaagac 240  
 agaattcaaa gcaaatgcca aaaagacttc tggcaacagc gtaaaaattg tgaaagtaaa 300  
 gaaggaataa tctaccctga ctaaagcttg aaatgctgca tttccaaggt gaagatgtat 360  
 gggcacatgt tatggcagat tgaaaaggat ctcatctcat gggaaaaaaaa aatcctgtct 420  
 tgttcataaa ttgacaatgt caataaattg aaatatggtt cactgttaaa aaaaaaaaa 480  
 aaaaagggtg gaaagtgcaa ggcaaggaaa tggattctct cccagaaacc tccagaagga 540  
 accagccctg ccaacacctt gattttag 568

<210> 45  
 <211> 3013  
 <212> DNA

	<213> 智人	
	<400> 45	
	cattgccctc tgccccgcag cctgcccgtt cccaggccag cgagggcgct cccaggccgg	60
	tctgcagcca gaacacagcc cgttccatgt gcttgtcctc gggacacatt aggaatgaac	120
	ccaggcctca gtcctggcct cctcctcaag gctgggtgct cagacgtccc cctcagcccc	180
	tttctctaga ccttccggct gaacaaacga gaacatctca cagccctgca acagccagga	240
	gctgctcgtg gagctccacg cccggctgga gagagaggag gcaccctggg cagcccccca	300
	gcacccaggc tctcacagtg gaagcccacg tcttcttggg ctctattttg aaagctgttc	360
	tttccacgac ggctttgaca agaatcgatt tgagtgagcc ggctgtgtaa tacaggccag	420
	cacaggactg gcctcagggc cacattgggg aggggtggcg ccaggccctg gctgcagccc	480
	acgtgggcaa aagcatggcc aggcaggagg tggggcctgt gagcttggct acagcgaccg	540
	tgggcgctgg gcccggggct cctcagccct gaggggagac ccaggcccag gcaggctccc	600
	aggcgggctc ccgggctccc agccttccga tcttctcct ttgagacctt gccttctgca	660
[0013]	cagtgcaggg aaagagccct gagtcccact ttgcagggat gtattgcatt tccagaaagt	720
	tccttccggg tgacagagtga tacatgaacc ctggggactc actccaactt ggtattgatt	780
	ttctccacgg aggaccacgc agtcacggcc cgtgtctgca cagccccttg gatcctgcgg	840
	aggaattcag ccggcccctc cccctgtgcc gaaaaccacg gaggcaaagc caggccaggg	900
	tacagtgaga acacgggaga ggactgagag accgctggct gccgaggag gaagagcagg	960
	attcgcaccc ccgtcatcgc tgggcccaca cgccgccgac agcttccgcg tgtggccatc	1020
	tgtctttcag aaactctctg gcagagggac ccagcagatg acacgggggc cgttcacact	1080
	ctgaaacctg cctggagtca aaactgtct ggcgagcctc caccgcaaac ccaatccaga	1140
	tggtcttccc tggtggccct cgggggtggcg ggaccctgc cactccctg ccagcccctg	1200
	cccgtggac tccaggcccg gtcgagcccc cgaccggtct cctgaccag catgctgctc	1260
	tcccctgggc ccggcttctc cgcccgtgg gactcccagg cccctccagc ccagccccga	1320
	gagcaggagc cccaaggag gcttggcggc tgtggaggcg agtgggccac gtgtagctgg	1380
	gaggccggca ggaccaggag cccctcacag cgcagcacc acagcatcac gagccacttc	1440
	cactcctggg tggcctgggg gcccccaccc tgctctgagc tgccccttgt tgtgacctgg	1500

	ggccccctg ggtgggccc ccccttgagc ctgggatcca gcctcagcga ggctccagaa	1560
	gtgtcgtctc cgccggccag gcgtcagcgc ctccaccag gatcacacac tcctatctct	1620
	gcacttctgc cctccatcct gctccacgcc gcctctgctt gttattccag cacattccag	1680
	ggtgatgcct gctgaagcca cgagccagt gcctccacc tccccccat ctgaccacc	1740
	ggcccccttc gcacgctgga agcctgccc gcctgaagtg tcctcacctg tcgccctatc	1800
	ctcccccca ctccagccca ccggtgactc agccctcaca gctctctcct ccccgaggga	1860
	gccggtgact tggctctgat ggtgccggga cccagccccg gcatgttcag aatccttgc	1920
	ctttaacctg cgtccacatg tagtcgctc cacctccctg cctgaacctc caggccctgc	1980
	agagcaaaca ctgctgcctg caggagacc ctggggcctt ctccgtcccc tcatcctcct	2040
	aaggagcctc ccctgccacc gtgccagaat gtgccggagg aacagaggcc cgagcctccc	2100
	gtggccccag cgaggcttc tctggggaag acagtgagcc caacgccctg gctctcgagg	2160
	ggtggacgga gtccagctgg catcaaccgg gtgcccctct tcaccggtgt ccacagtcct	2220
	tgagagcaaa gggttcccag aggcgacctc cctcctgcac aggcatttgt catccttacc	2280
[0014]	ctctaggaca gctttgccat gtgcagtga cccctggaca gtgttgctg ccactttgcc	2340
	ggatttggac tgtatacaga ccgaagcatg tggcatgaag cttctgctg tcagcaagtt	2400
	ccttgtccct cgacagtatg tgcccaggct gcccttcaag gtggcagtga tggcagttgt	2460
	ctcttgacg ctgctacag ttctgtcact gactcttaca cacagccctg gagacgggag	2520
	agtgccggga gcattctatg caagtgtcct ggcccttgcg ggctctcca cagcaciaac	2580
	acgagtcagg gaccaccct cttctgctc catgattcca ccaactgggt ggggcagagc	2640
	agtgccaggg ccggaggcac gccccagggt agggcaggtg gccatgccag tgagtgcact	2700
	gcgttctcag ttaattcatc cgaaatatt ctaagtttct tgattattgc agttgcatcc	2760
	ccaagataat gccgccctca ccaagtagaa ggcacatgtg ctctgatggc ccctcccaca	2820
	ctggggctcag ggcacagcaa cttagcgagg cgacgtgggg gctcagagga cctcggacca	2880
	ggctcggcac atggggcttc tccagccagc cagggggaag caccctgcag actgctaact	2940
	tttgcaaaat agagtaaaaa agatcagcta gaaaaataaa acaaaaaagg aaagatatac	3000
	aaaatacaag gcc	3013

<210>	46		
<211>	3015		
<212>	DNA		
<213>	智人		
<400>	46		
	cattgccctc	tgccccgcag cctgcccgtt cccaggccag cgagggcgct cccaggccgg	60
	tctgcagcca	gaacacagcc cgttccatgt gcttgtcctc gggacacatt aggaatgaac	120
	ccaggcctca	gtcctggcct cctcctcaag gctgggtgct cagacgtccc cctcagcccc	180
	tttctctaga	ccttccggct gaacaaacga gaacatctca cagccctgca acagccagga	240
	gctgctcgtg	gagctccacg cccggctgga gagagaggag gcaccctggg cagcccgcc	300
	gcaccaggc	tctcacagtg gaagcccacg tcttcttggg ctctatcttg aaagctgttc	360
	tttccacgac	ggctttgaca agaatcgatt tgagtgagcc ggctgtcaa tacaggccag	420
	cacaggactg	gcctcagggc cacattgggg aggggtggcg ccaggccctg gctgcagccc	480
	acgtgggcaa	aagcatggcc aggcaggagg tggggcctgt gagcttggct acagcgaccg	540
	tgggcgctgg	gccccgggct cctcagccct gaggggagac ccaggcccag gcaggctccc	600
[0015]	aggcgggctc	ccgggctccc agccttccga tcttctcct ttgagacctt gccttctgca	660
	cagtgacagg	aaagagccct gaggccact ttgcagggat gtattgcatt tccagaaagt	720
	tccttccggg	tgacagtgatg tacatgaacc ctggggactc actccaactt ggtattgatt	780
	ttctccacgg	aggaccagc agtcacggcc cgtgtctgca cagccccttg gatcctgcgg	840
	aggaattcag	ccggcccctc cccctgtgcc gaaaaccacg gaggcaaagc caggccaggg	900
	tacagtgaga	acacgggaga ggactgagag accgctggct gccgaggag gaagagcagg	960
	attcgacacc	ccgtcatcgc tgggccaca cgccgccgac agcttccgcg tgtggccatc	1020
	tgtctttcag	aaaccctctg gcagagggac ccagcagatg acacgggggc cgttcacact	1080
	ctgaaacctg	cctggagtca aaactgtct ggcgagcctc caccgaaac ccaatccaga	1140
	tggtcttccc	tggtggccct cgggggtggcg ggcaccctgc cactccctg ccagcccctg	1200
	cccgtggac	tccaggcccc gccgagcccc cgaccggtct cctgaccag catgctgctc	1260
	tcccctgggc	ccggctttct cgcccgtgg gactcccagg cccctccagc ccagccccga	1320
	gagcaggagc	cccaaggag gcttggcggc tgtggaggcg agtgggccac gtgtagctgg	1380
	gaggccggca	ggaccaggag cccctcacag cgcagcacc acagcatcac gagccacttc	1440

	cactcctggg tggcctgggg gcccccaccc tgctctgagc tgccccttgt tgtgacctgg	1500
	ggcccccg ggtgggcccc ccccttgagc ctgggatcca gcctcagcga ggctccagaa	1560
	gtgtcgtctc cgccggccag gcgtcagcgc ctccaccag gatcacacac tcctatctct	1620
	gcatttctgc cctccatcct gctccacgcc gcctctgctt gttattccag cacattccag	1680
	ggatgatgcct gctgaagcca cgagccagc gcctccacc tacccccat ctgaccacc	1740
	ggcccccttc gcacgctgga agcctgcccc gcctgaagtgc tcctcacctg tcgccctatc	1800
	ctcccccca ctccagccca ccggtgactc agccctcaca gctctctcct ccccgaggga	1860
	gccggtgact tggctctgat ggtgccggga cccagccccg gcatgttcag aatccttctc	1920
	ctttaacctg cgtccacatg tagtcgctc cacctccctg cctgaacctc caggccctgc	1980
	agagcaaaca ctgctgcctg caggagacc ctggggcctt ctccgtcccc tcctctcct	2040
	aaggagcctc ccctgccacc gtgccagaat gtgccggagg aacagaggcc cgagcctccc	2100
	gtggccccag cgaggcttc tctggggaag acagtgagcc caacgccctg gctctcgagg	2160
[0016]	ggatggacgga gtccagctgg catcgaccgg gtgcccctct tcaccggtgt ccacagtcct	2220
	tgagagcaaa gggttccag aggcgacctc cctcctgcac aggcatttgt catccttacc	2280
	ctctaggaca gctttgccat gtgcagtga cccctggaca gtgttgctg ccactttgcc	2340
	ggatttggac tgtatacaga ccgaagcatg tggcatgaag ccttctgctg tcagcaagtt	2400
	ccttgtccct cgacagtatg tgcccaggct gcccttcaag gtggcagtga tggcagttgt	2460
	ctcttgacag ctgcgtacag ttctgtcact gactcttaca cacagccctg gagacgggag	2520
	agtgccggga gcattctatg caagtgtcct ggcccttgcg ggcgtctcca cagcaciaac	2580
	acgagtcagg gaccaccct cttctgctc catgattcca ccaactgggt ggggcagagc	2640
	agtgccaggg ccggaggcac gccccagggt agggcaggtg gccatgccag tgagtgcact	2700
	gcgttctcag ttaattcatc cgaaatatt ctaagtttct tgattattgc agttgcatcc	2760
	ccaagataat gccgccctca ccaagtagaa ggcacatgtg ctctgatggc ccctcccaca	2820
	ctggggctcag ggcacagcaa cttagcgagg cgacgtgggg gctcagagga cctcgacca	2880
	ggctcggcac atggggcttc tccagccagc cagggggaag caccctgcag actgctaact	2940
	tttgcaaat agagtaaaaa agatcagcta gaaaaataaa acaaaaaagg aaagatatac	3000

	aaaaaaaaa aaaaa	3015
	<210> 47	
	<211> 2079	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 47	
	actgctgtgc agggcaggaa agctccacac acacagccca gcaaacagca gcacgctgct	60
	gaaaaaaga ctcagaggag agagataagg aaggaaagta gtgatggatc tcatcccaaa	120
	cttggccgtg gaaacctggc ttctcctggc tgtcagcctg atactcctct atctatatgg	180
	aaccctgaca catggacttt ttaagaagct tggaattcca gggcccacac ctctgccttt	240
	tttgggaaat gctttgtcct tccgtaaggg ctattggacg tttgacatgg aatgttataa	300
	aaagtataga aaagtctggg gtatttatga ctgtcaacag cctatgctgg ctatcacaga	360
	tcccgacatg atcaaaacag tgctagtga agaatgttat tctgtcttca caaacggag	420
	gcctttcggg ccagtgggat ttatgaaaaa tgccatctct atagctgagg atgaagaatg	480
[0017]	gaagagaata cgatcattgc tgtctccaac attcaccagc ggaaaactca aggagatggt	540
	ccctatcatt gcccagtatg gagatgtgtt ggtgagaaat ctgaggcggg aagcagagac	600
	aggcaagcct gtcaccttga aacacgtctt tggggcctac agcatggatg tgatcactag	660
	cacatcattt ggagtgaaca tcgactctct caacaatcca caagaccctt ttgtggaaaa	720
	caccaagaag cttttaagat ttaatccatt agatccattc gttctctcaa taaaagtctt	780
	tccattcctt accccaattc ttgaagcatt aaatatcact gtgtttccaa gaaaagtatt	840
	aagttttcta acaaaatctg taaaacagat aaaagaaggt cgctcaaag agacacaaaa	900
	gcaccgagtg gatttccttc agctgatgat tgactctcag aattcaaaag actctgagac	960
	ccacaaagct ctgtctgatc tggagctcat ggcccaatca attatcttta tttttgctgg	1020
	ctatgaaacc acgagcagtg ttctctcctt cattatatat gaactggcca ctcaccctga	1080
	tgtccagcag aaagtcaga aggaaattga tacagtttta cccaataagg caccaccac	1140
	ctatgatact gtgctacagt tggagtatct tgacatggtg gtgaatgaaa cactcagatt	1200
	attcccagtt gctatgagac ttgagagggt ctgcaaaaaa gatgttgaaa tcaatgggat	1260
	gtttattccc aaaggggtgg tggatgatgat tccaagctat gttcttcatc atgacccaaa	1320

gtactggaca gagcctgaga agttcctccc tgaaagggtc agtaaaaaga acaaggacaa	1380
catagatcct tacatataca caccctttgg aagtggaccc agaaactgca ttggcatgag	1440
gtttgctctc gtgaacatga aacttgctct agtcagagtc cttcagaact tctccttcaa	1500
accttgtaaa gaaacacaga tccccctgaa attacgcttt ggaggacttc ttctaacaga	1560
aaaaccatt gttctaaagg ctgagtcaag ggatgagacc gtaagtggag cctgatttcc	1620
ctaaggactt ctggtttgct ctttaagaaa gctgtgcccc agaacaccag agacctcaaa	1680
ttactttaca aatagaacct tgaaatgaag acgggcttca tccaatgtgc tgataaata	1740
atcagggatt ctgtacgtgc attgtgctct ctcattggtc gtatagagtg ttatacttgg	1800
taatatagag gagatgacca aatcagtgc ggggaagtag atttggcttc tctgcttctc	1860
ataggactat ctccaccacc cccagttagc accattaact cctcctgagc tctgataaca	1920
taattaacat ttctcaataa tttcaaccac aatcattaat aaaaatagga attattttga	1980
tggtctaac agtgacattt atatcatgtg ttatatctgt agtattctat agtaagcttt	2040
atattaagca aatcaataaa aacctcttta caaaagtat	2079

[0018]

<210> 48  
 <211> 6348  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 48	
aattaatfff acttaggata agtgttgta ttattgffff tattgttggt ctgttagtta	60
ctcaaaactt cattctaatt gtgccctgag tttgttaaaa taccatactg tatttttgtg	120
taacatgtaa ataggcatta atttttgaga aatagaaatg tttatcctta atgtatffff	180
aatttgctaa cattgatfff ttatfffctt tcctgaaata gcttatfffcc taaaatgaaa	240
gaatftattc tcagatgaat aatftttata tcagctattc ttatcagagc aataaacaaa	300
taccaatgat gcgctcagcc aacaattcat tacactctct gaagagtaac tggacaagga	360
gaaaaacata gggaaaaaac caacagaatt tgttggcatg ttctacacac agaccatggc	420
ttttcagaag ccaagctgaa tcaaaacagt tttaaaagag gcaaccatft gtagaggagt	480
ccttgaagga ttcttcattg tttcttggga caaaaagaga ccagtggatc caagtgcftc	540
aaatactftc ctcttattft cftaactcta ttgctctgca atatftactt taccctgfta	600

	atgaacagga caaaatgggtt aaaaaagaga taagcgtgcg tcaacaaatt caggctcttc	660
	tgtacaagaa ttttcttaaa aatggagaa taaaaagaga gtttattgga atggacaata	720
	acattgtttc tagggctata tttgtgcatc ttttcggaac acttcagagc tacccgtttt	780
	cctgaacaac ctccctaaagt cctgggaagc gtggatcagt ttaatgactc tggcctggta	840
	gtggcatata caccagtcag taacataaca caaaggataa tgaataagat ggccttggct	900
	tcctttatga aaggaagaac agtcattggg acaccagatg aagagacat ggatatagaa	960
	cttccaaaa aataccatga aatgggtggga gttatattta gtgatacttt ctcatatcgc	1020
	ctgaagttta attggggata tagaatccca gttataaagg agcactctga atacacagaa	1080
	cactgttggg ccatgcatgg tgaattttt tgttacttgg caaagtactg gctaaaaggg	1140
	ttttagctt ttcaagctgc aattaatgct gcaattatag aagtcacaac aaatcattct	1200
	gtaatggagg agttgacatc agttattgga ataaatatga agataccacc tttcatttct	1260
	aagggagaaa ttatgaatga atggtttcat tttacttgct tagtttcttt ctcttctttt	1320
	atatactttg catcattaaa tgttgcaagg gaaagaggaa aatttaagaa actgatgaca	1380
[0019]	gtgatgggtc tccgagagtc agcattctgg ctctcctggg gattgacata catttgcttc	1440
	atcttcatta tgtccatttt tatggctctg gtcataacat caatcccaat tgtatttcat	1500
	actggcttca tggatgattt cacactctat agcttatatg gcctttcttt gatagcattg	1560
	gctttcctca tgagtgtttt aataaggaaa cctatgctcg ctggtttggc tggatttctc	1620
	ttcactgtat tttggggatg tctgggattc actgtgttat atagacaact tcctttatct	1680
	ttgggatggg tattaagtct tcttagccct tttgccttca ctgctggaat ggcccagatt	1740
	acacacctgg ataattactt aagtgggtgtt atttttcctg atccctctgg ggattcatac	1800
	aaaatgatag ccactttttt cttttggca tttgatactc ttttctattt gatattcaca	1860
	ttatattttg agcgagtttt acctgataaa gatggccatg gggattctcc attatttttc	1920
	cttaagtcct cattttggtc caaacatcaa aatactcatc atgaaatctt tgagaatgaa	1980
	ataaatcctg agcattcctc tgatgattct tttgaaccgg tgtctccaga attccatgga	2040
	aaagaagcca taagaatcag aatgtttata aaagaatata atggaaagac tggaaaagta	2100
	gaagcattgc aaggcatatt ttttgacata tatgaaggac agatcactgc aatacttggg	2160
	cataatggag ctggtaaadc aacactgcta aacattctta gtggattgtc tgtttctaca	2220

	gaaggatcag ccactattta taatactcaa ctctctgaaa taactgacat ggaagaaatt	2280
	agaaagaata ttggatthttg tccacagttc aatthttcaat ttgacttcct cactgtgaga	2340
	gaaaacctca gggatthttgc taaaataaaa gggattcagc caaaggaagt ggaacaagag	2400
	gtaaaaagaa ttataatgga attagacatg caaagcattc aagacattat tgctaaaaaa	2460
	ttaagtgggtg ggcagaagag aaaactaaca ctagggattg ccatcttagg agatcctcag	2520
	gtthttgctgc tagatgaacc aactgctgga ttggatccct thtcaagaca ccgagtgtgg	2580
	agcctcctga aggagcataa agtagaccga cttatcctct tcagtacca attcatggat	2640
	gaggctgaca tcttgctga taggaaagta thtctgtcta atgggaagt gaaatgtgca	2700
	ggatcatctt tgthttctgaa gcgaaagtgg ggtattggat atcatttaag thtacacagg	2760
	aatgaaatgt gtgacacaga aaaaatcaca tcccttatta agcagcacat tcctgatgcc	2820
	aagttaaca cagaaagtga agaaaaactt gtatatagtt tgcctthtga aaaaacgaac	2880
	aaatthtcag atctthtacag tgacctgat aagtgttctg accaggcat aaggaattat	2940
[0020]	gctgthtcag tgacatctct gaatgaagta thtctgaacc tagaagaaa atcagcaatt	3000
	gatgaaccag atthtgacat tgggaaaca gagaaaatac atgtgacaag aaatactgga	3060
	gatgagtctg aaatggaaca ggttctthgt tctcttctg aaacaagaaa ggctgtcagt	3120
	agtgcagctc tctggagacg acaaatctat gcagtggcaa cacttcgctt cttaaagta	3180
	aggcgtgaaa ggagagctct thtgtgttht ttactagtac ttggaattgc thttatcccc	3240
	atcattctag agaagataat gtataaagta actcgtgaaa ctcatthttht ggagthttca	3300
	cccagtatgt atthccttht tctggaaca atcccgaaga cgctcttac cagcctgtta	3360
	atcgttaata atacaggatc aaatattgaa gacctcgtgc attcactgaa gtgtcaggat	3420
	atagthtttht aaatagatga cthtagaac agaaatggct cagatgatcc ctctacaat	3480
	ggagccatca tagtgtctgg tgaccagaag gattacagat thtctgttht gtgtaatacc	3540
	aagaaattga atthgtthtc thtctthttht ggaattgtta gcaatgcct tatgggaatt	3600
	thtaacttca cggagcttht tcaaatggag agcactthcat thtctcgtga tgacatagtht	3660
	ctggatcttht gthttataga tgggtccata thttthgttht tgatcacaaa ctgcgtthct	3720
	cctthttatcg gcatgagcag catcagcgat tataaaaaaa atgttcaatc ccagttatgg	3780

	atrtcaggcc tctggccttc agcatactgg tgtggacagg ctctgggtgga cattccatta	3840
	tacttccttga ttctcttttc aatacattta atttactact tcatatcttct gggattccag	3900
	ctttcatggg aactcatggt tgttttgggt gtatgcataa ttggttgtgc agtttctctt	3960
	atattcctca catatgtgct ttcatcatc tttcgcaagt ggagaaaaa taatggcttt	4020
	tggtcttttg gcttttttat tatcttaata tgtgtatcca caattatggt atcaactcaa	4080
	tatgaaaaac tcaacttaat tttgtgcatg attttcatac cttccttcac tttgctgggg	4140
	tatgtcatgt tattgatcca gctcgacttt atgagaaact tggacagtct ggacaataga	4200
	ataaatgaag tcaataaaac cattctttta acaaccttaa taccatacct tcagagtgtt	4260
	atrttccttt ttgtcataag gtgtctggaa atgaagtatg gaaatgaaat aatgaataaa	4320
	gaccagttt tcagaatctc tccacggagt agagaaactc atcccaatcc ggaagagccc	4380
	gaagaagaag atgaagatgt tcaagctgaa agagtccaag cagcaaatgc actcactgct	4440
	ccaaacttgg aggaggaacc agtcataact gcaagctggt tacacaagga atattatgag	4500
	acaaagaaaa gttgcttttc aacaagaaag aagaaaatag ccatcagaaa tgtttccttt	4560
[0021]	tgtgttaaaa aaggatgaagt tttgggatta ctaggacaca atggagctgg taaaagtact	4620
	tccattaata tgataactgg gtgcacaaaag ccaactgcag gagtggtggt gttacaaggc	4680
	agcagagcat cagtaaggca acagcatgac aacagcctca agttcttggg gtactgcctt	4740
	caggagaact cactgtggcc caagcttaca atgaaagagc acttgaggtt gtatgcagct	4800
	gtgaaaggac tgggcaaaga agatgctgct ctcagtattt cacgattggt ggaagctctt	4860
	aagctccagg aacaacttaa ggctcctgtg aaaactctat cagagggaat aaagagaaag	4920
	ctgtgctttg tgctgagcat cctggggaac ccatcagtgg tgcttctaga tgagccgttc	4980
	accgggatgg accccgaggg gcagcagcaa atgtggcaga tacttcaggc taccgttaaa	5040
	aacaaggaga ggggcaccct cttgaccacc cattacatgt cagaggctga ggctgtgtgt	5100
	gaccgtatgg ccatgatggt gtcaggaacg ctaagggtgta ttggttccat tcaacatctg	5160
	aaaaacaagt ttggtagaga ttatttacta gaaataaaaa tgaaagaacc taccaggtg	5220
	gaagctctcc acacagagat tttgaagctt ttcccacagg ctgcttggca ggaaagatat	5280
	tcctctttaa tggcgtataa gttacctgtg gaggatgtcc accctctatc tcgggccttt	5340
	ttcaagttag aggcatgaa acagacctc aacctggagg aatacagcct ctctcaggct	5400

	accttggagc aggtattcctt agaactctgt aaagagcagg agctgggaaa tgttgatgat	5460
	aaaattgata caacagttga atggaaactt ctcccacagg aagaccctta aatgaagaa	5520
	cctcctaaca ttcaatttta ggtcctacta cattgttagt ttccataatt ctacaagaat	5580
	gtttcctttt acttcagtta acaaaaagaaa acatttaata aacattcaat aatgattaca	5640
	gttttcattt ttaaaaattt aggatgaagg aaacaaggaa atatagggaa aagtagtaga	5700
	caaaattaac aaaatcagac atgttattca tcccacaacat gggctctattt tgtgcttaaa	5760
	aataatttaa aaatcataca atattagggt ggttatcggg tattatcaat aaagctaaca	5820
	ctgagaacat ttacaaata aaaatatgag gtttttagcc tgaacttcaa atgtatcagc	5880
	tatttttaaa cattatttac tcggattcta atttaatgtg acattgacta taagaaggtc	5940
	tgataaactg atgaaatggc acagcataac atttaattat aatgacattc tgattataaa	6000
	ataaatgcat gtgaatttta gtacatatg aagttatatg gaagaagata gccataatct	6060
	gtaagaaagt accgcagtta atattttcct tagccaactt atattcaatg tattttttat	6120
	ggatcctttt tcaaaggtag tatcagtagg catagtcatt ttctgtatct tttcacctca	6180
[0022]	cagttcatga acatttccca tgtcattata gcacttttgt gttatataat tgctgcatta	6240
	atgttatagc tgtattgatg taataccaga gttgttacgt tcgggttata tgcaagtta	6300
	tttcttagaa ataaaacttt gatggacttt taaaaaaaa aaaaaaaaa	6348
	<210> 49	
	<211> 1892	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 49	
	aaaccggtgc caacgtgcg cggacgccgc gccgccgccg ccgctggagt ccgccgggca	60
	gagccggccg cggagcccgg agcaggcggg gggaaagtgcc cctagaacca gctcagccag	120
	cggcgcttgc acagagcggc cggacgaaga gcagcgagag gaggagggga gagcggctcg	180
	tccacgcgcc ctgcgccgcc gccggcccgg gaaggcagcg aggagccggc gcctcccgcg	240
	ccccgcggtc gccctggagt aatttcggat gcccagccgc ggccgccttc cccagtagac	300
	ccgggagagg agttgcggcc aacttgtgtg cttttcttcc gccccggtgg gagccggcgc	360
	tgcgcaagg gctctcccgg cggctcatgc tgccggccct gcgcctgccc agcctcgggt	420

gagccgcctc cggagagacg ggggagcgcg gcggcgccgc gggctcggcg tgctctcctc	480
cggggacgcg ggacgaagca gcagccccgg gcgcgcgcca gaggcattgga gcgctgcccc	540
agcctagggg tcaccctcta cgccctggtg gtggtcctgg ggctgcgggc gacaccggcc	600
ggcggccagc actatctcca catccgcccg gcacccagcg acaacctgcc cctggtggac	660
ctcatcgaac acccagaccc tatctttgac cccaaggaaa aggatctgaa cgagacgctg	720
ctgcgctcgc tgctcggggg cactacgac ccaggcttca tggccacctc gcccccgag	780
gaccggcccc gcggggcggg ggggtgcagct gggggcgcgagg aggacctggc ggagctggac	840
cagctgctgc ggcagcggcc gtcgggggccc atgccgagcg agatcaaagg gctagagttc	900
tccgagggct tggcccaggg caagaagcag cgcctaagca agaagctgcg gaggaagtta	960
cagatgtggc tgtggtcgca gacattctgc cccgtgctgt acgctggaa cgacctgggc	1020
agccgctttt ggccgcgcta cgtgaaggct ggcagctgct tcagtaagcg ctctgtctcc	1080
gtgcccgagg gcatggtgtg caagccgtcc aagtccgtgc acctcacggt gctgcggtgg	1140
cgctgtcagc ggcgcggggg ccagcgtgc ggctggattc ccatccagta cccatcatt	1200
[0023] tccgagtga agtgctcgtg ctagaactcg ggggccccct gcccgcaccc ggacacttga	1260
tcgatcccca ccgaccccc ctgcaccgcc tccaaccagt tccaccaccc tctagcgagg	1320
gttttcaatg aacttttttt tttttttttt tttttttttc tgggctacag agacctagct	1380
ttctggttcc tgtaatgcac tgtttaactg tgtaggaatg tatatgtgtg tgtatatacg	1440
gtcccagttt taatttactt attaaaaggc cagtattata cgttaaaagt taccggcttc	1500
tactgtatgtt ttaaaaaaaaa gtaagcaaaa gaaaaaaaaa agaacagaga aaagagagac	1560
ttattctggt tgttgctaataaatgttaacc tgctatattat attccagtgc ccttcgcatg	1620
gcgaagcagg ggggaaaagt tttttttttc ttgaagtaca aagagacggg ggaacttttg	1680
tagaggactt tttaaaagct attttccatt cttcggaaag tgttttggtt ttccttggac	1740
ctcgaagaag ctatagagtt caatgttatt ttacagttat tgtaaatata gagaacaaat	1800
ggaatgacta atcattgtaa attaagagta tctgctatatt attctttata atatcccgtg	1860
tagtaaatga gaaagaagtg cagagcagga tt	1892

&lt;210&gt; 50

	<211> 3227	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 50	
	cccactctgc agttgtctcc cgagcgctgg ctgcgccgcc cgagccgctg ggccggggaa	60
	gcaactggccg ttcgctcccg ggccggctcc gccaggcgct cgcaggcatg cagcccggga	120
	gcaggaggcg ctccccgggc cgctgctgag ccggccgggg cggcggggac cagcgccagc	180
	ggagcccctc ccaccttgcc ccggggcaga cgagcggcgc cccgacaccc cctcttctcc	240
	cgcagccccg ccagcgccac cccccgcggg ccgcaggggc tcatgcagcc gccaaaggag	300
	aggctagtgg taacaggccg agctggatgg atgggtatgg ggagaggggc aggacgttca	360
	gccctgggat tctggccgac cctcgccttc cttctctgca gcttccccgc agccacctcc	420
	ccgtgcaaga tcctcaagtg caactctgag ttctggagcg ccacgtcggg cagccacgcc	480
	ccagcctcag acgacacccc cgagttctgt gcagccttgc gcagctacgc cctgtgcacg	540
	cggcggacgg cccgcacctg ccggggtgac ctggcctacc actcggccgt ccatggcata	600
[0024]	gaggacctca tgagccagca caactgctcc aaggatggcc ccacctcga gccacgcctg	660
	cgcacgctcc caccggccgg agacagccag gagcgctcgg acagccccga gatctgccat	720
	tacgagaaga gctttcacia gcaactcggc acccccaact acacgcactg tggcctcttc	780
	ggggaccac acctcaggac tttaccgac cgcttcaga cctgcaaggt gcagggcgcc	840
	tggccgctca tcgacaataa ttacctgaac gtgcaggtca ccaacacgcc tgtgctgccc	900
	ggctcagcgg ccaactgccac cagcaagctc accatcatct tcaagaactt ccaggagtgt	960
	gtggaccaga aggtgtacca ggctgagatg gacgagctcc cggccgcctt cgtggatggc	1020
	tctaagaacg gtggggacaa gcacggggcc aacagcctga agatcactga gaaggtgtca	1080
	ggccagcacg tggagatcca ggccaagtac atcggcacca ccatcgtggt gcgccagggtg	1140
	ggccgctacc tgacctttgc cgtccgcatg ccagaggaag tggatcaatgc tgtggaggac	1200
	tgggacagcc agggctctta cctctgcctg cggggctgcc ccctcaacca gcagatcgac	1260
	ttccaggcct tccacaccaa tgctgagggc accggtgccc gcaggctggc agccgccagc	1320
	cctgcaccca cagccccga gacctcca tacgagacag ccgtggccaa gtgcaaggag	1380
	aagctgccgg tggaggacct gtactaccag gcctgcgtct tcgacctcct caccacgggc	1440

	gacgtgaact tcacactggc cgcctactac gcgttggagg atgtcaagat gtcactcc	1500
	aacaaagaca aactgcacct gtatgagagg actcgggacc tgccaggcag ggcggctgcg	1560
	gggctgcccc tggcccccg gccctcctg ggcgccctcg tcccgtcct ggccctgctc	1620
	cctgtgttct gctagacgcg tagatgtgga gggaggcgcg ggctccgtcc tctcggcttc	1680
	cccatgtgtg ggctgggacc gccacgggg tgcatatctc ctggcgtgtc caccatggcc	1740
	ccgcagaacg ccagggaccg cctgctgcca agggctcagg cacggacccc tccccttcta	1800
	gtgcacgtga caaggttgtg gtgactggtg ccatgatgtt tgacagtaga gctgtgtgag	1860
	agggagagca gctcccctcg ccccgcccct gcagtgtgaa tgtgtgaaac atcccctcag	1920
	gctgaagccc cccaccccca ccagagacac actgggaacc gtcagagtca gtccttccc	1980
	cctcgcaatg cactgaaagg cccggccgac tgctgctcgc cgatccgtgg ggccccctgt	2040
	ggccgccaca cgcacgaca cactcttaca cgagagcaca ctcgatcccc ctaggccagc	2100
	ggggacaccc cagccacaca gggaggcatc cttggggctt ggccccaggc agggcaaccc	2160
	cggggcgctg cttggcacct tagcagactg ctggaacctt ttggccagta ggtcgtgccc	2220
[0025]	gcctgggtgc ttctggcctg tggcctccct gccatggtc acctggctgc tgtgggtacc	2280
	agtgcaggtc ccggttttca ggcacctgct cagctgcccg tctctggcct gggccccctgc	2340
	cccttcacc ctgtgcttag aaagtcgaag tgcttggttc taaatgtcta aacagagaag	2400
	agatccttga cttctgttcc tctctctcct gcagatgcaa gagctcctgg gcaggggtgc	2460
	ctgggccccca ggggtgtggca ggagaccagc tggatggggc cagctggcct gccctgatcc	2520
	tctgcttctc cctcacaacc ccaagagccc ccagcccggc ccatccacgt ctggagtctg	2580
	gggagaggag caggtcttta ggactctcag ctctgagcat ccctggcagg gtcttcaacc	2640
	tctaattctc tcccttaagc cctgtggcca cacagccagg agagacttgc cgctggctcc	2700
	cgctcattt cagcccaggg tgctcatcca ggggcccaga acagtcccac ctgtgctgct	2760
	gtgcccacag cacaaagcca ggcttactc ccaaaagtgc agccaggccc tggagggtga	2820
	tcctgccagc agccctacag ctccacacc taccaccca tcggcagccc ctctgctgtt	2880
	ccccagggac ctctcataca ctggccagga ggctgcagaa cgtgtgtctc cccctccctc	2940
	caagaggctc tgctccctct gccagaaccg tgtgtgggcg ggtgggaggc cgctcggggc	3000
	ccggcccctc cctctccctg ctggtttttag ttggtcccta tgttgaagt aaaaagtga	3060

	gcactttatt ttggttgtgt ttgctcacgt tctgcttgga agtggggacc cctcactgcg	3120
	tccacgtgtc tgcgacctgt gtggagtgtc accgcgtgta catactgtaa attatttatt	3180
	aatggctaaa tgcaagtaaa gtttggtttt tttgttattt tctttta	3227
	<210> 51	
	<211> 3200	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 51	
	ccatactgaa gccctcccaa gtgcagcctt gcgggcctcg cagagagcgc caaacatcc	60
	ggccctgctgc gccacgcgga ccggcatagc catctctctg gagtggcagc tgtgccaagg	120
	tggcaagggtt aggcccgag gccctcagca cgggggcgca gccggggcaa gtcttcagga	180
	agcagcgagg tgcttgaagg ggggtgctgga ggcaggccaa acccagtcag gatgggtggc	240
	ctggggccac gacgggcggg aacctcagag gagaggctag tggtaacagg ccgagctgga	300
	tggatgggta tggggagagg ggcaggacgt tcagccctgg gattctggcc gaccctcgcc	360
[0026]	ttccttctct gcagcttccc cgcagccacc tccccgtgca agatcctcaa gtgcaactct	420
	gagttctgga gcgccacgtc gggcagccac gccccagcct cagacgacac ccccgagttc	480
	tgtgcagcct tgcgcagcta cgccctgtgc acgcggcgga cggcccgcac ctgccggggt	540
	gacctggcct accactcggc cgtccatggc atagaggacc tcatgagcca gcacaactgc	600
	tccaaggatg gccccacctc gcagccacgc ctgctgcacgc tcccaccggc cggagacagc	660
	caggagcgct cggacagccc cgagatctgc cattacgaga agagctttca caagcactcg	720
	gccaccccca actacacgca ctgtggcctc ttcggggacc cacacctcag gactttcacc	780
	gaccgcttcc agacctgcaa ggtgcagggc gcctggccgc tcatcgaaa taattacctg	840
	aacgtgcagg tcaccaaac gcctgtgctg cccggctcag cggcactgc caccagcaag	900
	ctcaccatca tcttcaagaa cttccaggag tgtgtggacc agaagggtgta ccaggctgag	960
	atggacgagc tcccggccgc cttcgtggat ggctctaaga acggtgggga caagcacggg	1020
	gccaacagcc tgaagatcac tgagaagggtg tcaggccagc acgtggagat ccaggccaag	1080
	tacatcgga ccaccatcgt ggtgcgccag gtgggccgct acctgacctt tgccgtccgc	1140
	atgccagagg aagtgggtcaa tgctgtggag gactgggaca gccagggtct ctacctctgc	1200

	ctgcggggct gccccctcaa ccagcagatc gacttccagg ccttccacac caatgctgag	1260
	ggcaccgggtg cccgcaggct ggccagccgcc agccctgcac ccacagcccc cgagaccttc	1320
	ccatacgaga cagccgtggc caagtgcaag gagaagctgc cggtaggagga cctgtactac	1380
	caggcctgcg tcttcgacct cctcaccacg ggccagctga acttcacact ggccgcctac	1440
	tacgcgttgg aggatgtcaa gatgctccac tccaacaaag acaaactgca cctgtatgag	1500
	aggactcggg acctgccagg cagggcggct gcggggctgc ccctggcccc ccggccccctc	1560
	ctgggcgccc tcgtcccgtc cctggccctg ctccctgtgt tctgctagac gcgtagatgt	1620
	ggagggaggc gcgggctccg tcctctcggc ttccccatgt gtgggctggg accgcccacg	1680
	gggtgcagat ctccctggcgt gtccaccatg gccccgcaga acgcccaggga ccgacctgtg	1740
	ccaagggctc aggcacggac ccctcccctt ctagtgcacg tgacaagggt gtgggtgactg	1800
	gtgccatgat gtttgacagt agagctgtgt gagagggaga gcagctcccc tcgccccgcc	1860
	cctgcagtgt gaatgtgtga aacatcccct caggctgaag cccccaccc ccaccagaga	1920
	cacactggga accgtcagag tcagctcctt ccccctcgca atgcaactgaa aggcccggcc	1980
[0027]	gactgctgct cgccgatccg tggggcccc tgtgcccgcc acacgcacgc acacactctt	2040
	acacgagagc acactcgatc cccctaggcc agcggggaca ccccagccac acagggaggc	2100
	atccttgggg cttggcccca ggccagggcaa ccccggggcg ctgcttggca ccttagcaga	2160
	ctgctggaac cttttggcca gtaggtcgtg cccgcctggg gccttctggc ctgtggcctc	2220
	cctgccccatg ttcacctggc tgctgtgggt accagtgacg gtcccgggtt tcaggcacct	2280
	gctcagctgc ccgtctctgg cctgggcccc tgccccttcc accctgtgct tagaaagtcg	2340
	aagtgcttgg ttctaaatgt ctaaacagag aagagatcct tgacttctgt tcctctctct	2400
	cctgcagatg caagagctcc tgggcagggg tgccctgggccc ccaggggtgtg gcaggagacc	2460
	cagtggatgg ggccagctgg cctgccctga tcctctgctt cctcctcaca accccaagag	2520
	ccccagccc ggtccatcca cgtctggagt ctggggagag gagcagggtc ttaggactct	2580
	cagctctgag catccctggc agggctctca acctctaata tcttccctta agccctgtgg	2640
	ccacacagcc aggagagact tgccgctggc tcccgcctca tttcagccca gggtgctcat	2700
	ccaggggccc agaacagtcc cacctgtgct gctgtgcccc cagcacaag ccaggcttca	2760

	ctcccaaaag tgcagccagg ccctggaggg tgatcctgcc agcagcccta cagctccaca	2820
	ccctacccac ccatcggcag cccctctgct gttccccagg gacctctcat acactggcca	2880
	ggaggctgca gaacgtgtgt ctccccctcc ctccaagagg tcctgctccc tctgccagaa	2940
	ccgtgtgtgg gcgggtggga gggcgctcgg ggcccggccc ctccctctcc ctgctggttt	3000
	tagttggccc ctatgttggga agtaaaaagt gaagcacttt attttggttg tgtttgcaca	3060
	cgttctgctt ggaagtgggg acccctcact gcgtccacgt gtctgcgacc tgtgtggagt	3120
	gtcaccgcgt gtacatactg taaattattt attaatggct aaatgcaagt aaagtttgg	3180
	ttttttgtta ttttctttta	3200
	<210> 52	
	<211> 590	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 52	
[0028]	atcccactgg gaagcttcaa catagctgtg gaagtctgca gtctacagga gcctactata	60
	gacattctac aaccaaccag aatcatggaa cagccaactt ccagcaccaa tggggagaag	120
	acgaagagcc cctgtgaatc caataacaaa aaaaatgatg agatgcaaga ggtaccaaac	180
	agagtcttag cccccgaaca gagtttgaag aacacaaaaa catcagaata tccaataata	240
	tttgtgtatt acctcaggaa gggtaagaaa ataaattcaa atcaactgga gaatgaacag	300
	tccaagaga actccatcaa tccaatccaa aaggaggagg acgaaggcgt agacttatct	360
	gaaggatctt caaatgagga tgaagacctt ggcccatgtg aaggacctt aaaggaggac	420
	aaagatctag actcatctga aggatcctca caggaggatg aagacctagg cttatctgaa	480
	ggatcttcac aggacagtgg ggaggattag tcacacatgg agaaacaaa ttggacaaat	540
	catcaccact gatggcgatg attacaataa aatcaagttt aaggagctga	590
	<210> 53	
	<211> 1408	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 53	
	caccttctc ccatcttgcc ttctccctcg agttgggacc cggaagaac catgaagtgg	60
	ctgctgctgc tgggtctggt ggcgctctct gagtgcacatca tgtacaaggt cccctcatc	120

	agaaagaagt ccttgaggcg caccctgtcc gagcgtggcc tgctgaagga cttcctgaag	180
	aagcacaacc tcaaccagc cagaaagtac ttccccagt gggaggctcc caccctggta	240
	gatgaacagc ccctggagaa ctacctggat atggagtact tcggcactat cggcatcgga	300
	actcctgccc aggatttcac cgtcgtcttt gacaccggct cctccaacct gtgggtgccc	360
	tcagtctact gctccagtct tgcctgcacc aaccacaacc gcttcaacc tgaggattct	420
	tccacctacc agtccaccag cgagacagtc tccatcacct acggcaccgg cagcatgaca	480
	ggcatcctcg gatacgacac tgtccagggt ggaggcatct ctgacaccaa tcagatcttc	540
	ggcctgagcg agacggaacc tggctccttc ctgtattatg ctcccttcga tggcatcctg	600
	gggctggcct accccagcat ttctcctcc ggggccacac ccgtctttga caacatctgg	660
	aaccagggcc tggttttca ggacctctc tctgtctacc tcagcgccga tgacaagagt	720
	ggcagcgtgg tgatctttgg tggcattgac tcttcttact aacttgaag tctgaactgg	780
	gtgcctgtta ccgtcgaggg ttactggcag atcaccgtgg acagcatcac catgaacgga	840
	gagaccatcg cctgtgctga gggctgccag gccattgttg acaccggcac ctctctgctg	900
[0029]	accggcccaa ccagcccat tgccaacatc cagagcgaca tcggagccag cgagaactca	960
	gatggcgaca tggtggtcag ctgctcagcc atcagcagcc tgcccagat cgtcttcacc	1020
	atcaatggag tccagtaccc cgtgccacc agtgcctaca tcctgcagag cgaggggagc	1080
	tgcatcagtg gcttccaggg catgaacgtc cccaccgaat ctggagagct ttggatcctg	1140
	ggtgatgtct tcatccgcca gtactttacc gtcttcgaca gggcaaacia ccaggtcggc	1200
	ctggcccctg tggcttaagc ctaagtctct tcagccacct cccaggaaga tctggcctcc	1260
	gtcctatgcc cactttagat gtatctaatt ctctgactg ttcttcccag gggagtgtga	1320
	aggtcttggc cctgttcct gtctaccaa taacgtagaa taaaaacata acccactgaa	1380
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa	1408
	<210> 54	
	<211> 5073	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 54	
	aggctggccc tggctgcctg cggcgcgggc gcctccctcg cagccgctgc tgccgacgcc	60

	gctgcgctcc cgcctcctgt cggttcccgg gttcccgctg cggctgcggt tctggcagcc	120
	gagccccgc ggtgctgcag cccagcttta gcgcgcagac cgacccgcgc cccttcttcg	180
	ccgccggcag cctctaatac acgcggcgcg ttgcggcagg tgccctgggc gtactgaggc	240
	gcggtggcct gagccccgcc gccatcgatg accccggctc cggacttgct tcaggctggc	300
	cacccccgt cttgtttcat catctgtgtt gagtaacat ggggaggaag ctggacctgt	360
	ctggtttgac tgatgatgaa acagagcatg ttcttcaggt ggttcaaaga gacttcaatc	420
	ttcgcaaaaa agaagaagaa cgactaagtg agctgaagca gaagctggat gaggaaggca	480
	gcaagtgcag catcctctcg aagcaccagc agtttgtgga gcaactgctgc atgcgctgct	540
	gctcgccctt caccttctc gtcaacacca agcgcagtg tggagattgc aaattcaatg	600
	tctgcaagag ctgctgctcc taccagaagc acgaaaaggc ctgggtctgc tgcgtctgcc	660
	agcaagcgag gcttctgagg gcccaatctc tggaatggtt ctacaataat gtgaagagcc	720
	gcttcaagcg ctttggcagt gccaaggtt tgaagaacct gtacaggaag caccggctgg	780
[0030]	agagtggcgc gtgcttcgac attctaggag gaagcctttt tgagtcaaac ctggagaatg	840
	aaggaagcat ttctggcagt gattcaacat tttataggca gtcagaagga catagtgtga	900
	tggacacctt ggctgtggcc ctacgggtgg ctgaagaggc cattgaggaa gcaatttcca	960
	aagcagaggc atatggggac agcctggaca agcaaatga ggccagttac ctgcgggacc	1020
	acaaggagga gctaactgag gaactggcca cgacaatcct gcagaagatt atacgaaaac	1080
	agaagagcaa aagtgagcag caagtggaag aagagccagg atggccacat cccagagtt	1140
	gcagcaciaa ggtggcagat gggggacct cagcatcccc tggaggctac cgtgctcccg	1200
	ctgccctctg gaggtcccag tctgccttct caatcactgg agaagaagcc ctgaagaccc	1260
	ctccagtgga ggctccatcg aggcagccaa gggaccaagg ccaacacccg agagcagagt	1320
	ctgctctgcc cagctggaag agtgtggaca ggctggatga aacaaacctg gccccagttt	1380
	tgcagagccc cgacgggaac tgggtggccc tgaaggatgg cgctccaccc cccacccgac	1440
	tactggccaa acctaagagc gggacgtttc aggccttggg ggtggcctcc agtgtggcat	1500
	ctgcctacga tgagatgggc tccgatagcg aggaagactt tgactggagt gaggccttga	1560
	gcaagctgtg tcccaggtcc cgggccctgc ccaggaaccc ccagcctcag cccacacagg	1620

	cccagagctc tgaccaaggc cccatagctg cctccccatc ctctgcactc tcccccaacc	1680
	ctgaggccat gtgctctgac tcggagacct cctccgcagg ctcttcccga gaagttgggc	1740
	accaggccag actgtcctgg ttgcagagga aggccccag gaaccttgca gctgagaaga	1800
	tgcgcttgca tggagagctg gacgtgaact tcaacccccca gttggccagc agggagacct	1860
	cggacagcag cgagccggag gaggcccccc acaccacaga ccggcgggccc aggaggtgga	1920
	gaagagcccc actgggctca gaagagccaa gcaaagaacc atcttcccc agcggcccagc	1980
	tccgggatct agacacacat caggtgtcgg atgatttatc agagacagac atcagcaatg	2040
	aggctcggga tccccagact ctcacagaca ccacagagga gaaacggaga aacaggctgt	2100
	acgagttagc aatgaaaatg agtgaaaagg agacttcttc aggggaggat caggagtctg	2160
	agcccaagac agaatctgag aaccagaagg aaagtctgtc ctctgaagac aacagccaga	2220
	gtgtccagga agagctgaag aagaagtttt ctgctgtttc tctctgcaac atctccacag	2280
	aagtcctgaa agtcatcaat gccacagagg agttgatagc aggatctaca gggccctggg	2340
	agtccccaca agtccctcct gacagacaga aggggatggt tcctcgtggg acagaccaag	2400
[0031]	tgagactgga tgagcagctg acttccctgg aagaaaatgt atacctggca gcaggcactg	2460
	tgtatggact ggagaccag ctgactgagc tagaagatgc cgcccgtgc atccacagtg	2520
	gcaactgatga gaccatctg gcggatctgg aggaccaggt ggccacggct gcagcccaag	2580
	tccacatgc tgaactccag atttcagata ttgagagccg gatttcagcc ctgaccattg	2640
	caggattaaa catagcacca tgtgtgcgct tcacaagaag acgggatcag aagcaaagga	2700
	cccaggtaca aaccatagat acatcaaggc agcaaaggag gaaactgcct gctccaccgg	2760
	tgaaagctga aaaaattgag acatcttcag tgactacat taaaacattt aaccacaact	2820
	tcattctcca aggctcctca acaaacagga ctaaggaaag gaaaggcacc accaaggatt	2880
	tgatggagcc tgctctggag tcagctgtga tgtactgaca ccatggaatt ccaactgccag	2940
	tgaccactg cctccggccg tacacgacag tgccttgacc caacagccat cgagtactgt	3000
	atgtatttcc acctgaggag aaggcctggg gaggccacag tgcaccattg cacagggctg	3060
	tcctgatacc tcatccagaa agccgtctca gacttcagca ctgcggtctt gccactctc	3120
	tgcttaggc tcccagggga atccaagaca gaaaatgaag aactggctt ccaacagcag	3180
	cgctccatgt ttaagataca tttttccct gtttgctttg ctactgtatg ttgactttaa	3240

	gatctttttt taaatacatt tgattcagct agtattccat gtcaacaatt tgtccaaagg	3300
	aaaactgctg gagggagggtg gagggaggaa ggtgggaatt attatttaac acatcattaa	3360
	tgcttattaa tctctcacia gcatctttgt cttgcaaata ctaagggaag agcaagtccc	3420
	tgcaagtgag actagggaca gtctaatttg gggattgctc aaccatcaag actgcaggtc	3480
	tcccttcagc cacctccttc ctgctaaaag cttagcctac cacactacca gtcattccca	3540
	tcgctttgca atcacaagcc acaggatgag aagttctgac tcaactcatgc catgcccagg	3600
	gctatctgaa acaatgtctc attaagaatt tagggttctt ccatgggctt actgacagtt	3660
	gcccagatct gaaggggaaa gggctttgag aaagaccatc actggctcaa ctttagggca	3720
	ctgtccagag tcaacatgat gtggtttagc agtgatcaca tctaaacaaa gtttaggtaa	3780
	atgaattatc gcagagaaaa accacatgag aaaatttttg tactccaaat ttacttccca	3840
	ataaatattc agcaaagtag taaaatgacc ttaaagataa aatgattag ggaatagcct	3900
	tagaaaattt ataggataa aaaattcaag gacaaactgt gcatttaata gacacaagaa	3960
[0032]	ttgactctaa ctccatgtct gtggtttctt tgaaccata tcaaatgtat gactatttag	4020
	agtgtttata agagataatg gaactgaact ttcaactcaat taattgggca ttaacaacct	4080
	tcttttatgt ttgttctga tatagtctga atcttaggaa gaaggtaaaa gaaaggaggc	4140
	aagagaatag ttatgatgaa tatgtgttaa gtgcctgctc tgaaggaggc aatgttcttc	4200
	tcatttgaat ctttatggca accttattca ataggttttc ccatatttca gatttaataa	4260
	ctgaaggcca gagagattaa ttgcccagg ccacaccttt atgctaatta tgattggaat	4320
	gcatcaciaa agcctaactc tgttgttttc aacctctacg ttattttgct gctatgtgca	4380
	tttccagatc tgattttctg ctaacttggt tgctatgatc cactcctgat gggggtctac	4440
	attaatcttc cagtactcct tgctgatgct gtgttatgtg tcatctaaca gaaatgactc	4500
	ctttgaaata agtaaattctt tggctttttg ttctgttggg gtgattcaaa gcaaaacaaa	4560
	caaacacaaa caaattttta gaacacaaca aaaaagattt gacttccgaa tagaatgttt	4620
	tctttaagag gcatgaaaag caactattgt tgtgttacag tgttaaaaat attcagtttt	4680
	ctttgacaaa aatgtgtact gtgtaagcct tgcaaacaaa aaacaacaaa aaagaagcag	4740
	cagcagcagc ctgctgtgtg gcatctgaac ttttataaag gtttccttgt gccaaataag	4800

	tgcaaagatt taatttacta ttaaaaacca taagcatatg ttatagttcc agaagaatta	4860
	ttttgtcatc aagtgatttt gatctttagt gtcaatattt atatttagat taattttat	4920
	aaatgaaaat attttaatgg ttaagaaaa tgaggacaac aggataatat ctttgatgac	4980
	ttctgaaagt tatgcttccc ttcattgtat atgcacattg ccaagaatta ctgtcaagag	5040
	aaatgataag taaaagtcac ttatgaaaat aaa	5073
	<210> 55	
	<211> 4857	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 55	
	aacccggcgg ttccgcagct gtgtttggga gacttggggg cgcattagcc tggacagctc	60
	cctgatcggc cttgtttcat catctgtgtt gagtaacat ggggaggaag ctggacctgt	120
	ctggtttgac tgatgatgaa acagagcatg ttcttcaggt ggttcaaaga gacttcaatc	180
	ttcgcaaaaa agaagaagaa cgactaagtg agctgaagca gaagctggat gaggaaggca	240
[0033]	gcaagtgcag catcctctcg aagcaccagc agtttgtgga gcaactgctgc atgcgctgct	300
	gctcgccctt caccttctc gtcaacacca agcgccagtg tggagattgc aaattcaatg	360
	tctgcaagag ctgctgctcc taccagaagc acgaaaaggc ctgggtctgc tgcgtctgcc	420
	agcaagcgag gcttctgagg gcccaatctc tggaatgggt ctacaataat gtgaagagcc	480
	gcttcaagcg ctttggcagt gccaagggtc tgaagaacct gtacaggaag caccggctgg	540
	agagtggcgc gtgcttcgac attctaggag gaagcctttt tgagtcaaac ctggagaatg	600
	aaggaagcat ttctggcagt gattcaacat tttataggca gtcagaagga catagtgtga	660
	tggacacctt ggctgtggcc ctacgggtgg ctgaagaggc cattgaggaa gcaatttcca	720
	aagcagaggc atatggggac agcctggaca agcaaatga ggccagttac ctgcgggacc	780
	acaaggagga gctaactgag gaactggcca cgacaatcct gcagaagatt atacgaaaac	840
	agaagagcaa aagtgagcag caagtggaag aagagccagg atggccacat ccccagagtt	900
	gcagcacaaa ggtggcagat gaggggacct cagcatcccc tggaggctac cgtgctccc	960
	ctgccctctg gaggtcccag tctgccttct caatcactgg agaagaagcc ctgaagaccc	1020
	ctccagtgga ggctccatcg aggcagccaa gggaccaagg ccaacacccg agagcagagt	1080

	ctgctctgcc cagctggaag agtgtggaca ggctggatga aacaaacctg gccccagttt	1140
	tgcagagccc cgacgggaac tgggtggccc tgaaggatgg cgctccaccc cccacccgac	1200
	tactggccaa acctaagagc gggacgtttc aggccttga ggtggcctcc agtgtggcat	1260
	ctgcctacga tgagatgggc tccgatagcg aggaagactt tgactggagt gaggccttga	1320
	gcaagctgtg tcccaggtcc cgggccctgc ccaggaacct ccagcctcag cccacacagg	1380
	cccagagctc tgaccaaggc cccatagctg cctccccatc ctctgactc tcccccaacc	1440
	ctgaggccat gtgctctgac tcggagacct cctccgcagg ctcttcccga gaagttgggc	1500
	accaggccag actgtcctgg ttgcagagga agggccccag gaacctgca gctgagaaga	1560
	tgcgcttgca tggagagctg gacgtgaact tcaacccccca gttggccagc agggagacct	1620
	cggacagcag cgagccggag gaggcccccc acaccacaga ccggcgggccc aggaggtgga	1680
	gaagagcccc actgggctca gaagagccaa gcaaagaacc atcttcccc agcggcccagc	1740
	tccgggatct agacacacat caggtgtcgg atgatttatc agagacagac atcagcaatg	1800
	aggctcggga tccccagact ctcacagaca ccacagagga gaaacggaga aacaggctgt	1860
[0034]	acgagttagc aatgaaaatg agtgaaaagg agacttcttc aggggaggat caggagtctg	1920
	agcccaagac agaatctgag aaccagaagg aaagtctgtc ctctgaagac aacagccaga	1980
	gtgtccagga agagctgaag aagaagtttt ctgctgtttc tctctgcaac atctccacag	2040
	aagtctgaa agtcatcaat gccacagagg agttgatagc aggatctaca gggccctggg	2100
	agtccccaca agtccctcct gacagacaga aggggatggt tcctcgtggg acagaccaag	2160
	tgagactgga tgagcagctg acttccctgg aagaaaatgt atacctggca gcaggcactg	2220
	tgtatggact ggagaccag ctgactgagc tagaagatgc cgcccgtgc atccacagtg	2280
	gcaactgatga gaccatctg gcggatctgg aggaccaggt ggccacggct gcagcccaag	2340
	tccacatgc tgaactccag atttcagata ttgagagccg gatttcagcc ctgaccattg	2400
	caggattaaa catagcacca tgtgtgcgct tcacaagaag acgggatcag aagcaaagga	2460
	cccaggtaca aaccatagat acatcaaggc agcaaaggag gaaactgcct gctccaccgg	2520
	tgaaagctga aaaaattgag acatcttcag tgactacat taaaacattt aaccacaact	2580
	tcattctcca aggctcctca acaaacagga ctaaggaaag gaaaggcacc accaaggatt	2640
	tgatggagcc tgctctggag tcagctgtga tgtactgaca ccatggaatt ccaactgccag	2700

	tgaccactg cctccggccg tacacgacag tgccttgacc caacagccat cgagtactgt	2760
	atgtatttcc acctgaggag aaggcctggg gaggccacag tgcaccattg cacagggctg	2820
	tcctgatacc tcatccagaa agccgtctca gacttcagca ctgcggtctt gccactctc	2880
	tgcccttaggc tcccagggga atccaagaca gaaaatgaag aacttggtt ccaacagcag	2940
	cgctccatgt ttaagataca tattttccct gtttgctttg ctactgtatg ttgactttaa	3000
	gatctttttt taaatacatt tgattcagct agtattccat gtcaacaatt tgtccaaagg	3060
	aaaactgctg gagggagggtg gagggaggaa ggtgggaatt attatttaat acatcattaa	3120
	tgcttattaa tctctcacia gcatctttgt cttgcaaadc ctaagggaaa agcaagtccc	3180
	tgcaagtgc actagggaca gtctaatttg gggattgctc aacctcaag actgcaggtc	3240
	tccttcagc cacctcctc ctgctaaaag cttagcctac cacactacca gtcattcca	3300
	tcgctttgca atcacaagcc acaggatgag aagtctgac tcaactatgc catgccagg	3360
	gctatctgaa acaatgtctc attaagaatt tagggttctt ccatgggtt actgacagtt	3420
	gcccagatct gaaggggaaa gggctttgag aaagaccatc actggctcaa ctttagggca	3480
[0035]	ctgtccagag tcaacatgat gtggtttagc agtgatcaca tctaaacaaa gtttaggtaa	3540
	atgaattatc gcagagaaaa accacatgag aaaatttttg tactccaaat ttacttcca	3600
	ataaatattc agcaaagtag taaaatgacc ttaaagataa aaatgattag ggaatagcct	3660
	tagaaaattt ataggtataa aaaattcaag gacaaactgt gcatttaatg gacacaagaa	3720
	ttgactctaa ctccatgtct gtggtttctt tgaaccata tcaaatgtat gactatttag	3780
	agtgtttata agagataatg gaactgaact tcaactcaat taattgggca ttaacaacct	3840
	tcttttatgt ttgttcctga tatagtctga atcttaggaa gaaggtaaaa gaaaggaggc	3900
	aagagaatag ttatgatgaa tatgtgttaa gtgcctgctc tgaaggaggc aatgttcttc	3960
	tcatttgaat ccttatggca acctattca ataggttttc ccatatttca gatttaataa	4020
	ctgaaggcca gagagattaa ttgccaag ccacaccttc atgctaatta tgattggaat	4080
	gcatcaciaa agcctaactc tgttgtttc aacctctacg ttattttgct gctatgtgca	4140
	ttccagatc tgattttctg ctaacttggtg tgctatgatc cactcctgat ggggtctac	4200
	attaatcttc cagtactcct tgctgatgct gtgttatgtg tcatctaaca gaaatgactc	4260

ctttgaaata agtaaacttt tggctttttg ttctgttggg gtgattcaaa gcaaaacaaa 4320  
 caaacaaaa caaatTTTaa gaacacaaca aaaaagattt gacttccgaa tagaatgttt 4380  
 tctttaagag gcatgaaaag caactattgt tgtgttacag tgTTaaaaat attcagtttt 4440  
 ctttgacaaa aatgtgtact gtgtaagcct tgcaaacaaa aaacaacaaa aaagaagcag 4500  
 cagcagcagc ctgctgtgtg gcatctgaac ttttataaag gtttccttgt gccaaataag 4560  
 tgcaaagatt taatttacta ttaaaaacca taagcatatg ttatagttcc agaagaatta 4620  
 ttttgtcatc aagtgtttt gatctttagt gtcaatattt atatttagat taatttttat 4680  
 aaatgaaaat attttaatgg ttttaaaaa tgaggacaac aggataatat ctttgatgac 4740  
 ttctgaaagt tatgcttccc ttcatgttat atgcacattg ccaagaatta ctgtcaagag 4800  
 aaatgataag taaaagtcat ttatgaaaat aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa 4857

<210> 56  
 <211> 1473  
 <212> DNA  
 <213> 智人

[0036]

<400> 56  
 cttcaacact gtggaagctt tgttctttcg ctcttttgca ataaatcttg ctactgctca 60  
 ctctttgggt ccacactgcc tttatgagct gtaacactca ccgcgaaagg tctgcagctt 120  
 cactcctgaa gccagcgagc ccacgagccc acagggagga atgaacaact ccagatgcac 180  
 cgccttaaga gctgtaacac tcacggcgaa ggtctgcagc ttactcctg agccagcgag 240  
 accaggaacc caccagaagg aagaaactcc gaacacatcc gaacatcaga aggaacaaac 300  
 tccagacggc gccaccttaa gagctgtaac actcaccgcc agggTccggg gcttcgttct 360  
 tgaagtCagt gagaccaaga accaccaat tccggacgca gtacatgat caacaggatg 420  
 ttactagcaa cttccttgga gcgatgtggg tgatatcaat aacttttctc tccattgggt 480  
 atggtgacat ggtacctaac acatactgtg gaaaaggagt ctgcttactt actggaatta 540  
 tgggtgctgg ttgcacagcc ctggTggtag ctgtagtggc aaggaaGcta gaacttacca 600  
 aagcagaaaa acacgtgcac aatttcatga tggatactca gctgactaaa agagTaaaaa 660  
 atgcagctgc caatgtactc agggaaacat ggctaattta caaaaataca aagctagtga 720  
 aaaagataga tcatgcaaaa gtaagaaaac atcaacgaaa attcctgcaa gctattcatc 780

aattaagaag tgtaaaaatg gagcagagga aactgaatga ccaagcaaac actttggtgg 840  
 acttggaaca gaccagaac atcatgtatg atatgatttc tgacttaaac gaaaggagtg 900  
 aagacttca gaagaggatt gttaccctgg aaacaaaact agagactttg attggtagca 960  
 tccacgccct ccctgggctc ataagccaga ccatcaggca gcagcagaga gatttcattg 1020  
 aggctcagat ggagagctac gacaagcacg tcacttaca tgctgagcgg tcccggtcct 1080  
 cgtccaggag gcggcggctc tcttcacag caccaccaac ttcacagag agtagctaga 1140  
 agagaataag ttaaccacaa aataagactt tttgccatca tatggtcaat attttagctt 1200  
 ttattgtaaa gccctatgg ttctaactcag cgttatccgg gttctgatgt cagaatcctg 1260  
 ggaacctgaa cactaagttt taggcaaaa tgagtgaaaa ctctttttt ttctttcaga 1320  
 tgcacagga atgcacctat tattgctata tagattgttc ctctgtaat ttactaact 1380  
 tttattcat gcacttcaaa caaactttac tactacatta tatgatatat aataaaaaaa 1440  
 gttaatttct gcacataaaa aaaaaaaaaaaa aaa 1473

[0037]

<210> 57  
 <211> 2112  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 57  
 cggcggcagc agcccatgcc tccggtgcaa cagctgcgcc tcctccggtg ccccgggcggc 60  
 gggggcggga gataacctgt ccctgctgct ccgcacctcc tcgcccggcg gcgccttccg 120  
 gaccgcacc tcctgcgccc tgtcgggctc gtcctgctgc tgctgctgct gctcgtcgcg 180  
 ccggggcagc cagctcaatg tgagcgagct gacgccgtcc agccatgcca gtgcgctccg 240  
 gcagcagtac gcgcagcagt ccgcgcagca gtcggcgtcc gcctcccagt accaccagt 300  
 ccacagcctg cagcccggcg ccagcccac gggcagcctc ggagctctgg gctccgggccc 360  
 cccgctctcg caccaccacc accaccgca cccggcgcac caccagcacc accagcccca 420  
 ggcgcgccgc gagagcaacc cttcaccga aatagccatg agcagctgca ggtacaacgg 480  
 gggcgtcatg cggccgctca gcaactgag cgcgtcccgc cggaacctgc acgagatgga 540  
 ctgagaggcg cagcccctgc agccccgc gtctgtcgga ggaggtggcg gcgcgtcctc 600  
 cccgtctgca gccgctgccg ccgcccggcg tgtttcgtcc tcagcccccg agatcgtggt 660

	gtctaagccc gagcacaaca actccaacaa cctggcgctc tatggaaccg gcggcggagg	720
	cagcactgga ggaggcggcg gcggtggcgg gagcgggcac ggacagcagca gtggcaccaa	780
	gtccagcaaa aagaaaaacc agaacatcgg ctacaagctg ggccaccggc gcgccctgtt	840
	cgaaaagcgc aagcggctca gcgactacgc gctcatcttc ggcatgttcg gcatcgtggt	900
	catggtcatc gagaccgagc tgtcgtgggg cgcctacgac aaggcgtcgc tgtattcctt	960
	agctctgaaa tgccttatca gtctctccac gatcatcctg ctcggtctga tcatcgtgta	1020
	ccacgccagg gaaatacagg taccatgatc aacaggatgt tactagcaac ttccttgagg	1080
	cgatgtgggt gatatcaata acttttctct ccattgggta tggtagcatg gtacctaaca	1140
	catactgtgg aaaaggagtc tgcttactta ctggaattat gggtagctggt tgcacagccc	1200
	tggtagtagc tgtagtggca aggaagctag aacttaccaa agcagaaaaa cacgtgcaca	1260
	atctcatgat ggatactcag ctgactaaaa gagtaaaaaa tgcagctgcc aatgtactca	1320
	gggaaacatg gctaatttac aaaaatacaa agctagttaa aaagatagat catgcaaaag	1380
	taagaaaaca tcaacgaaaa ttctgcaag ctattcatca attaagaagt gtaaaaatgg	1440
[0038]	agcagaggaa actgaatgac caagcaacaa ctttgggtgga cttggcaaag acccagaaca	1500
	tcatgtatga tatgatttct gacttaaacg aaaggagtga agacttcgag aagaggattg	1560
	ttaccctgga aacaaaacta gagactttga ttggtagcat ccacgccctc cctgggctca	1620
	taagccagac catcaggcag cagcagagag atttcattga ggctcagatg gagagctacg	1680
	acaagcacgt cacttacaat gctgagcggc cccggctctc gtccaggagg cggcggctct	1740
	cttcacagc accaccaact tcatcagaga gtagctagaa gagaataagt taaccacaaa	1800
	ataagacttt ttgccatcat atggtcaata ttttagcttt tattgtaaag cccctatggt	1860
	tctaatacagc gttatccggg ttctgatgtc agaatcctgg gaacctgaac actaagtttt	1920
	aggccaaaat gagtgaaaac tctttttttt tctttcagat gcacaggga tgcacctatt	1980
	attgctatat agattgttcc tcctgtaatt tcaactaactt tttattcatg cacttcaaac	2040
	aaactttact actacattat atgatata ataaaaaaag ttaatttctg cacataaaaa	2100
	aaaaaaaaaa aa	2112
	<210> 58	
	<211> 36151	

	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 58	
	caagctgact tctcaagctc tggggatgcc tcagtgatct ctgatgtgga attagtggag	60
	gctggccggt gctcacctct acacagcctg ctggtcgtta gcgagcagga gttctgatgt	120
	tcctctcatc ttggatggta agaaatttat gaaaatgcta agtcctgagg attaatagag	180
	gaaatgagga ctaaataatac aaaatagtcc agaaggtggc aggtggaaca cagcaataat	240
	atatgatgtt agtcatcagt cattagtgcc acagggatcc taggcgatgg ctgggaaatg	300
	gcttttgcag gctgagatgg tggtagcgtc tcaccctcta aggcaagtgc ctatgattca	360
	atgggtgaac tcaactgccac cccagcaggg tggggttggg gttggcttgg tgagaaggga	420
	gatgtcatct tgcccaagga ggcttatccc ttgtgaaagt ctggaacaac acacaaaaca	480
	ccaggaggaa ctgtttcggg gtgctgtctt gaatgcaagc aggcagcctc catttagatc	540
	tcaactgattc ttctaggata ttacaaagca ctttcttacc ccaaactcctt cagtgccacc	600
	ctgccactaa atacaaagaa gaagctctgc ttcccaccgt gcagaggagc cacagggatt	660
[0039]	gcatggtccc catgactgcc tctttggccc agggaaaggg cccaatcaga cagcacccca	720
	gatcttaaga gaagaacttc cagtcaaac aacagggcac ccccgtgtgc tggaagggtcc	780
	aactctctcc agtcccaaga gtgttaagca tctggctaag gctttgctaa atttcccata	840
	agagctgcat tgttttcttc tgtctgttag acctaggaag ttttctgggt gtggacgtag	900
	ggcttttgca agtttcaaag cttccagggg attagaaacc atcattcca agcatttaca	960
	agaaaatctt ttgtccccac tgcttgatat cgaaaaaca gggtcactct tcttttccc	1020
	taaggaggga aatgggaaca ccccgtgac catctccttc tgcctcaggc actttcatgg	1080
	agacagtcga gggctttggg gcctgtccta cctgggtggc tactcagtag agccatcggg	1140
	ctgaaaagga gacatctgtt aaggtaactg gtgatcccat gtaaaagctt tgactaaacc	1200
	acaggagctg gaaccacttt ctcagtaaag catgccagga agcacaata aagtcatgtg	1260
	ctgcataagg acgttttggg caatgaggga ctgcataaat gatggaggtc ccataaaatt	1320
	ataatatcat atttttactg tcccttttct atgttttagat aaacaaatat taccattgca	1380
	ttacaactgc tcacagtatt tcagcaggaa agggcccttc gggaggggct ccagcttgcc	1440
	tctccaggtc taggtcttat cgttcttccc cttgaagttg accctacaac cttattaaat	1500

	cttctgcagt taccaaaagt gataatgtgc ttggcctttg tttaaagctgt gctctctgcc	1560
	ttgagctgtc ctcccttcct ctgctcaagt gccccatttt tcatgtccct tgggaacaag	1620
	ctcaggtgtc atcactgaat tcaggtagat gcccctctta tctgtcccca gagcatgctg	1680
	cacttatccc catcacagca cttctcatgc tctgttataa tttccttcct attccattag	1740
	catatgagga accaagggcc atgtgtcatt catcctagta catgttactt agtggagttg	1800
	cataaatact tatggaatga ataaattgac taagaggtga gctgggctca gcttgtggat	1860
	gatcctgaaa gatagattgg cagactctta ccttttttgg gagtgtgcaa ccggaaactg	1920
	tttattgtgt ttttgaggtg ggagataatt tattgggact gtcctttggc atgatagctc	1980
	tagaatgagt gctaaggttg aatgggatgg aagagagagc cagttagtaa gccattgcag	2040
	gggtgcaggtg agacagaata aactgaagt aaataggagt aatgcgggaa cattcaaaat	2100
	agggtcagta agaagtgatc acaaataacg caaggagagc ggaggaatca agggtgatgt	2160
	ggaggtttcc agcgtctact gaagtgagtg aatgaggatg cctctttccc actagaggaa	2220
	gataggtatg ggggtggcca cagctgcccc gttgcatgga taggaactcc ttgacttacc	2280
[0040]	ttttattaga agatgggtaa tgatgactcc atcactgtaa ctgcaatcta ttctgggtga	2340
	agagtgccca tacggtaaat gttttaaaat attctgaata ttgccctgg tcccaaggga	2400
	tgaaggcatt gtggaggagt tttcccttaa gcatagttga aataggagaa aaaaaaaga	2460
	aaaggaaaa tcagaagtta tgtcttagaa ggggtttgat gtggattggt ttaccagggt	2520
	tgctgtaacg aagcagcatg gcctgggtgg cttgaacaac agaggtttat tttctcacag	2580
	ttctggaggc tagaagtctg agatcaggct gtcagtgggt ttgcatcctc ctcaggcctc	2640
	tctccgggca tgtaggtggc tgtcatctcc ctgctcctc acagggtctt tcctgtgtgg	2700
	gtgtctgtgt cctcatctct tcttctaagg acacaagttt gtttttggat tgggatccac	2760
	cctaattact tcacttaact ttaatcacct ctttaaagac ctacctcaa atagggtcac	2820
	gggtgtgagat actgggaagt taggacttca atatatgcat tttgggtggca ggaggcgcac	2880
	aattcagccc gcaacatgag gcatgagcaa aaatataaat ttaaacaatg ttggcaaaaa	2940
	cagattcaaa agcaaaatgc aacgcaaaag catgaggaaa gggagaagt tttggatagt	3000
	aggcatggat gaggtggtcc cgaggagag aagaggctgg ggcaccacgc ggaggggttt	3060

	ggtagaccct gagtggtttc tctcattgta gagggtcagg aacaatttga acacagaaca	3120
	actgaagagc caggcttgat ggctctgtta aggaaaagac acttttagga cgtgcagttg	3180
	gaccttttca agaagctggt ggaggtcagg gtctgagttg agaaaggagc ttggctctgt	3240
	aagtcacga cactcagttg cttctggatc ccatcctcac cccctgcacc gcggggctct	3300
	tctcagggaa cgggccactt cccgatgctc cctgggctgc catcagctgc catgaacact	3360
	ctgcttagtg gaggctccgt ggccctgtgaa ttagcatcaa cctgaaataa caagcagggg	3420
	cttcctatga gtcagccata gtctgttcag agatgctgcc taaagggtct aaatccaaag	3480
	gcattaatta atttgttccc agggctccaca gcatggggag ctcaagccct tccatttccg	3540
	ctcattgata ccggctgggt aatattatgt gggttccatt tttaatgtag aatgccttat	3600
	ttgacaaaca tccagacagc accccaact ttgttttctt gagcagaaga gagaaaacaa	3660
	gagatgaagg cattgatgca tcagccctgc agaaaaatgg caaaggttac aatatgttat	3720
	atthagatcc gcaatttgcc gaaggaagat aattgggaaa ttaagttgcc tggttgggaa	3780
	atcagccgtc cttttgtttt tgtccggtt tgtagtctca taaatgttca gggcttcaat	3840
[0041]	accttaggc acttataatt aattttttaa aaattggaag attcagtata taagctgcct	3900
	gatttaatga aataagtcaa aaggagaaaa aagaaggag tttcttgag taattggtg	3960
	ttacatthtt ccacattgcc attctaattc attcctttga aaagagttcg tttttagat	4020
	tctataagta cccatggcaa taagtgtat ttataataaa gagacataat gagtctcagc	4080
	tgcaccagg gaggttcag caggtcagga gcctctctgt ctgctccatt gttgctggga	4140
	gagaggtct tgttccaagg gttgggtggg aaacaggaat tccccacact gtccctgaaa	4200
	ttgtggagt atgaactagg gagggagtc ttaactggaa tttttcaata ttagattttc	4260
	cagagacttc attcagccca ctcttcagta gggaaataaa tcctttatgt agaaaaaaaa	4320
	tcaaaccatt tccttttgaa taagtaatc tctgaatctg aggaaccccg agataagatg	4380
	atgtattagc ctgctcaggc tgtcataaca atgtaccgca gactgggtgg cttcaacgtc	4440
	ggagatttat ttccttgag ttccggaggc cgggagttct agaatacatc aaggcatcca	4500
	cagggttggt gtcttctgag tcctctctcc cgggcatgca ggggctgtc atctccctgt	4560
	gtcctcatc ggtcttcacc ctgtgtatgt gtgccttact ctttgcttaa aaggacatca	4620
	gtcatattgg gttagggtag agcctcatt taccttact accatthtaa atacctatc	4680

	tccaaacaca gtcacattct gaggtactgg ctctgcatat aaatttgggg ggacacattt	4740
	cagctcataa tagatgtgca tcttattttt gaaaataaaa ttacagaggt ctttcctctt	4800
	attccctttt cctctttcac cattcctgcc tttcctgtat tagctgagac agtaattcat	4860
	attgtcagag cacacactgt ctctctctct cacacacaaa cacacatacc tccacacact	4920
	ttatctttcc tgcctccaaa ttattttctt gttattggaa gcaaaaatgc atttttcctt	4980
	cataggcacc ttcttaccba gtcctcaatg ggtgctgtga tcaaaggagg ccaccacagc	5040
	tctattagct catgcccbaa taaagccaaa tctcacacct tccacaagtg acctgtgttg	5100
	ctcccttctt gaggttgttt cacagagaag agaccbaagg ttaggctggc tgttggcctc	5160
	catcagtgat agtgatggct gggtcacagg ttgctgaagg agtcaaggga ctattcaat	5220
	actggatgct tctgttcctc tttcctctgg ggctggacta attaaagaaa aatgtttcct	5280
	ggctgttcag gtttcctcca tgctaattca ggcctattct tgcagatgca tacagttatg	5340
	acttcattat gcttgttggg atggaaatag aggtaagatc aggtgcccag tggctgaaa	5400
	aatgttgaca tgcatttttg agcctgtcca cagttgtcgt taaagccttg tcagacttcc	5460
[0042]	ctgggaggac atttagagtg agaaaaaaga gaacctagga aaaattcctg ggaaacatca	5520
	gcatttcag ttcagctgca tgcttgca ga tgcgaaaaag tcagggaagt ggaagccagg	5580
	aagggtgagag gaaaaccggg atgggaggag ctgtggagat caagggtggg gcaagagttt	5640
	catcggggag gggcagcagt ctgcagtggc cagggttggt gatacatgaa gcatatgatt	5700
	cctgactaag tgaggatttc tggagtgcgt catctaattt tctctgaact cattttgcaa	5760
	gaatttccta gggattccat tggggcgggc gaggttcccc ttgatgcttt catgtagtag	5820
	ttggctcaga gggaaatggtg gaggtaggag gcatatagct cctcttcaag tgccacttca	5880
	aatccactag gtgttatctc tcattttggc tactgagcta catgttgtgc cccggttcca	5940
	gcaccttcca gcagggtgtaa ctgacaatac tcaccccagg ctcacacaca tagcctttgc	6000
	tttgtgctgc tgtcttctcc attggtatgg catggagcat ggccattagc acctgctcag	6060
	tgctcatgag tgcaccagag ttatttcctt gtgggcagct tgtgaccaga gtaggtcaga	6120
	agctaattgga gaaatgcttc ctctttcct cctctgggaa aaaggctctgc agaattgagc	6180
	aactggttgc ctgtggtgat ggccaaattt ctgaacacat cattagaatg ttaggggtgac	6240

	tctctcctcc tctgctttgc tttctctcac ccttggtcca tggaccaccc tccctactga	6300
	agtacttgca actcaacttt gggggaaact gtggataaga gaattagtct gggaagagtt	6360
	ggattactta aaagtcaaag aggaatacgg accccattgc tggtgataag aggagtgggtg	6420
	ataatccttg gtatgcaaca gcttcctggt actatggctc ttgcctgtgg tagagtgatg	6480
	tgtggcacag gtggaaggta atgcattaac ttaggtcagc agctggcaag ccatcgtccg	6540
	tcgcctattt ttgtatggcc tgtgagtata aatggcttt tgcatTTTTA gaggattgga	6600
	accacacaca cacacacaca catacacaca cacacacaca cacacacaga atatgcaaca	6660
	gagactgtgt gtagcctaca aagcctaaaa tttttctgt cttccattta ctgacgaagt	6720
	ttgctgaact ctgggtgaag tgatagggtta ccatgtgaac aatgagaaca tgaagaatgg	6780
	ccatggcagc tgacagctaa cggctagata gtactagtga acatgagtaa cactcacaga	6840
	atataagcaa taattagaca aggccactgt gtcaccacca tggaaacaaga cagacaagac	6900
	cacttcatga ctgtgagtga aacaagatag agacaaggac accctgcaac tccccctcca	6960
	aataacttaa catgccactc ttctaacaag aataagagac tatcacttcg tgctgattgc	7020
[0043]	aactctatct gtgattcaat cctcctgcct cctaattaaa aattaccaag gaaccaaTc	7080
	actgaattgt tcacataccc taacagcatt cagtctagaa ctgtctttgt ttcttcaac	7140
	tctccctcca atcacctggc acaaggTcaa attctacaaa aatcctatct taattcctag	7200
	tttccaagac atcccacagc cctacagaaa taaagaccac ccaactgaga acaaggatgg	7260
	tgattttattc ggagcttgct gtagtgaaaag agtcggccac catcactgggt gtttggcaga	7320
	gactcaaagg caggcagagg ggtgggagag ctttacagtg ggcaaaaaag acgtcttcag	7380
	gtgtgcccc aattggaggct gttggcctag agaagctgga ggtggccaag taggagcagg	7440
	gcaggctatg tgattggttg gggacatatt tgaccttctc tggtttgtcc tgaattggaa	7500
	gtggggacaa aaatcaagaa atatgtcagc tattaatcat gtgctggTca ttttgggctg	7560
	attgctacag aagttgtggc tcagagtctt attgccacct ctggtccagc cactggccat	7620
	gggtgtgttc agttttcagt tctctggaat gccttctttt ctctgcagta agctcaatga	7680
	acttgggaagc agattctccc ccacagcctc tagggaagag cccagctatg tcaatgctga	7740
	tttgggcctg tgagacccta agctgagaac acagttaagg cccccagac ttctgatctc	7800
	cagagttaga aataaatgag cactctttca agctgctgag tttatgctaa tttgtttgac	7860

	aacaggtgat tcctgagggt cactgggttac tggacttggga aaactgtgtg agtgcaagca	7920
	taattattag gatcacagtg tatgctgggt tttgttaact gcattgacag ccttaaagaa	7980
	aatggtaccc tcagatcagc caactgtcaa ctcaaggtgt gctgtgaaag ctggaggcct	8040
	gtagaaagag tttaaagaac catgacctcc tttagccaga ggaagactag atatctacaa	8100
	agacctcact tgaggctgat cttcctcac aagatgggtgt tcatcctcct gagggctttt	8160
	gctgtgaccc cttaccatct ccagaccaat gaccaggatc aggcctcata gccctgcctg	8220
	ccctgaaaac atagggataa aacagatccc agtggttatt tagcaaatgt tctgcatcct	8280
	ctatgtctgc atcagttact acctcaaac agctggcatt ttgccttttt tccccacta	8340
	atttaaagcg cattctgaga gcaggggtca gcacactctt tctttaaggg tcagattgta	8400
	aatatthttca tttctgcaaa ccatttggtc tttgtttgta tcctccactt tgccactagt	8460
	agacatagat aatacacaag cgaatgggca tggcttttgt tccaatataa cttggtttac	8520
	aaaaacagaa acaggccaga tttggcccac aggctatagt gttccagctt cagtcttgg	8580
[0044]	aaatcattta atctctctgg gtttcatttc tacacctgta aaattagagt attgttctaa	8640
	gacaatgcct ctcacactcc agctagcgtt agaatcatgt ggagagctac tgaaagcaca	8700
	gattcttga cttactccc agtgattcca gttgaatagg tctggagtgg gatctgcatt	8760
	tttaacatgc tcccaggtaa aactagtgcc gctgggtccag ggaccatgct ttgagtagca	8820
	gaagtcttgg gcagtacttc tcatccctgg cttcagagga gactcgtgct gagaactttt	8880
	aaaaagatac tgatccctct gttccaccta agaccaatta aattacaagc agaatccagg	8940
	cttctgagca ttttaaaatt tcccccaagg gatcatgtac aatcagggtt gagatccact	9000
	ggtggagggt agctccacag ccctgccctc caagtatgat tcttgatgag tggccttggc	9060
	atcagcacia cgtaggaact tcccagtaac acacagtctc gggctccacc ttgacctact	9120
	gaatcagaat ccacattata acaagatccc ttggtgatgc atgaacacat taaagttggg	9180
	gaaatgggggt tctacaggaa ggaatggatg aatathttca caggttctc ttctcctact	9240
	acacaccagg cactgggtgg gctatactta agtcacttaa acttgctgt gtaggttttc	9300
	tactgctgtc ctgacagatt aacataaact tagtaactta aagcaacact catttatttt	9360
	ctcacagttc tgtggattgg cagtctgggg aggctcaagt gggttctctg ctcaggatct	9420

	cacaggccca gagcagggtg ttgctgtggt aggttcttaa ctcaggcttg gggaaggaat	9480
	ccacttctaa gctcaattac gtttttggca gaatcaagct tcttgacagtt gtaggactga	9540
	ggttgctggt ttcttgtgag ctgttggcca ggggttgccct tctgcttcta gatgtctctt	9600
	tgagttcctt ttaactttta cattatgttc aaagatagca accattcatc atatcctcct	9660
	catgcttcca acctctctga ctctccttc cgctactagc tagtgaaaac ttgcttttaa	9720
	agagctcgtg tgattatatt aaactcacct ccataatcgc caattttact aattcaaggt	9780
	tgatggatta gtaaccttaa taacatctgt aaaattcctt tttccataaa tgtgttatct	9840
	cgtatattcc cagtcaactgg cattagggct gaaggtcttg ggggacattt aagaattctg	9900
	tctacctcaa tgtaccatgc cacttacacg tcagtcttag agtcagattt tgaatctagg	9960
	tgtgtctgat cctaaggctt atatgaacat tattttacca atttgtttct ctgtggtaag	10020
	aacaaaggtg ttctttgttc agagaaattt atagttatca aagagctttc acatttattt	10080
	tattgtttgg tctcataaaa gacctttatt aggtattatt attcttttta tgggggattg	10140
	agaatgttta attatttggt caagggccta taagcagaat atagaaaatt caggactgaa	10200
[0045]	gaatgggtct cctgattcca aatttcatac ttttcctttt atattaccac aattttataa	10260
	tttcttattt agatcattct tgttgtctaa ttagaaaaca aatttaccag gatagaataa	10320
	aagaaactag cagagtagtt gtagatagga tgcaaatgtc tgaatcctgc agtgggacct	10380
	gcacagaaaa atagaccac ctgttacgct aattgaagga aaaactctgc tgaattcag	10440
	agaagtactc cattcaggtc ttaaaaatta ttgttcttaa agaagacagt cattcaattt	10500
	ttaaatgtaa ttagaaaac aaccaattca caaaacaaac actttttact gaattacaag	10560
	tcaatcatga ccttactttg gagaaatgac aggaaatatt ggcaaatcat gtggatgcaa	10620
	ctcacatttg tgataagaaa gttagcctgc tcccatggat gaagcttaag gagaatcata	10680
	aaaccatcct ctttctagtg actatctttc agttcattct ctttttgttt caaaagcaaa	10740
	gaaaccaatg tgacctgaat gaactataat tacaagcta agattctttc agagggcagg	10800
	atgatatcta ctggttgggg ttttcttggc atggccaact aggattctgg tatatagggc	10860
	atgtctctca tgagtccctt aataatgtaa tcattttttc ttctccatat ggtgcaaaag	10920
	tcatatctag tgagaaagta tccttacatt gccagtttag aagttatttt atgcttaaaa	10980
	aatggcccag tcagttgttc aaataaaaaa cagctggaaa ttcaatatct tgggctgttt	11040

	ccttgatc	atttatagat	gtaaggggtt	tcattacaat	ctgagaggca	gtctatgatt	11100
	taaacaaatt	atcaaaaaaa	ttaggccttg	gtcagctcaa	ttttattaaa	agccttcaga	11160
	tcttaaagga	tcaatgacta	caagagaaaag	gttaaccccc	agggtcctg	gttggtgaac	11220
	aaacacatca	aagtgaaatc	agagttaaaa	gctattgttc	ccttggctaa	cttttgcctc	11280
	tgtcatattc	agttgatttg	aagagatgag	gaatgataaa	caggaccagg	ttacaaacat	11340
	agaactgtta	cattttgttc	atntagccag	gagctttatt	cttttgtttt	tcattgagatg	11400
	ggtcatttta	atagtcaacg	gtgttgacga	cagtcacat	tcaatctgtc	atcttaata	11460
	cagtctttcc	taggagaata	tttctcacgt	gtttgacaga	aaacattatc	tgtccatcat	11520
	ttccatggat	tcctgggtct	cacgggcaga	aggacaaggc	agatatgagg	cggatctggt	11580
	aaagtaagtc	attgtgtact	ctttgtattt	gtttgaagat	atctggtctt	tttcagtcatt	11640
	atatgtgatg	gagaaccagt	tgtagaaca	atgtgtatat	tgatggagaa	acaggtgggc	11700
	cagagtggtc	ggtagtctgt	gtgacaaaca	gtgatgccac	tttactatc	tgaaaatgaa	11760
	tgaatatatt	catagtagtg	ggcatgcaaa	ggtaataaag	acctgacccc	caacatcaat	11820
[0046]	aatataataa	tgatgaattc	atattctaaa	tctgatcatt	taaggaaggc	catccatc	11880
	tccatcacia	tcacttaaac	aatgcaaaa	atggatattc	tttctagaat	atctctgatg	11940
	aaattgcttc	tgaaggctgc	aaattagtgc	tcaagaccct	gttgaaaagc	agtttctctg	12000
	attcacttat	gaagtcaaat	gcagaaatta	tattttattg	gattttattt	atagcagaga	12060
	gaataactta	aaaactgaca	tagcattctt	ttcaaatctg	aaactcaatg	ctgatttttg	12120
	gaagattcat	atcagctcta	ctcttataaa	tcagaaaaca	aaaacaaaac	aaacaaacaa	12180
	aaaacaacia	caaaaaaaga	aaaacaggcc	cagacaccag	cagtgaacca	gtcaaccact	12240
	ggccagtcaa	tatgagagcc	agctggttct	tctagtga	ccttcacctt	tctaatcaga	12300
	gggtttcagg	ttttgctctc	tattgagtca	attgcttgag	ggtagaaaaa	gaaaatcttc	12360
	gaattgcatt	acataccact	cctttccctt	tctatagatt	tccccctctc	tcctttccag	12420
	gaatattgat	tttcttcctt	gggtttctga	aaaagctttt	ctcccaggc	atctttattt	12480
	ggtttgctga	ccaagcatt	attcacactt	ctcctgcggc	cacccaatg	ccacaccgc	12540
	tgcaaggtgc	tcccgtctc	ctacctctga	acaacagtgg	tctgaatctc	tgacttgagc	12600

	cgtgcagccc ttgaaagaa aagtcattta ggagctcagc cctctgagga tgtaaagccc	12660
	gtcgcagggtg cttgttttgt ctgtctccgt gtgtggaaga tgccttctgt gaggtcctgc	12720
	gcctctccgt aagcagctga gtagttcctt gggctgacaa aatactttgt tgtggctcca	12780
	ttacacacc agggaacct ctttagctgg attttgcaga ccgggaaatg ggctctgagg	12840
	ggaagtcacg cctcatctca aggtttactg aggagccacg aggaggcccc accgctgcca	12900
	cagctaactc atggcctccg gccaggaagt ctggagattt taagaccata atgtcagcca	12960
	gggtgacctc tggaacctgt tcacccttc acccgttggt aacaagagag ctgaatagcc	13020
	actatcacag ataataacaa cagctgacat tattaatagg atgccttaca ggctgtaaaa	13080
	tactttcaca aacaggatct catttgatcc tcataatctc aacatgaggt gcgtaaagca	13140
	agcaattatt actaatctcc ttttacagaa gagaaaagga agtcctgaga gatgaatcca	13200
	cttctgggag gtctgacaac gttcagcttt acctaagcca tggctcaggaa acttttctgc	13260
	gttccaggaa atggccggcc acaacgactg gcccttcct ataaaaactt acaaaacct	13320
	cacaggtgac ctctttgttt acctatgaca gaaccagaca cagtgccaga tcctccaaac	13380
[0047]	tcccattctt tgccttatat gtaatcagtt gaactgtttg tatctactga ctaatctaga	13440
	caaggtactt gctaacttga cctgtttaaa agttcgaaat gccaaacttt ctttctttt	13500
	ttttttttt ccatcccacc ccaccagat ggagtttcac tcttgtcacc caggctggag	13560
	tgagtgcagt ggtgcatct gggctcagtg caacctctgc ctcccgggtt caagcaattc	13620
	tcctgcctca gcctctagaa tagctgggat tacaggcatg tgccaccaca cccggcta	13680
	tttgtttgt tagtagagac agggtttcat catgttggcc aggcttgta caaactcctg	13740
	acctgagggt atctgctgcc tcagcctccc acagtgctgg gattacaagt gtgagccaca	13800
	gtgcctggcc cgaaatgcta aactttcatc aagatattgc aatagtctt tctaagaaag	13860
	ctcttcctta cttaacttgt gcctggcccc aaatgctaaa ctttcatcaa atattgcaat	13920
	agtcttttct aagaaagctc ttccttactt aacttgggat ttgttttatc tgacacaggg	13980
	cacagggtaa agatcagagg tggcttctg tcaactatcc agccagccac ccagctatgg	14040
	ttaccacag ggctgatag ccatccctgc cagcggtcag ggttgattg tggccccac	14100
	tccaggcctt gcttattgca ggcttggtc ccatggctgc tctctgtgtt cttgcaacct	14160
	tgcatcctgc cagaatctct ggaagaaagc tctttggcga gaaatgaaga acaatcccaa	14220

	agggtgctcca ggaaagttca ttattingtg tactctgggtg tcttacctta atcagagaac	14280
	agttgtctgt gatcctcaaa gagggaaatta aaggaggaa tggaaccaga attcagtgac	14340
	aactggaatg agtgactgag gtgtagcgtc aatcatcaag gtttattaaa ctacttaggg	14400
	tgcgtctgga aaaaacatga gccacaaata catctgggggt tgtttttcca aagaggtttt	14460
	tgggagattt agtatttata catttcctta gagggaaaag gcatgtggaa agagggggcag	14520
	gtaggcagtt ggcaaatact acattttaca taagataagg caaatgaaga gagaaagaga	14580
	gtaaaggaat agtccatttt acttatgtct ttgttctgca cctgggagga agttcttcat	14640
	gacatcagtg tggaatcaac aaacttagt tttaggagct aggcttagtt tgtagaccta	14700
	cagttataac tgggtggttct gttgatggga tgccagtgaa gaatgtactt aggaatgatc	14760
	tgtagaggact gtcctttcct gatgcctgag tcctttttct tgggggtgagc ggggggtaca	14820
	aaataggagc atatatttat ggagtacatg agatgttttg atacgggcat gcaatgtgta	14880
	ataatcatgt catggacaat gaggtatcca tcccctcaag catttatcct ttcttttatg	14940
[0048]	aacaatctga ttacactttt ttacttattt taaaatgaac aattaagtta ttattgacta	15000
	taatcacctt attgccaatg tttgtcattc tgtgcctggc ttatttcact tgatagaatg	15060
	ttcaccagtt ccatccatgt tgctgcaaat gtcaggatct cattctcttt taagactgaa	15120
	tagtgctcca ttgtgtatat gtagcacatt ttctttatcc attcatgtgt tgatggacac	15180
	aggttgcttc caaatcttag ctatttgtaa cagggtgca acaaacatga gagtgcagaa	15240
	atctcttgca tatactgatt tcctttgttt tgggtgtata cccaacagtg ggattgctgg	15300
	accatatggt agctctattt ttagttttt gaggaacttt caaactgttc tccattgtgg	15360
	ttgtactaat ttatattcca actaacagtg taggagtgtt ccctttcctc cacatcctcg	15420
	ccagcatttg ttactgcctg tcttttgat ataagccatt ttaactgggg tgagatgata	15480
	tctcatggta gttttgtttt gcatttctct gatgatcaat gatgttgagc actttttgt	15540
	atgcctgttt gccatttgca tgtcttcttc tgagaaacct ctattcaaat cttatgtcca	15600
	gttttttgat cagattatta gacttttcc tatagagttg tttgagttct ttatatatgg	15660
	cgcttataaa tcccttgca gatcggtagt ttgcaaata tttctccat tatgtaggtt	15720
	gcctcctcac tttgttgatt gtttcctttg ctgtgcagaa ggtttttacc ttaatgtaat	15780

	cccatttgtc cacttctgct ttggttgcct tgcttgctgg gtattactca agaaatTTTT	15840
	acccaaacca atgtcctgga gagtttttc tatgttttct tgtagtaatt tcatagtttg	15900
	aggctttaga ttttaagtctt taattcattt tgatttaatt tttgtatatg accagagata	15960
	ggggtctagt tttttcctgc atatgaatat ccagtttccc cagaaccatt tattgaagaa	16020
	actgtctttt cccagtgta tgttcttggc acctttattg aaaattcaca tattgtaggt	16080
	gtgtggattt atttctgtgt tttctattct gtttcattgg tctatgtgtc tgttttaatg	16140
	ccagtacat gctatTTTgg ttactatggg tctgcagtat aatttgaagt caggtaatgt	16200
	gattcttcca gttttgttct atttgcttag gacagctttg gctattctgg gtgttttTgTg	16260
	gttccacata aatttttagga ttgttttttc tatttctcta aagaagtTca gtggTatttt	16320
	gacaggtatt gcattgaatc tgtagattga tttgggtagt atggacagtt taataatatt	16380
	gattcttcca atttatgaac atggaatatc tttccgtttt tttgggtTtg tcttcagttt	16440
	ctttcatcag tgttttTgtg tttcattata gagatctgtt gcttcttttag gttaatcct	16500
	aggTttttTaa ttttactttt ggcttttTga aatgggattt acaaaaatTTt ctttttcagg	16560
[0049]	ttgttTcactg ttggTataca ggaatgctaa tgatttctgt acgttTgattt tatatcctgc	16620
	aactttacta aatttTgttTta tcagttttTaa tagttttttg gtggagTctt taggtttttc	16680
	caaatataag atcatatcat ttgcaaaaca ggagaatTtc acttctttct ttccaattTg	16740
	gatgccattt atttctttct tctgattgct ttagcttagga attccagtag tatgttggat	16800
	aatactagtg aaagtgggca tccttTgcat ggtcatgttc catatcttag aaaaaagctt	16860
	tcagtttttc cccattcaat atgatacaag ctgtgggtct gtcatatatg gcttttatta	16920
	tgttgaggTg tgtttcttct acaccagtt tttttagggt ttcttatcat gaaatgatgt	16980
	tgaatTTtat tgaatgcttt tttggcatca attcaaaaga tccttatatc ctttattctg	17040
	ttttatcctt tatcctttat tctgttgaca tgatgtatca tgttgattaa tatacatatg	17100
	ttgaaaaatt cttgcctccc agggataaat cccacttgggT tatgatgaat gatctttcta	17160
	atgtgttTgtt gaattcagtt tgctagtatt ttgttgagga cttaaaggcc agagattttg	17220
	gcctgtggTt tttttttttt gagtTcttt gtctggTttt gcattataga atgaattTgG	17280
	aagtattcac ttctcctcta tttttcaaaa tggTttTgagT aggattagta ttagttcttc	17340
	cttaaagTtt tggtagaatt cagcagTaaa gccattgggT cctgggcttt tctttactga	17400

	gagaatTTTT atttgatctc attacttggt attggTTTTg ttaggtTTTTg aatttcttac	17460
	tggcacaagc ttggtaggtt ttatgtgtct agaaatttgt ccatttcttg gagaaattcc	17520
	aatttattgg cctatagttg cttatagtag ccactaatga tcctttgaat ttttgcagta	17580
	tcagttgtga agtctcctat ttcatttctg attttatggt tttgtacctc tattttttaa	17640
	attagtttga ctaaaagggt tgtcaattgt gtttaactat aaaaagaacc tttttgtttt	17700
	attgatcctt tttattattt tttttcattt caatttcact tatttctgct ctgatcttta	17760
	ttacttttct tttactaatt ttgagtttgg tgtgctcttg tttttctatt tctttaagat	17820
	gcatcattag atcacttatt tgaaggattt cccctttttt gatgtaagca tttgtagata	17880
	taaacttcat cttagtactg cttttgctgt atcccatagg ttttggatg ttgtttccat	17940
	taacatctgt ttcaagacat ttttcaattt ccctcttaat ttctccattg atccactagt	18000
	cattcaggag catattgctt aatttccatg tgtttgtgta cttcccaaaa ttctcatgt	18060
	tattgatttc tagttttatt ccattgtggg cagagaagat gcttggattt attttaattt	18120
	tttgaatggt ttaagatttg tttttcacct aatgtatggg ctacgcttga gaatgatcct	18180
[0050]	tgcactgagg aaaagaatgt atattctgca gccattggat gaaatgttct ataaatatct	18240
	attagatcca tttggcctat agtgaagatt aagtcggatg attcttgggt gattttctgt	18300
	ctaaaagatc tgtccaatgc tgaaagtggg gtgttgaagt ctccagctat tctcgatta	18360
	gagtctatct ttctctttag ctctgacatt tgccttatac atctggatgc tccagtgtg	18420
	gggacatata tatctaaaat tgttattcat atattatctt gctgaattgg ccctttaatc	18480
	attatatagt gaccttgttt gtcatttctt atagattttg tctcaaaaat ctattttgtc	18540
	tgaaaatata gtgactcctg cttatatcag acaaatttga tatttttcca tccctttatt	18600
	ttcagtctgt gtgtgtcttt ataggtgggt tgtttcctat aggcaagata tcagcaggtc	18660
	ttgctttttt cattcattta gccaggctat gccttttaat ttgggagttt agtccattta	18720
	tattcaatgt tattattgat aagtaaagac ttctcctgc cattttgtta ttgttttctg	18780
	gttgttttgt ggtcttctct tccttctctc tttttcttcc tgtattcaat taactgaagg	18840
	tgattttctc tggatgatg attagtttc ttgcttttcc ttttttgtgt atccattgta	18900
	tgttttttgg tttgaagtta ccatgaggcc tgcaaatact agcttataac ccgtgattgt	18960

	aacccaatag caacttaacc actgtttgca taaataaaca agcaaaaaga taactaataa	19020
	acactctaca catttttttt tttttttgag acagtgtcct tgctctgttg cccaggctgg	19080
	agtgacagtgg tgcaatctca gctcacggct ctttctgcct ccatattcaa gtgattctca	19140
	tacttcagtc tcccaagtag tggagattat agtcatgtgc cagcatgccc agctgatttt	19200
	tgtgttttta gtagagatgg ggtttcacca tattggccag tctggctctg aactcctgac	19260
	ctcaagtgat ccgctgcct cagcctcca aagtgtggg tttataggca taagccacaa	19320
	tacctggcca acattctaca tcttaacttc atccccccac tttttaacgt tttgttttat	19380
	ctatttcat tttcttatac tgtctatgtc ttgaaaagt gttctagtta ctatttttga	19440
	ctggttcatc atttagtctt tctacttaga ataaaagtag tttacacacc acagttacag	19500
	tgttgtaata gtctgtgttt gtatacttac cattaacagt gagttttgta tcttcagggtg	19560
	attacttatt gttcattaac acccttttct ttctgattga agtactccct ttagcatttc	19620
	ttgtaggaca ggtctagtgt tgatgaaatc ctcagctttt gtttgtctgg gaaagtcttt	19680
	atcttctttt catgtttgag gggatatttt tgccagatat actgttctgg ggtgtacatt	19740
[0051]	ttcttctttc agcactttaa atatgtcatg ctactctctc ctggcctgta agatttccat	19800
	tgaaaagtct gctgccagaa gcattgggtc ttcgttgat gtaattggt ctttttctct	19860
	tgttgctttt aggatccttt atccttgatc tttatcctga atttgattat taaatgcctt	19920
	gaagtggctc tcttcgggtt aaatctgctt ggtgttctat aactttcttg tacttggata	19980
	ttgatatctc tctctaggtt tgggaaattc tctgatatcc ctttaaataa actttctgcc	20040
	cctatgtctt tctctgcctc ttctttaagg tcaataactc tcagatgttc ctttttgagg	20100
	ctattttata aatcctgtag gtgtgcttaa ttgtatttta ttcttttttc ttttgtctcc	20160
	tctggctgtg tattttcaaa cagcctatct tcaggctcac taattctttc ttctgcttga	20220
	tcagttctgc tattaanaaga ctctgatgca ttcttcagta tgccagttgc attttccagc	20280
	tccagaattt ctgcttgatt ctttttaatt acttcagtct ctgttaaatt tccctgatag	20340
	aattctgaat tccttctctg tgttatcttg aatttctttg agtttcctca atatagctat	20400
	tttgaattct ctgtctaaaa ggtcacatat ctctgtttca ttaggattgg tccctgggtc	20460
	cttatttagt tcatttgata aggtcatgat ttctgggatg gtgctgatgc tagatgttct	20520
	tcggtgtctg ggcatgaag agttaggtat ttattgttgt cttcactgtc tgggcttgtt	20580

	tgtacccatc cttcttggga aggctccaga tacttaaaga actagcgtgt tgtgatataa	20640
	gctgtatctg ctttaggggg cacccaagcc cagtaacact gtggttcttg cagactagca	20700
	gagatatacc atctggtatc tcttgggtatt gatggtcgtg gacaagatcg aggagaattc	20760
	tctagattac caggcagaga ctcttgttct cttcccttac ttctcccaa acaaacaggg	20820
	tctctctatc tctgttctga gccacctaaa gctggaggtg aagtgcaca agcaccctg	20880
	tggtaccat cattatgacg gcacttgggt gaactgaagc cagcacagca ctgggtctca	20940
	cccaaggtct gctgtaacct ctcttggcc actgcctatg ttactcaag gcccttgggc	21000
	tttagagtaa gcagatggca aagccaacca ggcctttgtc ttttcttca gggcagcaag	21060
	tttggccagg cccctggagg gtctagaggt gccatctggg agtcaggac tacagtcaaa	21120
	aaccttagaa gtctacttgg tgttctactg tattgcagct gagctggcac tcaaaccaca	21180
	agacacagtc cttctgctc ttcttcccc ttccaaagg caaaggagcc tcacctgaa	21240
	gtccctgcca ccacaggtca caggaggtac tgccagacta ctgccgatga tcccttaaga	21300
	cccaagagct cttcagtcag cttgttggga atgctgcctg gcctgggact caccctcag	21360
[0052]	ggtagtgggc tcccttctgg acacaggcag gtccagaaat gccatccaag agtcaagttc	21420
	tggaataagg gacccagga gccacttgg tgctctacc ttctgtggcc aaaccagcac	21480
	ctaaggtgaa ggacaaagtc cccttactt ttcttctgc ttttctcaag cagaaggact	21540
	ctcttactag agctaccata gctgggaatg tgccagatct cacctgaagc cagcaagtct	21600
	cagaggctca ccaaggccct caacatagtt cctgggtatt gctgctgttt attcagggcc	21660
	cacgggctct tcagttagaa ggtgttgagt gctggcagga ctgagttctt cccttcaaga	21720
	cagcaggttc cttcttggcc cgggatgtgt ctagaaatgt catccaggcg ccaggctctg	21780
	gatcaaagcc ctcacaactg tgactggtat cctatcctgc tgtggcttag ccggtatcca	21840
	agatacaaga caaagtctc cccaccctc cctctcctc cctcaagcag aaggaagggg	21900
	tctcttttgg agccacaagc tgtgcagcct ggggttaggg gagggcgat gccagtactc	21960
	ccttgtcttc cccagcttgt gtctcagtat gtcgccatc cccagtccac tgtctctggg	22020
	cctggttcag cagtagctct tgcctaagag ttgcagttcc tgtggcctag actgctttc	22080
	aagtttactt ggagatacag agcgctgtag ccctcagtggt tgaggtttgc agaaactcaa	22140

	gtttgcacgg ctgggatctg tgatcctttc tggctagggc tggtttaaata gttccctctg	22200
	tgggtgagag tgagctgagt taggtccttt cggttttctt ttctgctcta acaggacagc	22260
	actgagttca gtgcttcaca attgctgtgc tctccctcct ctagtgcccta gagatgctct	22320
	ccacaccaca tcacaacggt ttttcctgcc tctgaagtta aaaccaggta ctatgagggc	22380
	tcacctgatt tttggttctg atgaagggtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg	22440
	tgtgtgtgtg tgtaaattgg tgtccttgaa gggaggatga tgggtggagt cttctatttt	22500
	gccatcttgc tccacctcca cctcacctga ggccttttac ctctctctga ggaccgcct	22560
	aatgcgtaat gctggtaaca ggtattcatt tgggagaagg tgttgcagtg atcttccctt	22620
	ttgcataaga attttggagg ggtcctgaga tactttaatt aattgaagaa taatcccaaa	22680
	tgttctccag gaaagtttat gttgttttgt ttatgctggg ggtttacctt aaccagaaa	22740
	agttgctgtg atccaaaaag gagcaagtta aaggaggaa tgaacagga attcaggatg	22800
	aaaaaatgag aaatctttcc aatggttgtt gttttgttta tgatgaatgc cacggatgc	22860
	agacattctt atgcagaagt gagtttaaaa gatccaaagc atttccaccg ttttctgttt	22920
[0053]	aaagagcagc aacaagaatc acacatgttc caacatgcag ttagagagg ctagaggcac	22980
	agatatggac agacgtccct gctcctaaca gctctctaag gtctggtgga ggattcagac	23040
	acatgacctg gcctggagga ttgagcttct ggattgtctg taagctaggc aatccactat	23100
	ttagtcttta gtactgtaat agaggctca gtaagtgtg accttgttg cctactttat	23160
	atatttttat tttgtcgat accaaatatt gtggaaggat ttcaggtagg aattttgagt	23220
	gttgtttttg catcaattta taaagatgac ggtctctgag ctttgcaggc agtatgtcta	23280
	taccgtgttg attcatgtgc ctggctacag gtcaccacac actatacact cttgagttg	23340
	ctctggagaa atctcaatga gccacctgca acataacctg ctttgtggct gggttcctta	23400
	aaatccaata tattctgaag gatgtgatca ataagcagat ggctcaagcc catacacatg	23460
	ccaagaaatg aggcatctaa ttaacagtta gacaagggtg tgaggaatt gcagaggggt	23520
	gtggaggccc tgctgggct gggagacctc gggatgggag aatcagggct ggttgtgtga	23580
	cgtgtcgaca catagtggct gttggaagtg tgaacacagt cgggacctc aggctgtgct	23640
	cattagggct ttgcaaaatt cccaattatc tcttgacctg gccctaagca aggcccttt	23700
	ccattgccct ggaaaaaaaa aatgagtgag tcaaaaagga cacctgattt gacacgctac	23760

	atgggtttgg tcttgaagct aggctagtag aacacagaaa tgaggcattc ttgtgcaacc	23820
	agtgatgact acaggaagga taagtaccag gagcatccgg tgtcacagag gcaagggcgg	23880
	gctttttgag atggctgtat ggtgccccea acaaaggcca gaaagagacg atttgtgaga	23940
	agagaccaac gcgccccttg caaagaattc ataagcagtg tttcagttaa actgcaaadc	24000
	tcatggatgg tgtcaaaaga gtgaggactc ctttccgtac acgtctcaca gctcaaacag	24060
	gaacagaaag aggctttctc tctgtgtctt ggagaacca cactaagtg ctccctgggtg	24120
	tcagagaagg gaattgggct cagtgtgaca gctttccctg ctatatgtga aatacattat	24180
	caatctgttg tcagcctgat gctccctagc tgactgtttt gttgttgccg ttccagtgtt	24240
	accctggggtt ggtccctgcg tgatgtttct aatataaaat atgcagattg tgaagagaa	24300
	gacaatgctt cgagtctgat ctatcctaag atgaatgtgc taatgctccc aagaccata	24360
	agacagagga ggtcaagaag gtgccttggt gtaggcgatg catcttcaaa ttcgttgaca	24420
	caggctcgtg aattcagatt agcacttgac cacaaataca catgttaaaa caaagtcaca	24480
	ttaaacatct ctcttctca atctccttc ccagcttctc tgacagagaag aaatgcaaga	24540
[0054]	aggtgagtga ataaaatcag aattatttgc tttttattct gaggacaaaa gacaactggt	24600
	tggattccat gggcacacag tgatctaagg ttatagtaac caacaactat gactaagaaa	24660
	gtgatagtca ttgtgatagt taattttaca tgtccatttg gctaggctat ggtgccaat	24720
	tgttttatca aatgctagct ggatgttgct gtgaagggtga ttaacattta aatccataag	24780
	ctttgagtaa agttgattac cgtccataat gtgagtggcc ctcatccagt tagctgaagg	24840
	acttacgaga atgattgagg tttctggaag aagaaattct gcctcaagac ttttaacata	24900
	gagactctca gcctgcagat tttggactca agactgcaac atcatcttgt gcctgaaatt	24960
	ccagtaggct gccttgccct acagattttg gacttgtcat catccccat aatgacatga	25020
	gtcaattcct taacataaat ctctcctata tctctactg gctctgtttt tctggataac	25080
	cctgattaac acaatcattc tgtctattgt agatgatctg tcctccttga ccacactcat	25140
	tggccaacac tagccttatt acctgcaaac atgagatagc atgatctatt gccagaaaa	25200
	gaggatagaa tagaggctat tttttcctc ccatctcct gttcccctgt cctctatcct	25260
	tatcttaatc tttccaacct actattatgc tccaagagtg ttacctactt ttattatttt	25320

	ctgtcttcaa agttaaagag tgcctgaaag tatgcagata attcaaaca aaaagcaaca	25380
	cttccctgtg taattattcg ctcaactctt tgccttggtg taatttatgt gctcaacact	25440
	tttcttgga atcttagcta aagaagactt ttctggggac tggcggtggt ggctgaagcc	25500
	tgtaatccca gcactttggg aggccgaggt gggcggatca cgaggtcagg agatcaagac	25560
	catcctggct aacacggtga aaccccatct ctactaaaaa tacaaaaaaa ttagccaggt	25620
	gtggtggcgg acacctgtag tcccagctat tcaggaggct gaggcaggag aatggcgtga	25680
	accaggagg cagaacttgc agtgagccaa gatcgcata ttgcaactca gcctgggcga	25740
	cagagcaaga ctctgtctca aaaaaaaaaa aaaaaagaac acttctggaa actgtttttc	25800
	ctggcagtcc ttggtcaagt tgctaattta atattttaga tggttttgac atggtttaga	25860
	atgcaaaatt atcatctttt aatatgtatt tgtttgcaga gaacccatgg gccttagttc	25920
	atttctgcac ccacagagag gtttaatctc atttaaagtc taaacatcgc agtggtcagg	25980
	cattaggaac actgctagga aggctgcaac aaaacaagtg tttccactta gtgttatttg	26040
	ggggttacca tccacatcat acaggaaatg gagtgacaaa taccaatttg agaaaggaac	26100
[0055]	acaatgaaac tacataattc ctctttagg ttagttgatc tgtaaccaag ccttaaaaat	26160
	tgacattgac attgaaccac tgcctgtgaa gggagaaatga gaaataacct caaatctgcc	26220
	tctaaataaa ccatccatag ctttaattcaa gagttgggat accagctctc tagcattcaa	26280
	atggaattta ggtatttact aggcatactg tgggggattt ttaagttgaa tgggtaacat	26340
	agagcattgg ggcaaaataa tagaatacgg ttgctggttt caatgacagc atgggtcttt	26400
	tccaccaaga gactacagta caaaatttaa atcaggtaaa ctggtccaat gtagaaagca	26460
	ggcagtcagg gaagcatagt ttaagggtgg cattgaaata gttttgccac ttcaatttgg	26520
	tcactagctt ttgggatcag agtatagtgt caatgaagag agtcaaattc tgtaaaatat	26580
	ttgaagagat ttattctgag ccaaataatga gtgaccatgg ctcatgacag ccctcaggag	26640
	accctgagaa catgtaccca aggtagttgg ggcacagctt ggttttatac actttagggg	26700
	gacacaagac atcaatcaaa tacatttaag atatacattg gttcgattca gaaaggtggt	26760
	acaacctgaa gtggcagggg ggtggtggcg gggcagcttc caagttatag gtagatttaa	26820
	acattttctg attggcaatt ggttgaaaga cttactatca atagaaagaa atgtctgagt	26880
	tatgataaaa tgttgctgag accaaagttt tatcatgcag atgaagctc caggtagcag	26940

	gctctagaga gaatagattg taaatatttc ttatcagact taaggtctgt gttgatgtta	27000
	catgctggtc agctcttcct gaattccaaa agggagggtgg tataacgagg tatgtctaac	27060
	ctctctaaga gctccctctt agaaacaaac agacaaaaca cacaacaaaa accacacttg	27120
	taaaccatc gtcccatctc tccacagctt gacttctttt cataatccag atttggctta	27180
	gggatccaag agtcttgaaa atatttccca tgcatttatt ctgaaatttg ccaagggtaa	27240
	tttgactcct ccctttgggt tttgtgttta tgggtgcctga gatttcaa at ttgacattgt	27300
	taattttgtt cccacactcc aatcagcctt gccacactca acaa atgtcc acttcattct	27360
	ttcgggtgggg gtcactctgg actttgttct ttctctcaaa ttgtcagtca acaactctgt	27420
	cggccctgcc tttgaaataa attcatctag gatcctgcc ctcttcacca ctgccaccac	27480
	catgctggct aaagccactg ttatttctcg taggttagga caacaccttc tgtctgggtg	27540
	tgctctact gtctagtctc cacacatagc cagaatactc ttaaaacata catcagatac	27600
	catcatttct tagcttgcca ttctcta atg atgtcccaca attcttagag taacatctca	27660
[0056]	aaatgtgacc atgccctgtg tattagctgt cctcatcctc ctctcctcc tccccttctt	27720
	cttcttcttc ttctttatca tcattaaact ttaagttctg ggatagatgt gcagaatag	27780
	caggtttatt acataggat acatgtgcca tgtggttttc tgcaccctc aaccattgt	27840
	ctaggatttg agtctgcat gcattaggt tttgtcctaa tgctctccct ccccttgcc	27900
	cccatcccct gagaggcccc agtgtgtgat gttcccttct ctgtgtccat gtgttctcat	27960
	tgttcaactc tcacttatga gtgaaaacat gtgggtgtttg gttttctggt cctgtgttag	28020
	tttgctgaga ataatggttt ccagattcat ccatgtccct gcaaaggaca tgaattcatt	28080
	cttttttatg gctgcatagt attccatggt gtatatgtgc catattttct atatccagtc	28140
	tatcattgat gggcatttgg gttggttcca agcctttgctg attgtgaata gcaactgcaat	28200
	aaacatacat gtgcatgtat ctttacagta gaatgattta tcatcctttg ggtgtttata	28260
	cccagtaatg ggattgttgg gtcaaatggt atttctgggt ctagatcttg aggaatcgcc	28320
	acactgtctt ccacaatggc tgaactaatt tacactgaca cagtgtaaaa gctttcctat	28380
	ttctcgacat cctctccagc atctgttgtt tcctgacttt ttaatatttg ccattctaac	28440
	tggcatgaga tggtatctca ctgcggtttt gatttgcatt tctctaacga ccagtgatga	28500

	gctttttttt tcatgtttgt aggctgcata aatgccttct ttagagaagt gtctgttcat	28560
	atccttcacc cactttttga tggggttgtt tttttcttgt aaatttgttt aagttccttg	28620
	tagattctgg atgttagacc tttgtcagat ggagagattg caaaaaattt ctcccattct	28680
	gtaggttgcc tgttcactct gatgatagtt tcttttacta tgcagaagct ccttagttta	28740
	agtagatccc atctgtcaat tttggctttt gttgccattg cttttggtgt ttttgtcatg	28800
	aagtctttgc ccatgcctat gtcctgaggg gtattgccta ggttttcttc tagggttttt	28860
	atggttttag gttttatggt taaatcttta ggcaatcttg tgttaatttt tgtataaggt	28920
	gtaaggaagg ggtccagttt cagttttctg catatgctta gccagtgtcc ccagcaccac	28980
	ttattaaata gggaaatcctc tccccattgc ttatTTTTgt caggtttggt gaagatcaga	29040
	tggttgtaga tgtgtggtgt tatttctgtg gcctttgttc tgttccattg gtctatata	29100
	ctgttttggg accagtagca tgctgttttg gttgctgtag ccttgtagta tagtttgaag	29160
	ccagggagtg tgatgcctcc agctttgttc tttttgctta ggattgtcat ggctatacag	29220
	gctcttttct ggttccacat aaaatttaaa gtagtttttt ctagttctgt gaagaaaatc	29280
[0057]	aatggtagct tgatgggaat agcactgaat ctataaatta ctttgggcag tatggccatt	29340
	ttcacaatat cgattcttcc tatccatgag gatggaatgt ttttccattt gtttgtgtcc	29400
	tctcttattt ccttgagcag tggttttag ttcttgaaga ggttcttcgc gtcccttcta	29460
	agttgtattc ctaggtattt tatttcttt gtagcaattg tgaatgagag ttactcatg	29520
	atgttgctct cttttcatct gttattggtg ttttaggaatg cttgtgggtt ttgcacattg	29580
	atgttgatc ctgagacttt gctgaagggt cttatcagct taaggagatt ttgggcagag	29640
	atgatggggg tttctaaata tataatcaca tcatctggaa atagacaatt tgacttcccc	29700
	tcttcctatc tgaatactct ttctttctct tgcctgattg ccctagccag aacttccaat	29760
	actatgttga ataggagtgg tgagagaggg catccttgtc ttgtgccagt tttcaaaggg	29820
	aatgcttcca gcttttgccc attcagtatg atattggctg tgggtttgtc ataaataggc	29880
	ctcattattt tgacatatgt tccataaatc cctagtttat tgagtgtttt tagcatgaag	29940
	ggatgttgaa ttttattgaa ggccttttct gcatctattg agataatcat gtggtttttg	30000
	tcattgggtc tgtttatgtg atggattatg tttattgatt tgcatatggt tgaaccagct	30060
	ttgtatccca gggatgaagc cgacttgatc gtggtggata agccttttga tgtgctcttg	30120

	gattcgcttt gccagtatth tattgaggat tttcgagcg atgttcatca gggatattgg	30180
	cttgaaatth tattthtttg ttgtgtctct gctaggthtt ggtatcagga tgatgctggc	30240
	cttataaaat tagggaggat tccctcttht cctattgtht ggagtagctt caggaggaat	30300
	ggaaccaact cctctthtga cctctggtag aattthggctg tgaatccatc tggctctggg	30360
	ctthttthtg ttcgtaggct attaattact gcctcaatth cagaacttgt tattagtga	30420
	tatggggatt caacttcttc ctgggttagt cttgggaggg tgtatgtatc caagaatth	30480
	tccatttctt ctacatthtc tagthtactt gcatagaggt thtcatagca gtctctgatg	30540
	gtagththta thtctgtggg atcagtggtg atattccctt tatcatttht ttattgtgtc	30600
	tatttgattc thtctcttht tcttcttht tagtctggct agcagtctat ctatthttht	30660
	aatctthtca aaaaaccagc tcctggattc attgatttht tgaaggtht ttcatgtctc	30720
	tgtctcttc agthctgtg ttagtgtgtt ggthttagat cthtctgtc thtctgatgtg	30780
	ggcattatag tgctataaat thcctctta aactgtctt agctgtgtcc cacagattct	30840
	ggcatgttgt gtctthattc tcattgtht caaagaactt atthattct gcctcaatth	30900
[0058]	tgthatttac ccagtagtca thcaggagca ggtgtttag tthccatgta gthgtgtgg	30960
	thtgaatgag thtcttaatc ctgagthtca atthgattgc actatggtct gagagactgt	31020
	thgttacgat thccattctt thgcaattgc tgaggagtgt thtactthca attacgtgg	31080
	caatthttaga ataactgcta cgtggtaga agaagaatgt atattctatt gattthgggt	31140
	agagagthtct gtagatgtct attaggthtct cthggthcag agctgagtht aagthctgaa	31200
	tatctthgtt aatthtctgt ctcatthtct tgcctaatac tgacagthgg gtgtthaaagt	31260
	ctcctactat tattgtgtht gagactaagt ctctthttag gtctctaaga actthctth	31320
	tgaatctggg tgctcccga ctgggtacat atattthtag gaaagthtagc thtctthgt	31380
	gcattgatcc cthtaccatt atgtaatgcc cthctthtgc thththtcat cthtthtgg	31440
	thaaagtctg ththtcatcaga gactaggatt gcaacacctg ctgththttht ththttht	31500
	atthtthttht ththtththt thtagctthcc atthgctthg thactatthcc thcatctct	31560
	tatthtgagc gtatgtgtgt cthtgcatht gagthgggtc thctaaatac agcacaccaa	31620
	tgggtctthga ctctatccaa thtgccagtc tgtgtcttht aatthgggca thtagthcat	31680

	ttacttaaag gtaatatcat tatgtgtgaa tttgttcctg tcatcatgac gctagctgtt	31740
	tatstttgcac attagttgat gcagtttctt catagtgtca atggctctta catttcggtt	31800
	tgstttttgca gtggctggta ccagtttttt ctttccatgt ttagtgcttc cttcaggaac	31860
	tcttgtaagg caggcctggg gttgacaaaa tccctcagca tttgcttgtc tataaaggat	31920
	ttttttctcc ttaacttatg aagcttagtt tggctggata taaaattatg ggtcgaaaat	31980
	tcttttcttt aagaatgttg aatattggcc cccactctct tctggcttgt agggtttctg	32040
	cagagagatc cactgttagt ctaatgggct tccctttgta ggtaacctga cttttctctc	32100
	tggctgtgct taacactttt tccttgtttt caaccttgga aaatctgatg attatgtgtc	32160
	ttgggggttg ctttctcgag gagtatcttt ttgggtgttct ctatatttcc tgaatttgaa	32220
	tgttgacctg tcttgttagg ctgtggaagt tctcttgga aatatcctga agtatgtttc	32280
	ttggaaaata tcctgaagta tgstttggaaa atatcctgaa gtatactttc caacttggtt	32340
	ccgttctccc catcactttc aggtacacta atcaatcata ggctttttca catagtccca	32400
	tatttcttgg aggcctttatt tgcttctttt cattcttttt tctctaactt tgtcttcacg	32460
[0059]	ctttatttca ttaagctgat cttcaatctc tgatatcctt tcttctgctt gatcgatttg	32520
	gctattgata cttgtgtatg cttacgaag ttctcatgct gtgtttttca gctccatcag	32580
	atcatttatg ttcttctcta aactgcttat tctagttagc aattcctcta accttttatc	32640
	aaggttctta gcttccttgc attggtttag aacatgctcc tttagctcag tggagtttga	32700
	tattaccac cttctgaagc ctacttctgt cgatttgtca aactcattct ccatccagtt	32760
	ttgtgccctt gctggagagg agttgcaatc atttggagga gaagaggcat tctgtttttt	32820
	ggaattttca acatttttgc actgtttttt cctcatcttc gtggatttat ctacctttga	32880
	tttttgatac taatgacctt tgggtggggg ttttctgtgg gcatcttttt tgttgatgtt	32940
	gatgttattg ctttctgttt gttagttttc cttctaacag tcaggcccct cttctgcagg	33000
	tctgctggag tttgctggag gtccactcca gaccctgttt gcctgggtat caccagtgga	33060
	ggctgcagaa cagcaaatat tgctgcctgc tccttccttt agtagcttcg tcccagagtg	33120
	gcatctgcca gaagtcagct ggagctcttc tgtatgaggt gtctgttgaa ccctgctgga	33180
	aggtgtctcc ctgtcaggag gcatgagggt cagggacccc ctttaaggaga cagtctgtct	33240
	cttagcagag cttggacact gtgctggggag atccgctgct ctcttcagag ctgacaggca	33300

	gaacgtttaa gtctgctgaa gctggatcca cagccgcccc ttccccagg tgctctgtcc	33360
	caggcagatg ggaattttac ctatcagccc ctggctgggg ctgctgcctt tctttcagag	33420
	atgccctgcc cagagaggag gaatctggag aggcagtctg gccccaggta ctttgccatg	33480
	ctgcggtgag ttctgcagtc agagttaaca ctgtaagggg aaaagcacct actcaagcct	33540
	cagtaatggt ggacgcccct cccccaacaa gctcaattgt cccaggttga cttcatactg	33600
	ctgtgctggc agcgagaatt tcaagccagt ggattttagc ttgctggact ttgtgggaat	33660
	gggacccgct gtgcgagaag acttggcttc ctggcttcag ccccctttcc aggggagtg	33720
	gtggtttctgt ctcaactgggg ttccaggcac tgctggtgta tgaaaaaaaa ctctgcagc	33780
	tgtttatctg cccagagagt tgcctagttt tgtgcttgaa acccagggcc ctggtagtgt	33840
	aggcacacga gggaatctcc tggctctgtg gtggcaaaaa ccatggaaaa agcatagtat	33900
	ctgggctgga tagcacagtc cctcacagta gagtccctca gggcttcctt tggctaggag	33960
	agggaggtcc atgaccctt gcacttcctg ggtgaggcga taccacacc tgcttctgtt	34020
	ccccctccat gggctgcacc cactgtctaa ccagtcccag tgagataaac cgggcacctc	34080
[0060]	agttggaaat gcaataatca cccaccttct gcgttggctc tgctgggagc tgcagactga	34140
	agctgttctt attcagccat cttgccaact ctcttgatt agttttctat tgctgccata	34200
	acgaatagtc tccatcttag cagctaaaaa caacacccat ttatcaactc acagttctgc	34260
	aggtcagagt ctcgtaggct tggctagttt ctctgtcctg agtctcatca gattgacagc	34320
	aaggggctga caaggctgta ttcccttttg aaaattttgg agatggatgt gtgtctttgt	34380
	tcattcaggt tattcactga attcagttcc tgtggttgta gcaatgagat ctccgtttcc	34440
	tttctggcgg tcagcccagg gtagcctttg ctcttagatg ctgcttgcat ccctcaatct	34500
	ttccaggtgg cccctccacc cacagcaggt agggctccagg tccctctctt gctttagatc	34560
	tttctctctt actcttctca ctccagccac atttctctca ctccagccag agacatttct	34620
	ctaatttttag atgggttcca ctccctggtt taaggctctgc tatcttaatt gcatctgcca	34680
	aatctcatca tagcagtacc caggtaataa tttgattgaa ttactgggag ataggaatag	34740
	tgagggacta ccacagccta ggaagtcttg aatgatatga ttctgtgac ttctctgact	34800
	tcattgtcatc cctctttccc ttttaatatc tagactccaa gtcagtatgg cctccttgc	34860

	gttttctcca attgaccaaa cctatatcca cttgagggcc ttgacacctc acatttcctc	34920
	tgccagaaca cccttgcccg aggcctttcc atggcccact ctctactaa gttggatgag	34980
	tcctctggga agcagactcc aaggcagtat taggagagct caagatttat tgggggtaag	35040
	gcctgtgaaa gataaaggag agaagggaca ggagtgggaa ggctgggcct tcagaccaca	35100
	gtgcaggtct gacatccttg cagggatagg aggggatagg aggattggat gaagagcctc	35160
	agatttccat gcatactgca ctgagaaagt gtcagccagc ccagcaggga gcttttgcca	35220
	cagagattgc ctgtggaagg gttccacgct gcccgggaaa tggcaagcct ttgtatcatt	35280
	gtgctccgctc attggctgag gattatccag gaagcatgtg acctccactc aaaagctgag	35340
	ggagaaacaa ccaaatgtcc atcaacagat gagtggatgg acaaaacgta gtatgcacat	35400
	tcagtggaat attatccagc catgaaaagg aatgaagtat tgacacacac taccacatgg	35460
	atgaacattg aaaacactgt gctcagtga ataaaacagt cacaaaagga caaatattgt	35520
	atgcttctac ttatggtaaa tatttagaac aggtaaatcc atagagacaa aatatagatt	35580
	agaaggtcca aggcttgca aaggaagaaa tgaggagtta tcatttaacg ggtacagttt	35640
[0061]	ctgtttgagg tgtaacaat ttttgaact ggatagtggg ggtgatagtt gcacagaatt	35700
	gtgaatataa ttaacaccac tttaaaatct taaaaatggg tgaagtggca aattttatgc	35760
	taaatacatt ttactacagt aaaaaacaaa acaaaacaaa aaaacagacc gaggcagatc	35820
	ctgaaagcac cagcagctag aagctgtcag caaatagcac cttttgtggg aagcacatct	35880
	ccatggctgc catgctcact gcctcgggtc tctgccgaaa tggcaactga gcagtgagtc	35940
	ccttaatgac taaattacat ccaagaggaa ggcctatcct tctcagtcaa gttaatTTTT	36000
	ctccattaca cttaaagcct tctgacttat atatttacct gtttattttc tgcttcccca	36060
	atagaccata aacacatga gatcagagca tccatctgta gactcacaga gcaagaagcg	36120
	tgactgcccc aatcttgaat ggatgagtaa g	36151
	<210> 59	
	<211> 2861	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 59	
	ctcgaagac ctggttgttt aaaagtgggc ggcaccttcc ccttcgctct tcctcctgct	60

	cctgccctga tgtgtctgga tggtagacaga tgggaatctt ctccagtgac cagaatccat	120
	gccttacctt gggagcccaa gctgacttct caagctctgg ggatgcctca gtgatctctg	180
	atgtggaatt agtggaggct ggccgttgct cacctctaca cagcctgctg gtcgtagcg	240
	agcaggagtt ctgatgttcc tctcatcttg gatgtctttc ctaggagaat atttctcacg	300
	tgtttgacag aaaacattat ctgtccatca tttccatgga ttcctgggtc tcacgggcag	360
	aaggacaagg cagatatgag gcggatctgg taaaaccata aacacatga gatcagagca	420
	tccatctgta gactcacaga gcaagaagcg tgactgcccc aatcttgaat ggatgagtaa	480
	gatgaaaatc aatttataaa catcttgtga caagctggaa ttcagttata gatcaattac	540
	agattgctca ctggacaatc aaggacatta ttagaaaacg gtttccacca ctagaaattc	600
	atctacattg acatccacct aaatatccag aaggatcatcc ccactttcgt cgctctccac	660
	agtcagctgc cgggtccacc acttctaac ttcagaaccg caggaagccg cgtcagtcac	720
	ggggttcatt ttgcacacga cagatttcat ggttgtcctt cctccaaacc gaggaaccta	780
	gatcttctct gatctctgaa aaataagttc ctggatatga aaggggatac tttccttggc	840
[0062]	ggtagtccca gtgaagacc actgaacatc gtcagcctca aatgtaagc tgtgctgtca	900
	tctgctttgt ggaacacata tgctacacat cttctcctt caattgggct gaagttgggg	960
	cacagttaa gagcattata aagctcctgc tttagcatga acttagttat ctatagaaaa	1020
	aaacatgtac aaggacactg ggctgtgggg agcattgctc tccctccatt cctgagtgtc	1080
	cttaatggga ttatcctggc tttccaaaac cctatagaga agaagctcat agaagaaaat	1140
	tctcttactg aatcagtaaa atatggaaaa taatgggact gtttattaaa ggattgaaatg	1200
	agagaacaca agtaatgcac ttagaagagt gactggcata cagtgagtac tacgtgctgg	1260
	cttctcaacc atgatagcct gaaatgtacc cggaaaatgg gggctaattgt aagtcatatt	1320
	tagagaagtt attttggggg acaatgtttt tgacaagact acatthttca ttatgttgct	1380
	gtctgtaaac aactgtagat gcagacttgc attttgaaag gcaagacca aaacacacaa	1440
	acagagtaaa tacctttaa atgcctcgat cgctggagaa atgcctggat ggacctacct	1500
	gagggcagac gccactgccc aaatttcctc tggggtttcc ctgcgtcggc tgcactctgc	1560
	cgacttcctc ctcgatccga cagcgtgggg ctcaggagct gctgctggct gcttgtctgc	1620
	atgggaggag aagcacacag ttaccgtctt ttaaccctg cgctctctc cttttactat	1680

	aagaaaggaa aacacatggc aggaggacaa gtgggaagaa caacatggac tcagagtgtc	1740
	cacaatgggg aaaagtgaaa atgggtataa agggtcacag aagaaaaaga gccaccactg	1800
	cacgccctgc tgaaggagac accactcttc ctgggacatc ttgtcctggg taacccccac	1860
	tgcttcgttc ccctccatgc ctgagaatgt cattgtttcc cttcatatct tcgctggcaa	1920
	accaggggggt aaggaagggg aactgcagga aggaaggtgg ggcagtgggg acgggctggg	1980
	cgggggcagt ctactgtcac cagcctggag atccacactt agagcttcag ggaaagagtt	2040
	ctctgcaggc aaagctgtat gatgggccct ggtggaggat ggagctgata acaatctaag	2100
	ctacagtgaa agaaagagag atgccaagac ttccacaca tttcacctgt tctcaggttc	2160
	acctgtcacc tctccctttc ctaacaaaag ccttggctctt cacatctctt tagtatcctt	2220
	tttttttttt ttttgtcacc tctttctttc ttaggctttt tcatctaaaa acagagggct	2280
[0063]	ctgaaatcat cactttcccc aacctcatta gccctgtctc actgtctgtc ctgacttcag	2340
	cctgcctccc tctcccatgc gagacattgc caaccatctt cagggtgacc agtggcaagg	2400
	ccactgcaga tgcctcccct tgccccttgg ttgactaact ccgcagaagt ccctgcagtc	2460
	ggtggcagat gatttctaaa ggctggggag cccaaaacat gagatctact gaaaactgag	2520
	ctatggcacc agtgggcctc ctggagcacc ctgctgggcc gtggagcctt aggcttccaa	2580
	aggctactctg gccctggct gcgttgctgc acaccatgga gcctggtgct gctgggggct	2640
	ctgcacagag cacgggatca gctccacgtt gttaacctca aatcgtaatt gctgcctcat	2700
	aaaggggcag gtccctccag ccagctgctt ctcacagcac aggactctcc aggacgctga	2760
	taactccttg tactttttta tatagacaca tacatagagt ttgaaaatga aaatatgctg	2820
	tgacttaata aatagaaact cctcaaaaaa aaaaaaaaaa a	2861

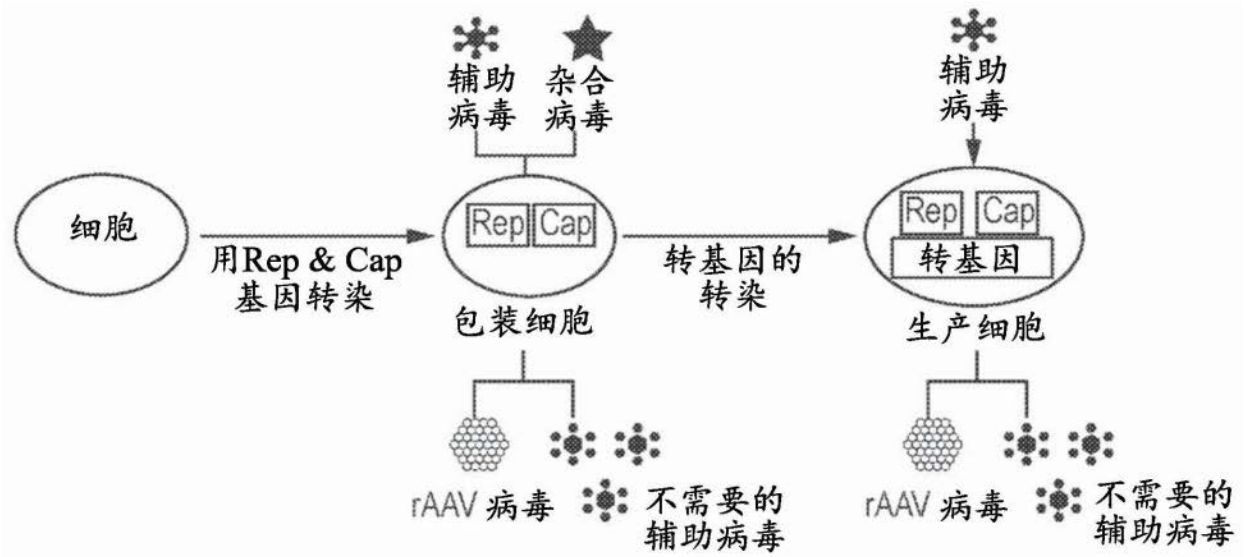


图1

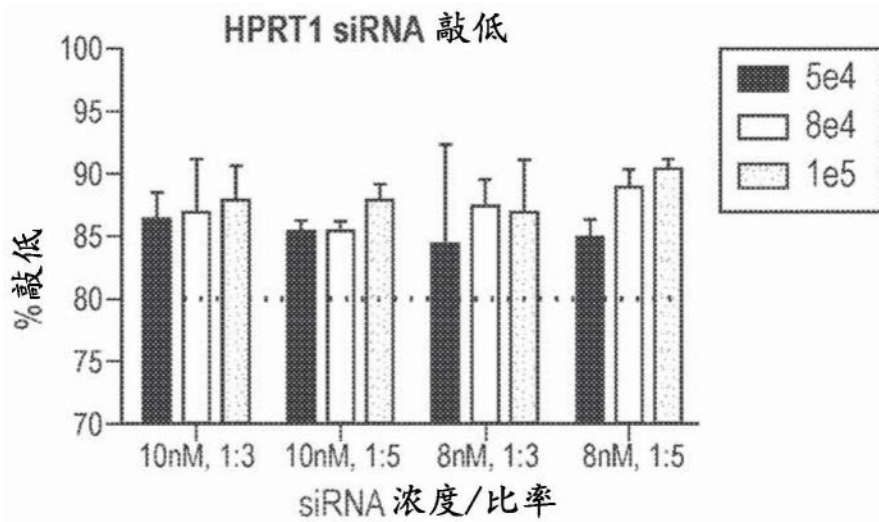


图2A

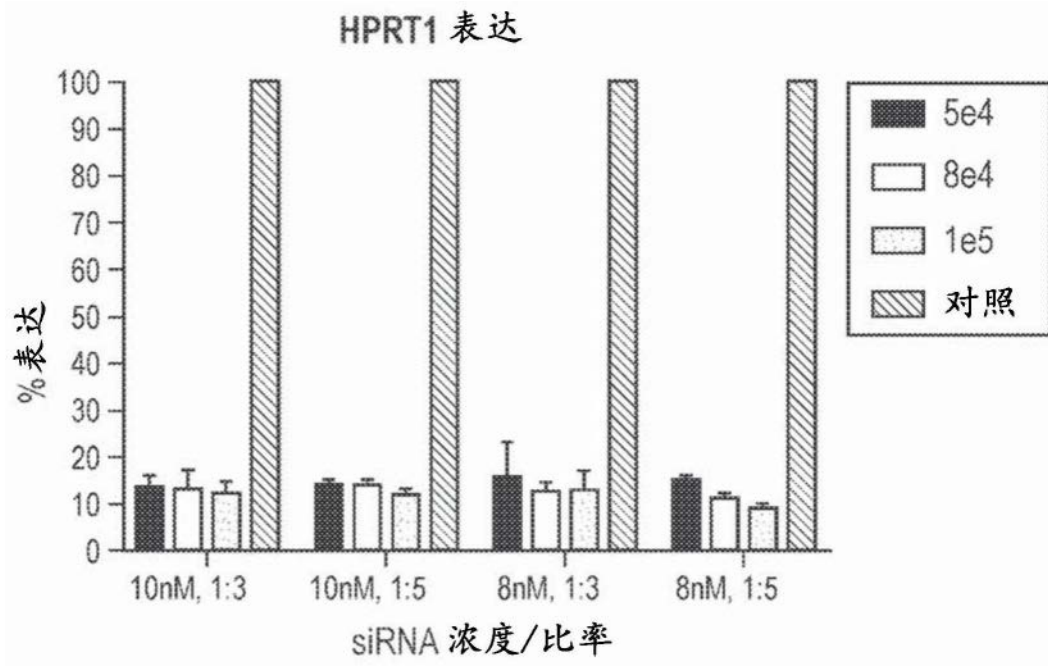


图2B

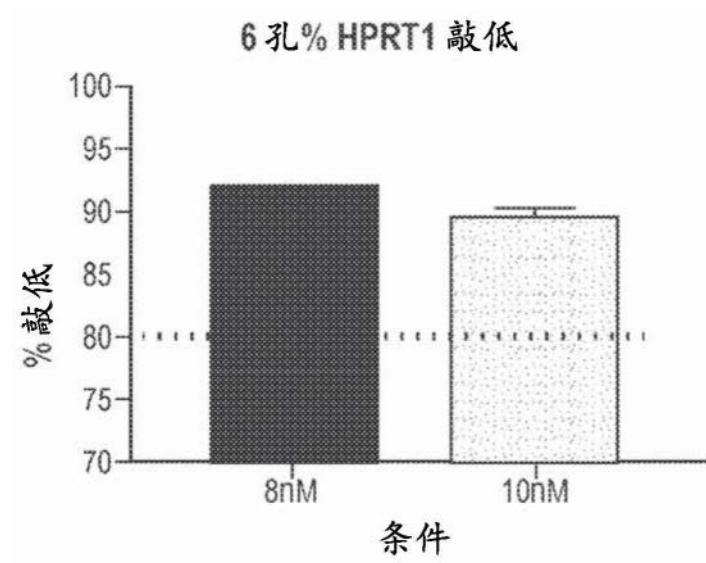


图2C

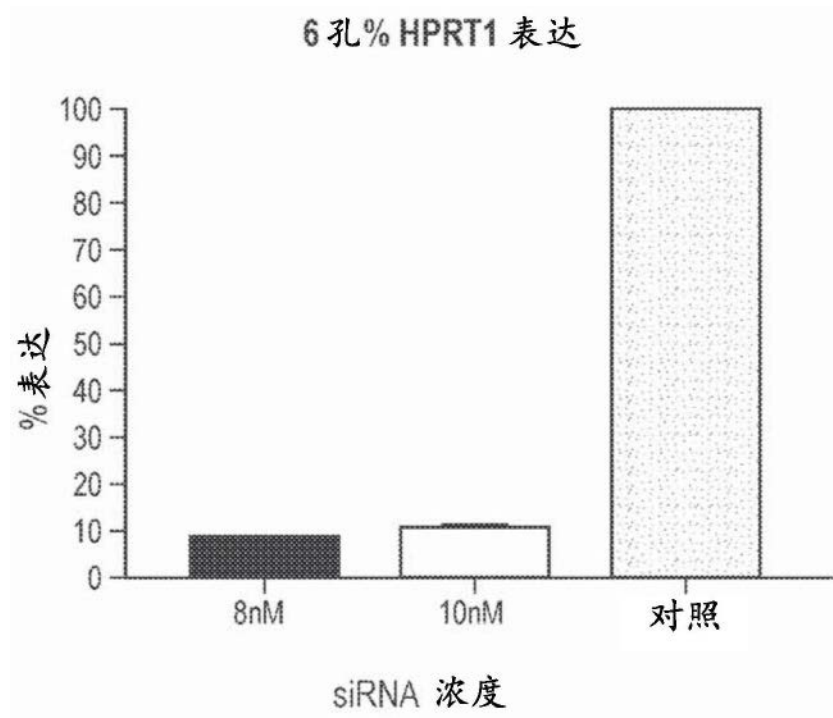


图2D

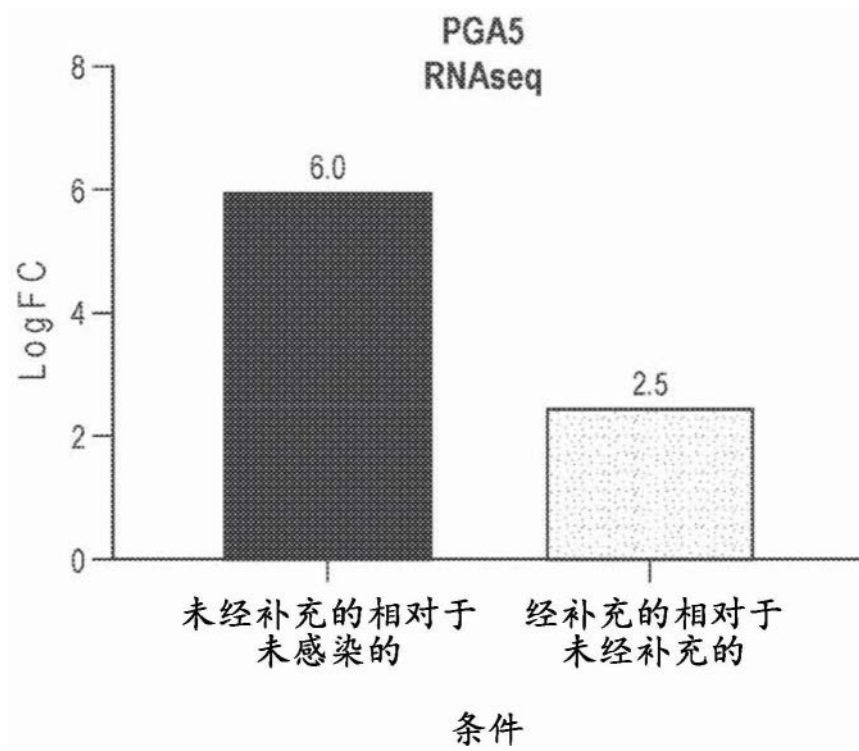


图3A

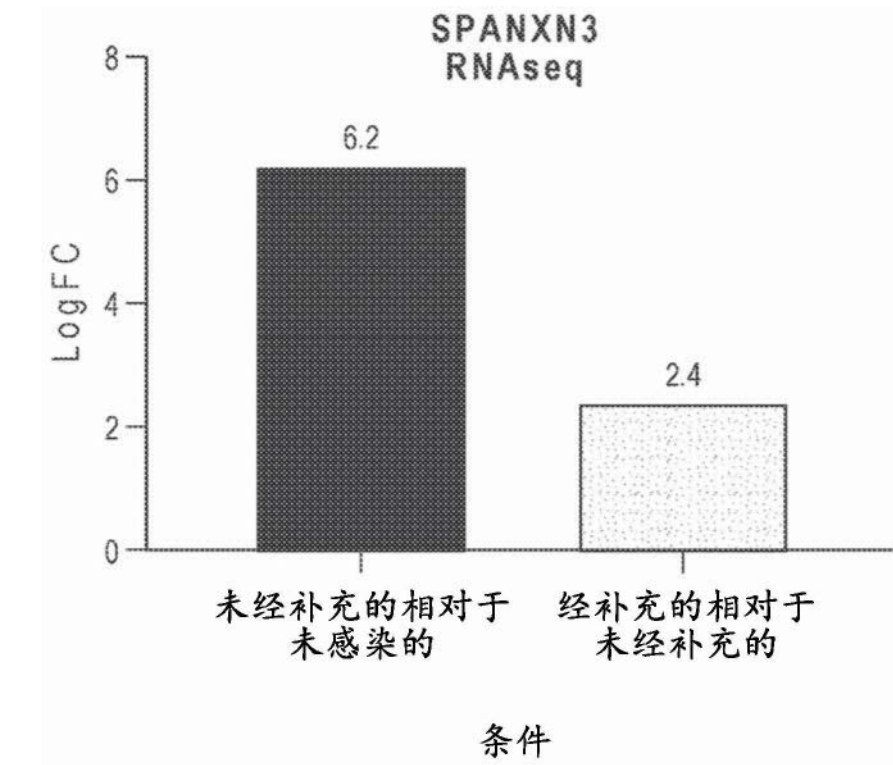


图3B

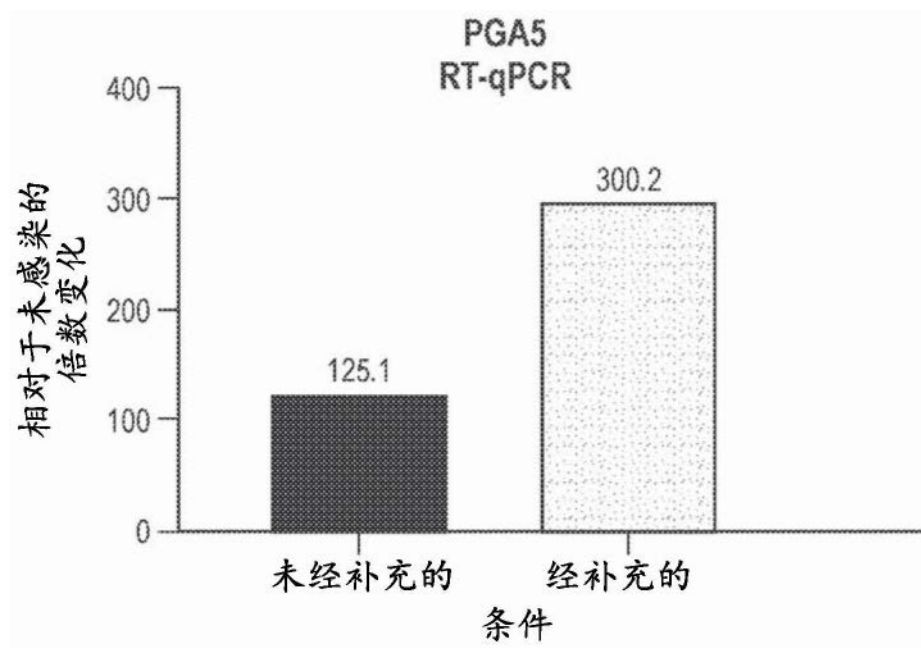


图3C

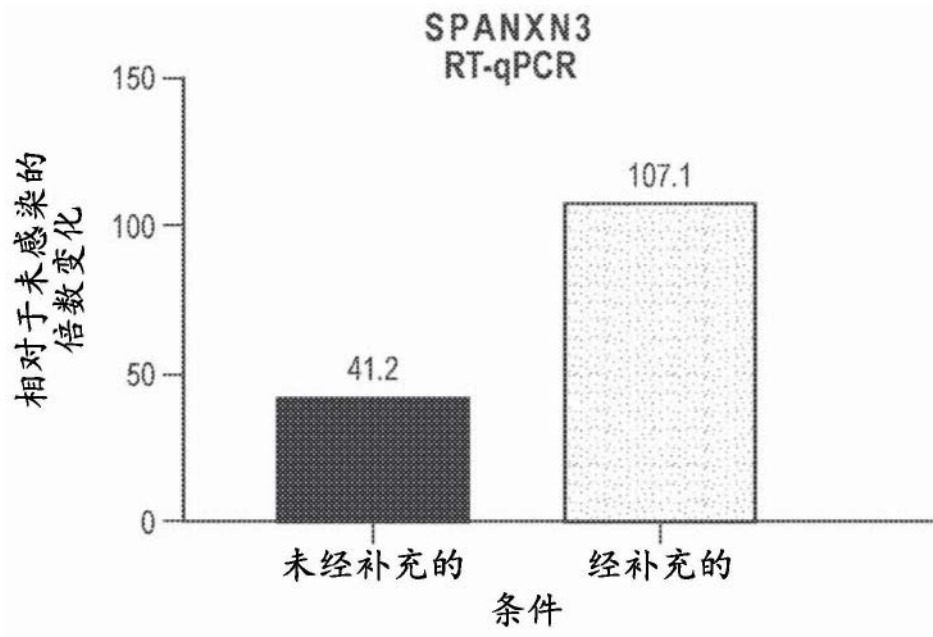


图3D

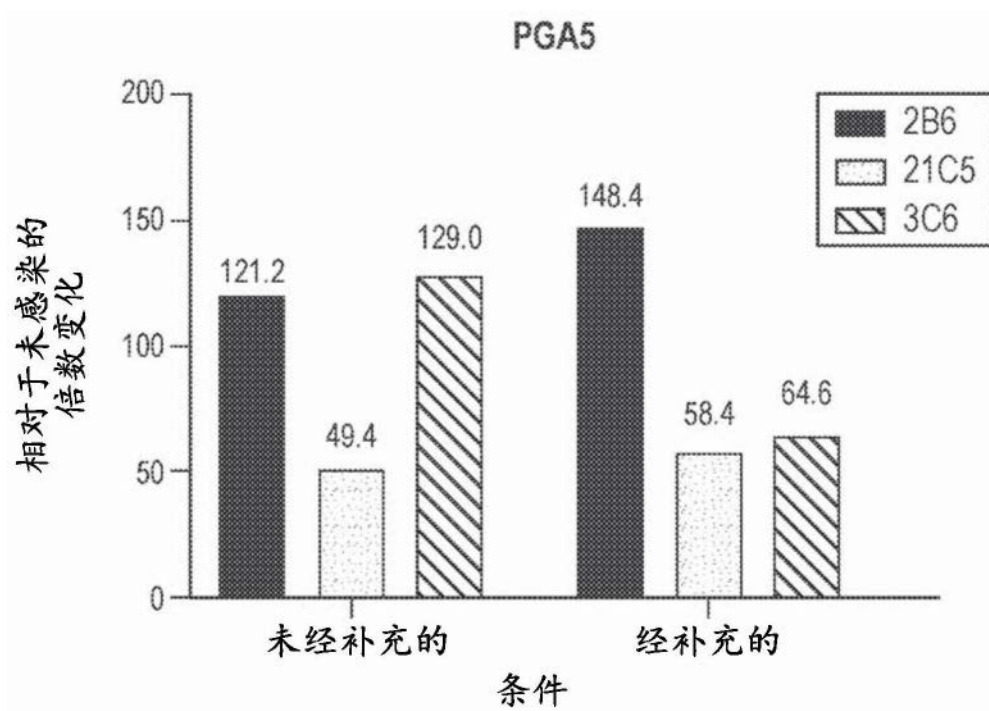


图4A

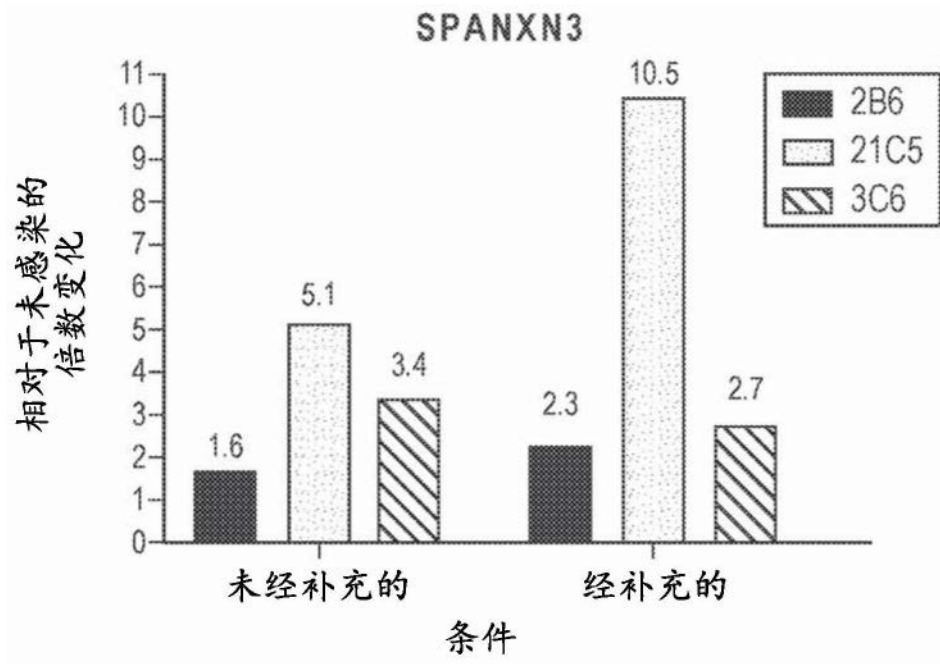


图4B

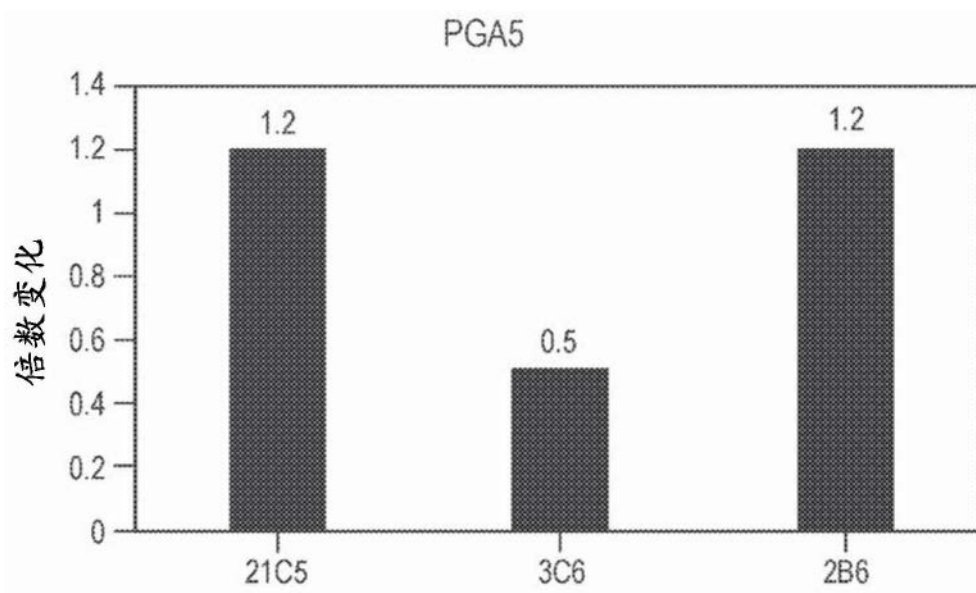


图4C

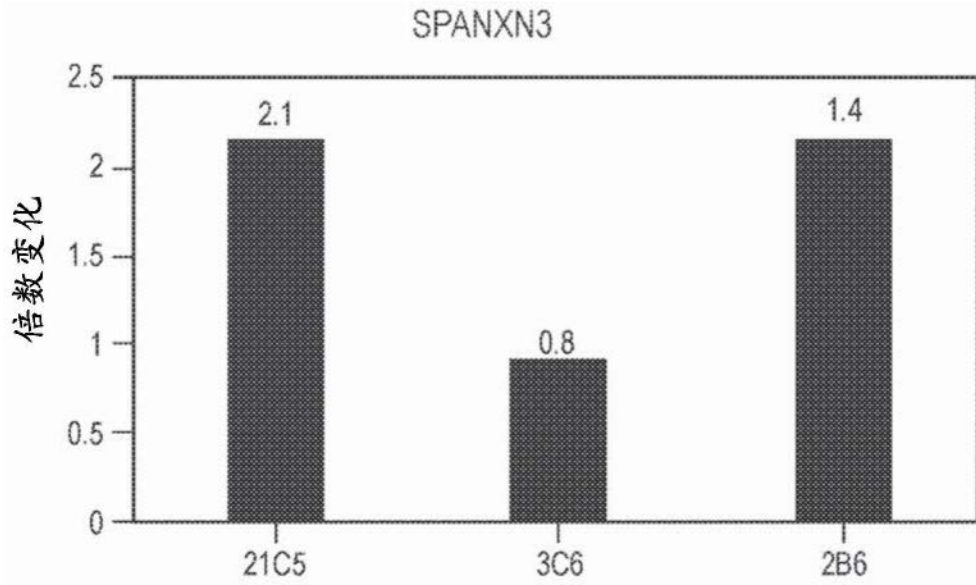


图4D

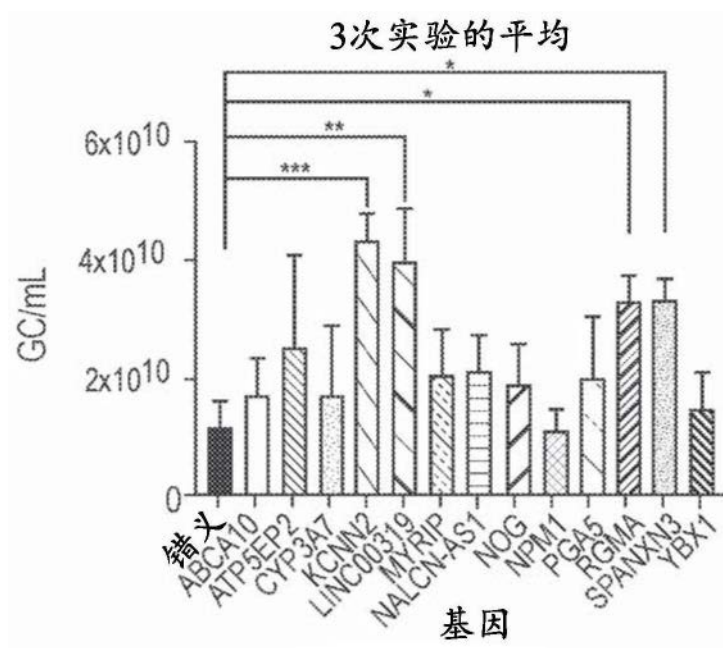


图5A

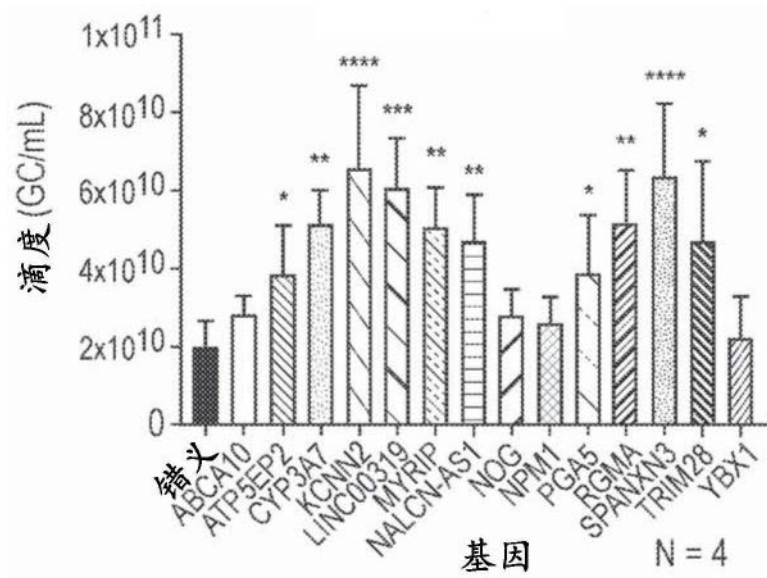


图5B

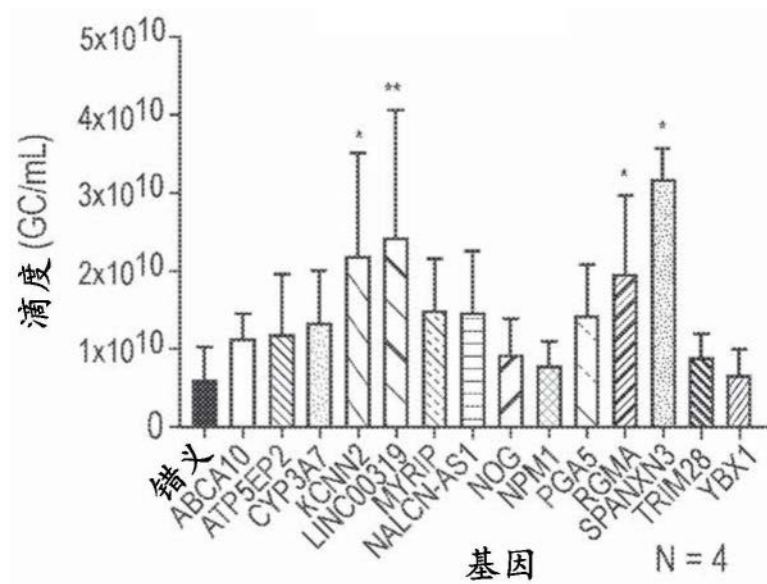


图5C

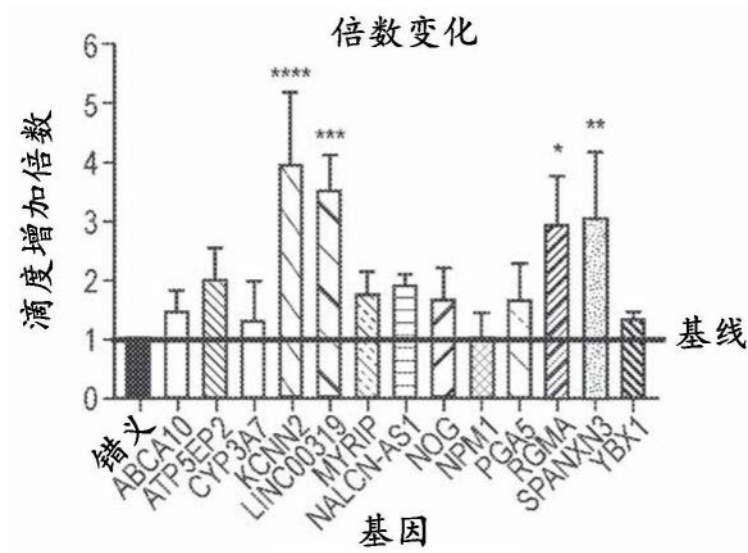


图5D

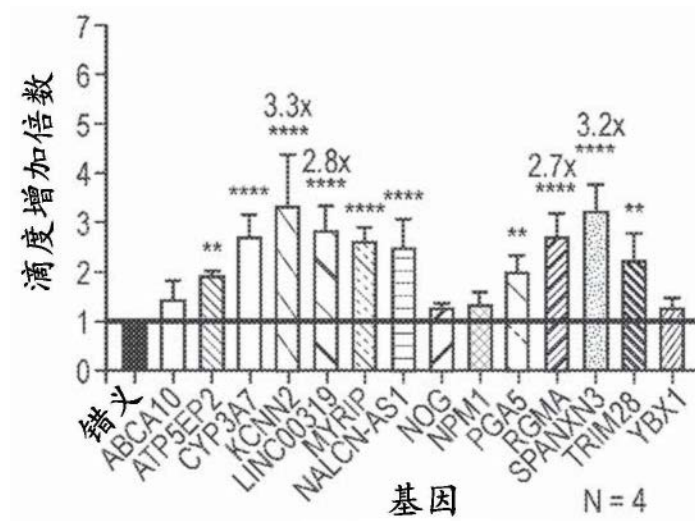


图5E

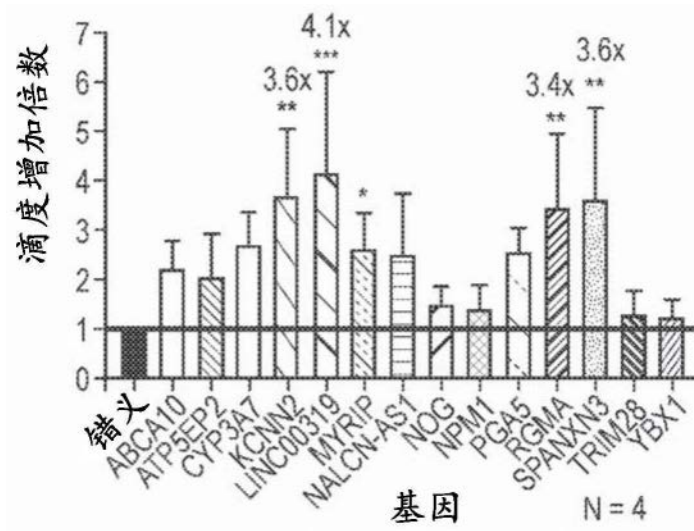


图5F

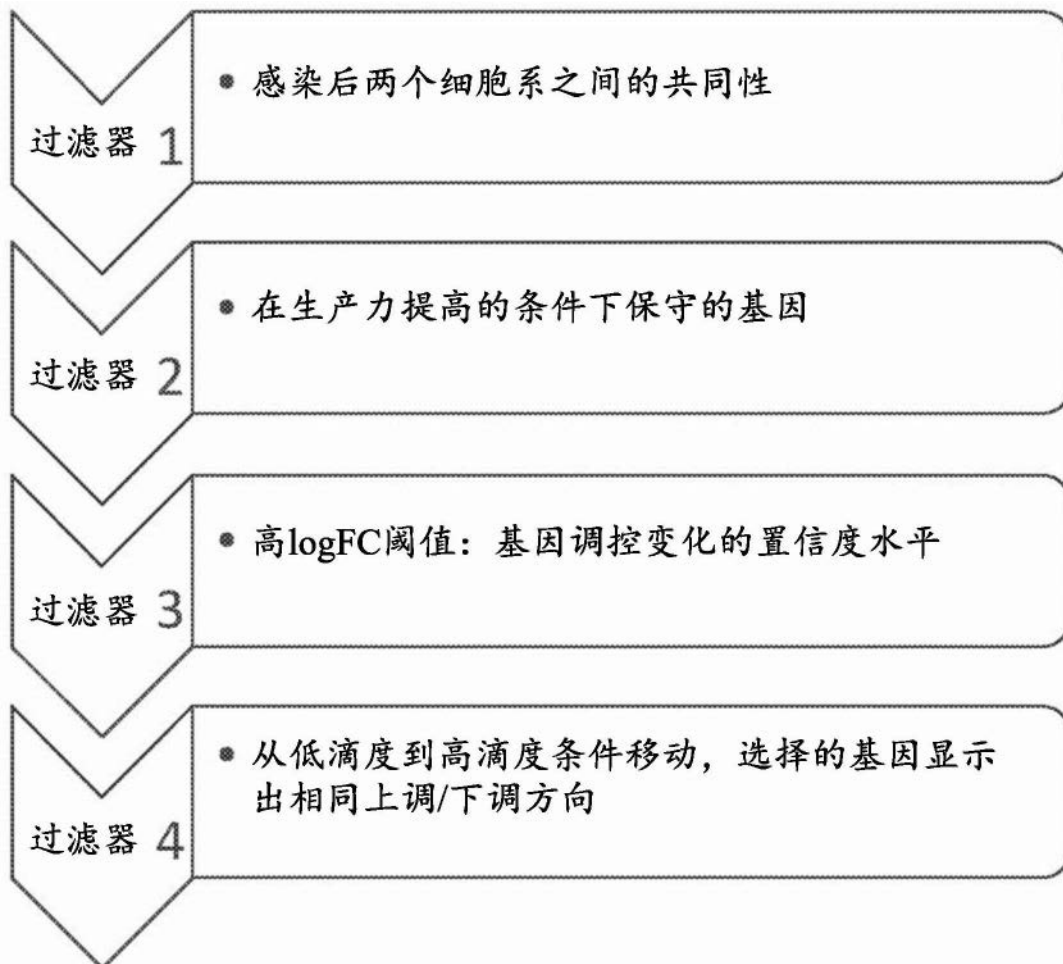


图6

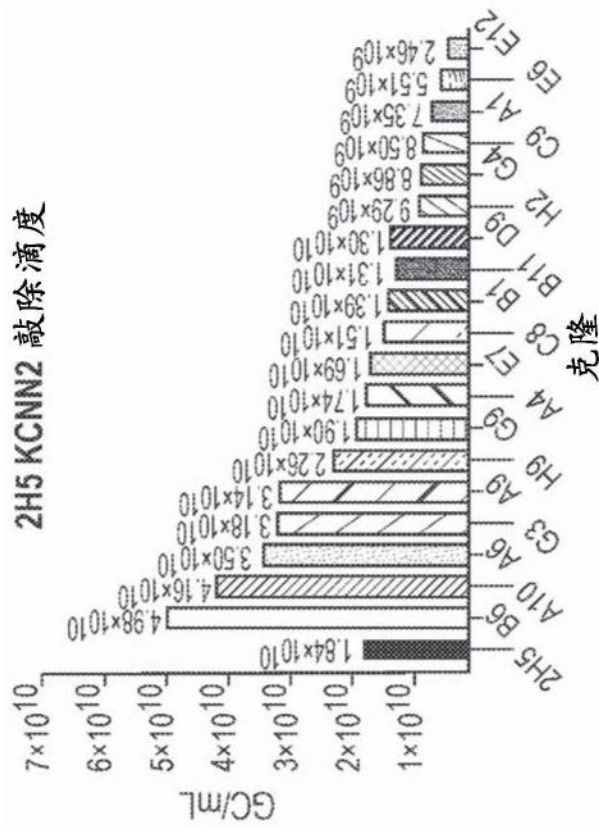


图7A

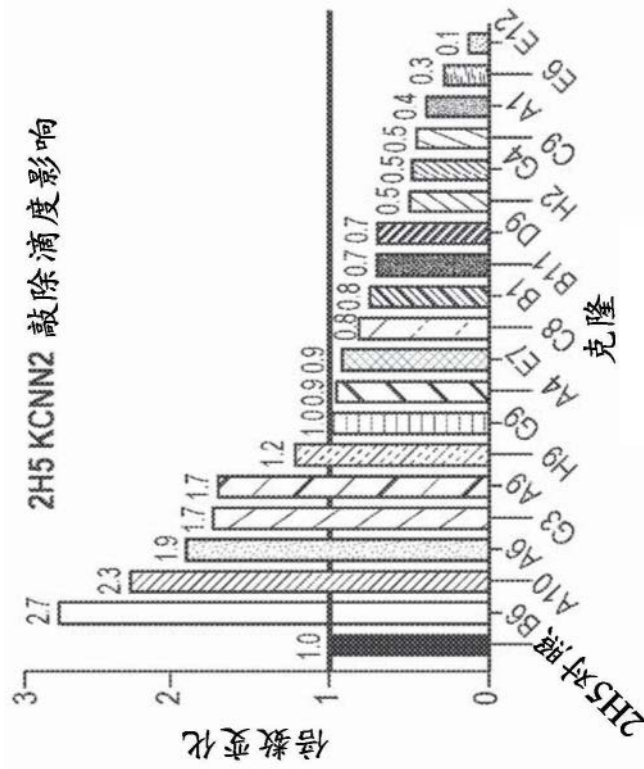


图7B

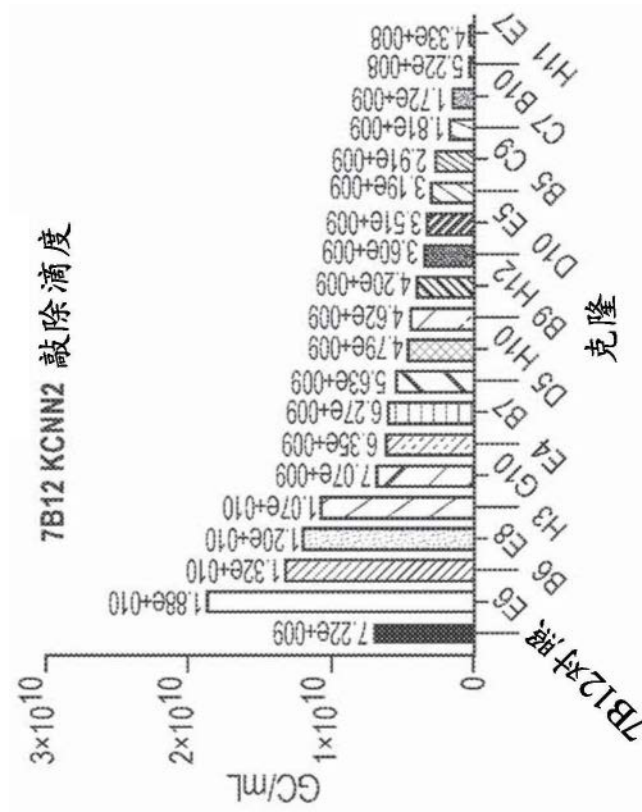


图7C

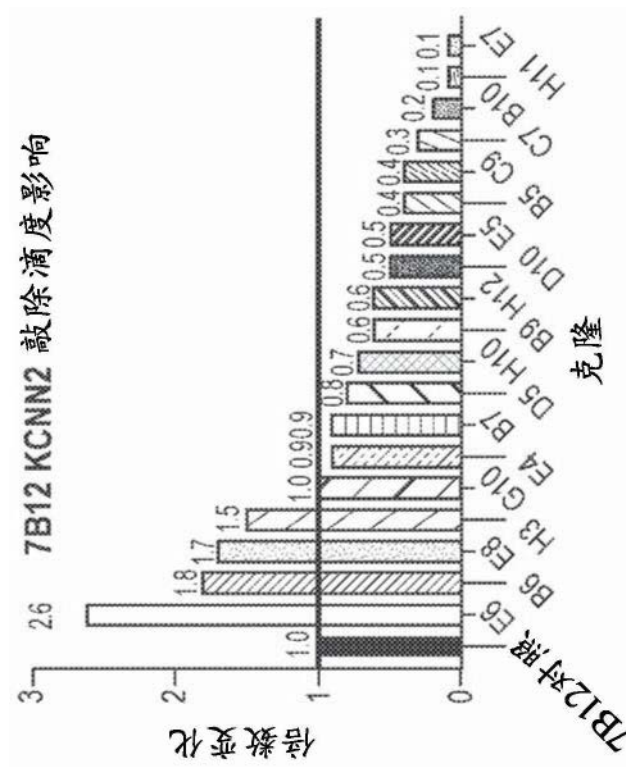


图7D

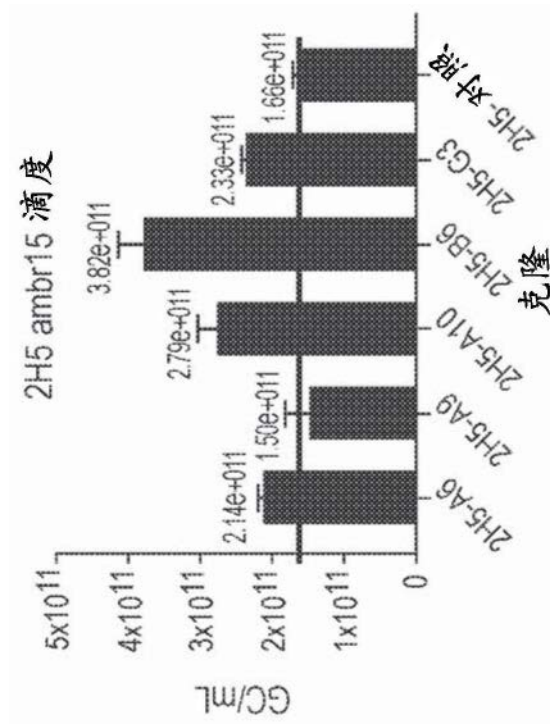


图8A

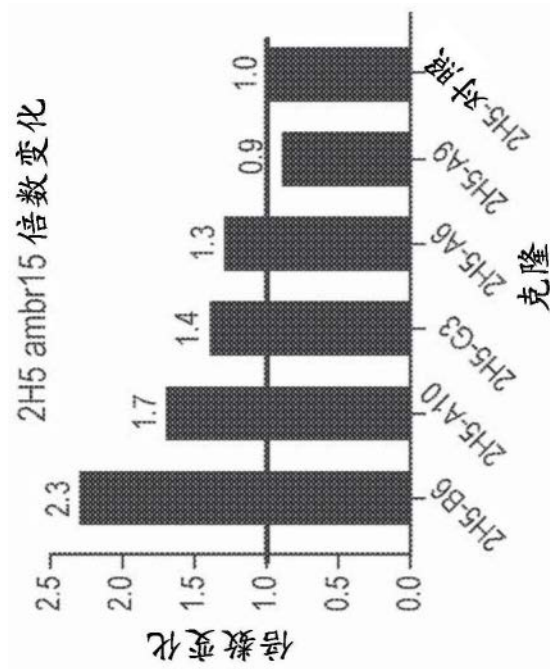


图8B

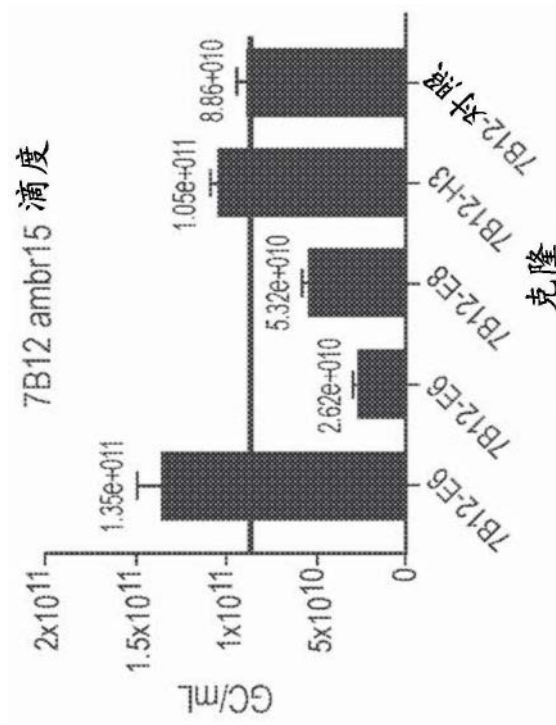


图8C

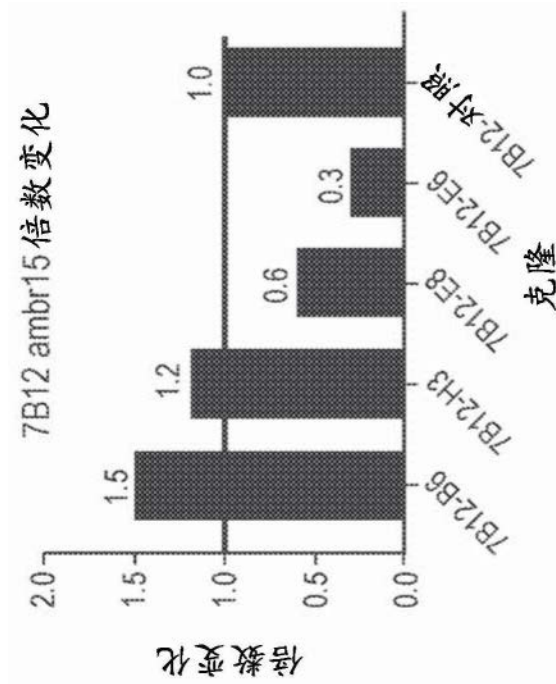


图8D

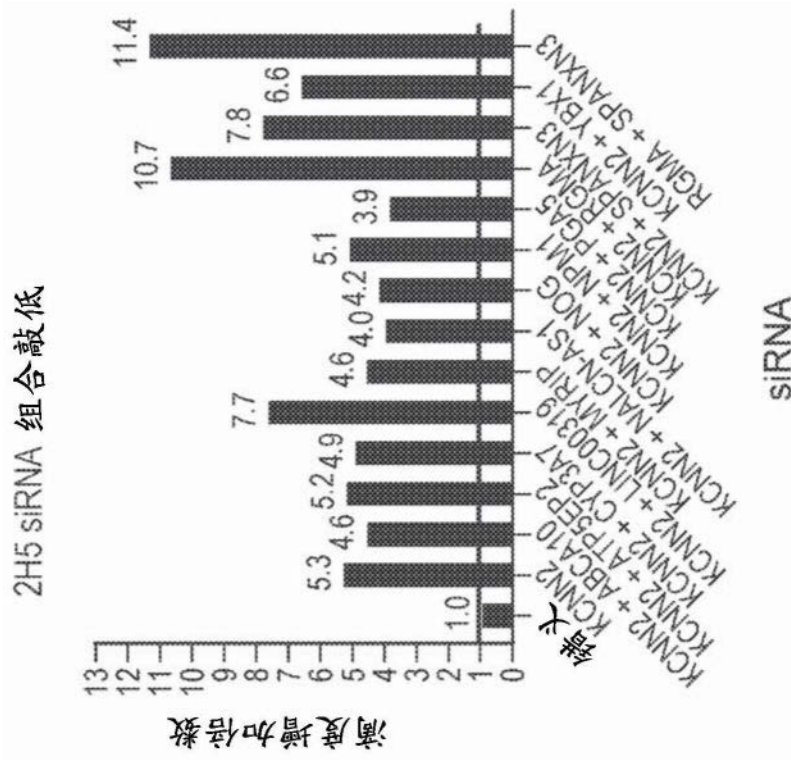


图9A

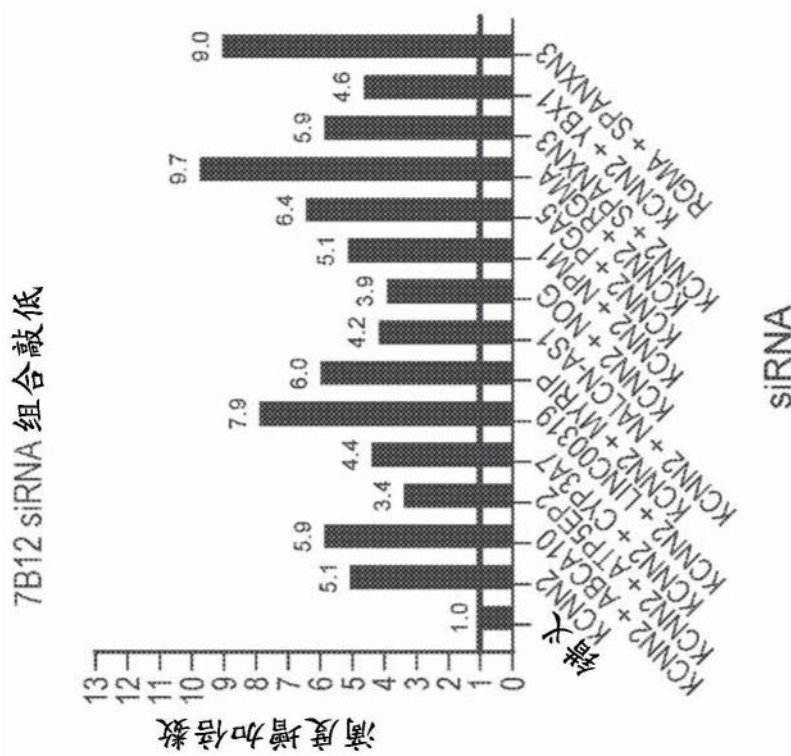


图9B